

DISRUPTORES ENDÓCRINOS.

Efectos en peces *Pimephales promelas*

Autora:
Lic. Karen Keel Morgan

Tutora:
Dra. Adriana Parodi Talice

Tribunal:
Dra. Nibia Berois
Dra. Gabriela Eguren
Dra. Cora Chalar




INSTITUT PASTEUR
DE MONTEVIDEO




Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Tesis para obtener el título de
Magister en Biología Celular y
Molecular

Noviembre 2012

DISRUPTORES ENDÓCRINOS.

Efectos en peces *Pimephales promelas*

Autora:

Lic. Karen Keel Morgan

Tutora:

Dra. Adriana Parodi Talice

Tesis para obtener el título de
Magister en Biología Celular y
Molecular

Tribunal:

Dra. Nibia Berois
Dra. Gabriela Eguren
Dra. Cora Chalar

Noviembre 2012

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en forma parcial por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Las actividades experimentales fueron desarrolladas en el departamento de aguas y productos químicos del LATU, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur Montevideo y en Facultad de Ciencias.

Agradezco a mi tutora Adriana por sus ideas, su apoyo constante y su dedicación durante estos años de trabajo, brindándome valiosas instancias de discusión de metodología y resultados.

A la promotora de esta maestría, Diana Míguez, quien lidera la investigación de PhD "Integrated risk assessment of endocrine disruptors in the Uruguay River", en la Universidad de Cranfield, quien participó en el diseño experimental proporcionando información relativa a su trabajo de doctorado sobre las posibles sustancias disruptoras y sus concentraciones en agua y efluentes.

A Agustín Carnikian, estudiante de maestría con quien realizamos los ensayos de exposición y compartimos muestras y datos biológicos de peces.

A Patricia Baklayan, Jefa del departamento de Aguas y Productos Químicos del LATU, por haberme apoyado todo el tiempo en este emprendimiento y cederme de mi tiempo laboral para realizar los ensayos de maestría y escribir la tesis. A aquellos que nos ayudaron en la realización de los ensayos de exposición de peces: Agustina Azpuín, Shirley Cabrera, Anabel Martínez, Diego Charquero y Marcelo Bado, quien también realizó la toma de las muestras junto con personal de medioambiente.

A los miembros del tribunal: Dra Nibia Berois, Dra. Cora Chalar y Dra. Gabriela Eguren, por aceptar formar parte de este y utilizar de su tiempo para leer el presente trabajo.

A Denise Vizziano por su colaboración y su ayuda en el diseño de los ensayos y reconocimiento fisiológico de los peces. Un agradecimiento especial a Gabriela Bedó por su apoyo y colaboración permanente, su disponibilidad para discutir los resultados y evacuar las dudas durante el desarrollo del trabajo.

Quisiera hacer extensivo este agradecimiento a todos los integrantes de la Unidad de Biología Molecular del Pasteur y en especial a todos los compañeros del departamento de aguas del LATU que me ayudaron de una forma u otra en la realización de mi maestría.

A toda mi familia que me apoyo para realizar este posgrado y que siempre está apoyando mis proyectos y mis actividades personales, en especial a mi esposo Amilcar y a nuestra pequeña Valentina, que viene en camino, quienes fueron mi mayor impulso para culminar esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Pag.
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Peces teleósteos.....	2
1.1.1. <i>Pimephales promelas</i>	2
1.2. Sistema endócrino de peces teleósteos.....	3
1.2.1. Hormonas hipofisarias.....	4
1.2.2. Gónadas.....	7
1.2.3. Hormonas esteroides.....	8
1.2.4. Espermatogénesis.....	11
1.2.5. Desarrollo del ovocito (ovogénesis).....	12
1.3. Disruptores endócrinos.....	16
1.3.1. Fuentes de exposición.....	16
1.3.2. Efecto sobre los seres vivos.....	18
1.3.3. Mecanismos de acción.....	19
1.3.4. Detección de compuestos disruptores endócrinos.....	21
2. OBJETIVOS.....	26
3. METODOLOGÍA.....	27
3.1. Extracción de las muestras.....	27
3.2. Ensayo de exposición con <i>Pimephales promelas</i>	27
3.2.1. Procedimiento del bioensayo.....	27
3.2.2. Cálculos y tratamiento estadístico.....	30
3.3. Cuantificación de vitelogenina mediante ELISA.....	30
3.3.1. Reactivos.....	31
3.3.2. Tratamiento previo de muestras.....	31
3.3.3. Desarrollo del método.....	32
3.3.4. Cálculos y tratamiento estadístico.....	33
3.4. Detección y cuantificación del nivel de ARNm para genes asociados a la regulación endócrina..	34
3.4.1. Tratamiento de muestras y extracción del ARN.....	34
3.4.2. Cuantificación y verificación de integridad del ARN.....	35
3.4.3. Retro Transcripción (RT).....	35
3.4.4. PCR tiempo final.....	36
3.4.5. PCR en tiempo real (Q-PCR).....	37
3.5. Detección de actividad estrogénica mediante YES (“Yeast Estrogen Screen”).....	39
3.5.1. Reactivos.....	39
3.5.2. Tratamiento previo de muestras.....	40
3.5.3. Reconstitución de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.....	41
3.5.4. Exposición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.....	41
3.5.5. Cálculos.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Ensayos de exposición con <i>Pimephales promelas</i>	44
4.1.1. Modificaciones en características anatómicas.....	44
4.1.2. Evaluación de fecundidad.....	47
4.1.3. Expresión proteica de Vitelogenina en <i>Pimephales promelas</i>	48
4.1.4. Evaluación de la expresión génica de <i>Pimephales promelas</i>	52
4.2. Actividad estrogénica determinada mediante YES.....	66
5. DISCUSIÓN.....	68
6. CONCLUSIONES.....	80
7. BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXO I.....	89
ANEXO II.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº FIGURA	Pag.
1. Dimorfismo sexual de <i>Pimephales promelas</i>	3
2. Grupos de células y hormonas de la adenohipófisis.	4
3. Acción sistémica y local de IGF-I.....	6
4. Estructura de un folículo.....	8
5. Esteroidogénesis gonadal.....	9
6. Representación esquemática de la actividad del eje HPG durante la síntesis de proteínas ovogénicas.....	14
7. Teñido inmunohistoquímico de folículo ovárico de <i>Gadus morhua</i> con sonda marcada con anticuerpos anti-ZRP.....	15
8. Fotografía de tres machos de <i>Pimephales promelas</i> con caracteres sexuales modificados.....	19
9. Efecto de los EDCs sobre los receptores esteroideos.....	20
10. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada genéticamente mediante la incorporación de un hER en su genoma.....	24
11. Acuarios en que se realizaron los ensayos de exposición a de planta de celulosa.....	28
12. Esquema de las condiciones ambientales y diseño de los ensayos de exposición con <i>Pimephales promelas</i>	29
13. Esquema de la placa para el desarrollo del ELISA.....	33
14. Foto de <i>Pimephales promelas</i> expuestos a 450 ng/l de E ₂	44
15. Características anatómicas de peces controles y expuestos a: E ₂ (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial.....	45
16. Característica gonadales de <i>Pimephales promelas</i> controles y expuestos a: E ₂ (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial.....	46
17. Puesta de huevos acumulada en función del tiempo para las peceras controles y de exposición a arroyo Fray Bentos, efluente industrial y E ₂ (150 y 450 ng/l).....	48
18. Ejemplo de curva de calibración obtenida en el ELISA de VTG.....	49
19. VTG expresada como µg de VTG por mg de proteína total para hembras controles y expuestas a: E ₂ (150 y 450 ng/l), arroyo Fray Bentos y efluente industrial.....	50
20. Proteína VTG expresada como µg de VTG por mg de proteína total para machos controles y expuestos a: E ₂ (150 y 450 ng/l), efluente urbano y efluente industrial.....	51
21. Electroforesis en agarosa al 1% realizada a los ARN extraídos de los hígados de peces expuestos al arroyo Fray Bentos.....	52
22. Gel de electroforesis en agarosa teñido con bromuro de etidio de los productos de amplificación, por PCR en tiempo final, con los cebadores correspondientes a los genes: ESR1, IGF-I, 18 S y VTG.....	53
23. Esquema de la estructura genómica de VTG (A), ZP3 (B), IGF-I (C) y GHR (D) de <i>Cyprinus carpio</i>	54
24. Gráficos de fluorescencia en función de los ciclos obtenidos como resultado de las PCR en tiempo real aplicadas a ADN genómico, ADN copia y ARN con los cebadores de ESR2, GHR y ESR1.....	55
25. Gráficos de CT en función del logaritmo de la concentración relativa de ADN (diluciones de las muestras) realizados a partir de la amplificación de diluciones de muestras control positivas.....	56
26. Gráfico obtenido a partir de la PCR en tiempo real con los cebadores para VTG y 18S.....	58
27. Gráficos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real con cebadores para ZP3 y 18S.....	59
28. Gráficos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real con cebadores para ESR2, GHR y 18S.....	59
29. Gráficos obtenidos a partir de PCR en tiempo real con cebadores para ESR1 e IGF-I.....	60
30. Resultado del análisis de la expresión relativa de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I para hembras expuestas a 150 ng/l, 450 ng/l de E ₂ , efluente urbano y efluente de planta de celulosa.....	62
31. Resultado del análisis de la expresión relativa de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I para machos expuestos a 150 ng/l, 450 ng/l de E ₂ , efluente urbano y efluente de planta de celulosa.....	65
32. Actividad relativa de la β-galactosidasa de las levaduras modificadas obtenida luego de la exposición de dichas levaduras a diferentes concentraciones de 17 β-estradiol.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Nº tabla	Pag.
1. Grupos de compuestos químicos que actúan como EDC y sus posibles fuentes de exposición.....	17
2. Cebadores y temperaturas de hibridación utilizados para la PCR en tiempo real.....	37
3. Promedio de huevos puestos por hembra por día durante el ensayo de exposición.....	47
4. Ejemplos de recuperación obtenida a partir de agregado de un estándar conocido de proteína VTG a diferentes muestras de hígado.....	50
5. Estudio de eficiencia de PCR en tiempo real para diferentes pares de cebadores.....	57
6. Ejemplo de valores de CT para VTG y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E ₂	58
7. Ejemplo de valores de CT para ZP3 y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E ₂	58
8. Ejemplo de valores de CT para ESR2, GHR y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E ₂	60
9. Ejemplo de valores de CT para ESR1, IGF-I y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E ₂	60
10. Resultados obtenidos en la PCR en tiempo real para los ARNm de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I.....	63
11. Valores de los parámetros obtenidos para la función de Hill.....	67
12. Resultados de estrogenicidad para efluente urbano e industrial.....	67
13. Efectos evaluados mediante Q-RT-PCR en ARNm de VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I....	69
14. Comparación de resultados en el cambio de los niveles de la proteína y el ARNm de VTG en hígado de <i>Pimephales promelas</i> expuestos a E ₂ , Arroyo Fray Bentos y Efluente industrial.....	77

ABREVIATURAS

11-KT.....	11 cetotestosterona
17 α ,20 β -DHP.....	17 α ,20 β -Dihidroprogesterona
17 α -HP.....	17 α -Hidroprogesterona
20 β -HSD.....	20 β -Hidroxiesteroide-Deshidrogenasa
ACTH.....	Hormona Adenocorticotropa
BLAST.....	“Basic Local Alignment Search Tool” (Herramienta básica de búsqueda de alineamientos)
BPA.....	Bisfenol A
CT.....	“Cycle Threshold” (Ciclo umbral)
DES.....	Dietilestilbestrol
EDC.....	“Endocrin Disruptor Compound” (Compuesto Disruptor Endócrino)
E ₂	17 β -Estradiol
EE ₂	17 α -Etinilestradiol
ELISA.....	“Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays” (Análisis de inmuno-absorción vinculado a enzimas)
ERE.....	Elemento de Reconocimiento de Estrógenos
ESR.....	Receptor de estrógenos
GH.....	“Growth Hormone” (Hormona de crecimiento)
GHBP.....	Proteínas de transporte específicas de GH
GHR.....	Receptores de GH
GnRH.....	Hormonas liberadoras de gonadotrofinas
GTHs.....	Gonadotrofinas
HAP.....	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPG.....	“Hypothalamus-Pituitary-Gonads” (eje hipotálamo-hipófisis-gónada)
IGFBP.....	“Insulin-like Growth Factor Binding Protein” (Proteínas de unión a factor de crecimiento)
IGF-I.....	“Insulin-like Growth Factor I” (Factor de crecimiento tipo I)
IGS.....	Índice Gónado-Somático
IHS.....	Índice Hepato-Somático
KF.....	Factor de condición
LATU.....	Laboratorio Tecnológico del Uruguay
LOEC.....	“Low Observe Effects Concentration” (Menor concentración con efecto observable)
MIH.....	Hormona Inductora de la maduración
MSH.....	Hormona melanoestimulante
NCBI.....	“National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
NOEC.....	“Non Observable Effects Concentration” (Mayor concentración sin efecto observable)
NRT.....	“No- Reverse transcriptasa” (sin transcriptasa reversa)
NTC.....	“No-Template Control” (sin molde control)
OD.....	Densidad Óptica
PCBs.....	Bifenilos policlorados
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD.....	<i>Pars distalis</i>
PI.....	<i>Pars intermedia</i>
PLs.....	Lactógenos Placentarios
POMC.....	Propiomelanocortina
PRL.....	Hormona productora de prolactina
RPD.....	Pars distalis proximal
SL.....	Somatolactina
SRIH.....	Somatostatina
STAR.....	Proteínas reguladoras de la esteroidogénesis
T.....	Testosterona
TSH.....	Hormona estimulante de la tiroides
VTG.....	Vitelogenina
YES.....	Yeast Strogen Screen
YNB.....	Yeast nitrogen Base
ZP3.....	Proteína de la zona radiata 3

DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Efectos en peces *Pimephales promelas*

RESUMEN

Los disruptores endócrinos son agentes exógenos que causan alteraciones a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, interfiriendo con el funcionamiento del sistema endócrino de seres vivos. Dichos compuestos actúan como agonistas o antagonistas interactuando con los receptores hormonales, potenciando o atenuando su acción. En este trabajo se evaluó la presencia de disruptores endócrinos en agua proveniente de Arroyo Fray Bentos al cual derivan efluentes cloacales de dicha ciudad, y en efluente industrial de una planta de pulpa de celulosa próxima a esta ciudad. Se realizó un bioensayo de exposición de 21 días con peces *Pimephales promelas*, incluyéndose como controles la sustancia estrogénica 17 β -Estradiol a 150 y 450 ng/l. Se observó fecundidad, longitud, peso total y gonadal de los peces, se calculó factor de condición, e Índice Gónado-Somático. Se determinó en hígados la expresión de la proteína vitelogenina mediante ELISA y el nivel de ARNm de genes asociados a la regulación endócrina por medio de RT-Q-PCR. No se observó en ningún caso modificaciones fenotípicas, ni en características anatómicas. La exposición de *Pimephales promelas* al agua de arroyo, originó resultados similares a la exposición a estradiol en cuanto a la puesta de huevos y a la expresión de ARNm de genes como: Proteína de la Zona Radiata 3 (ZP3), Receptor de estrógenos tipo 1 (ESR1) y Factor de Crecimiento tipo I (IGF-I). Por el contrario, el efluente industrial, provocó algunos efectos opuestos a los del estradiol en la producción de huevos y en los niveles de ARNm de ESR1, ESR2, IGF-I y Receptor de la Hormona de Crecimiento (GHR). Se determinó además la presencia de estrogenicidad mediante *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, en ambas muestras, no encontrándose actividad detectable. Los presentes resultados sugieren que el agua del Arroyo Fray Bentos provoca respuestas similares a los estrógenos y que el efluente industrial ocasiona efectos opuestos al estradiol, pudiendo tener efectos antiestrogénicos o androgénicos sobre *P. promelas* en las condiciones ensayadas. Cabe explicar que debido a la complejidad de las muestras ensayadas, se observó un patrón mayoritario de efecto estrogénico, antiestrogénico o androgénico y no un efecto global sobre la totalidad de los parámetros analizados.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Peces Teleósteos

Una extensa mayoría de los peces existentes hoy en día se clasifican como peces teleósteos o también llamados peces óseos. Su surgimiento data probablemente en la mitad o finales de período triásico, alrededor de 220 o 200 millones de años atrás. Se definen como un grupo de halecostomos con un arco neural ural elongado, placas dentales basibraquiales impares y un premaxilar móvil (Nelson, 1994). Paterson (1968) demostró que los teleósteos son definidos sobre la base del esqueleto caudal como un grupo monofilético. Tienen el esqueleto totalmente osificado, poseen branquias recubiertas por una capa llamada opérulo y piel cubierta de escamas. Tienen además vejiga natatoria situada en la parte anterior del intestino, con forma de saco y llena de una mezcla de gases y aire. No poseen válvula espiral y la cola es homocerca (con dos partes iguales). Su alimentación es muy variada, algunos se alimentan de algas o plancton, otros de insectos, gusanos, moluscos o crustáceos, y muchos se alimentan de otros peces. Los teleósteos se reproducen por huevos y la fecundación suele ser externa (Nelson, 1994).

1.1.1. *Pimephales promelas*

Pimephales promelas es un pez teleósteo que pertenece a la familia Cipriniformes y se distribuye en América del Norte. Los adultos miden aproximadamente de 50 a 75 mm de largo y pesan entre 2 y 5 gramos (Ankley y Johnoson, 2004). Son peces de puesta fraccionada (ponen 50 a 200 huevos cada 3 a 5 días) y de fácil mantenimiento en el laboratorio, debido a la gran cantidad de huevos que producen se obtienen grandes poblaciones en poco tiempo (Jensen y col. 2001). La especie posee un ciclo de vida relativamente corto, alcanzan la madurez sexual alrededor de los 5 meses luego de la eclosión bajo condiciones óptimas, y su ciclo de reproducción puede ser controlado fácilmente a través del mantenimiento de la temperatura y el fotoperiodo (Ankley y col. 2001). Los *P. promelas* adultos presentan dimorfismo sexual muy marcado, lo cual posibilita trabajar con machos y hembras diferenciados (Ankley y Johnoson, 2004). Los machos sexualmente maduros desarrollan tubérculos nupciales y cresta dorsal, su cuerpo adquiere una coloración oscura, casi negra, excepto dos bandas transversales que se mantienen de color claro. Las hembras por su parte mantienen un color claro y desarrollan ovipositor (Figura 1). Los machos de esta especie son muy territoriales, defienden los huevos puestos por las hembras de cualquier otro individuo que quiera llegar a los mismos (Ankley y col. 2001).

Los bioensayos o tests de toxicidad con organismos acuáticos son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional, y empleados en muchos países, como herramienta para el monitoreo, control de la contaminación hídrica (Castro y col. 2002) y evaluación de efectos a largo plazo (Thorpe y col. 2007). Existen muchos antecedentes en los cuales *P. promelas* es utilizado en bioensayos para efluentes y pesticidas (Ankley y col. 2001). Es una de las especies más ampliamente utilizada como referencia en estudios ecotoxicológicos en todo el mundo, siendo manejada en bioensayos desde 1960 por diversos

organismos internacionales de regulación ambiental tales como: *US-EPA (United States - Environmental Protection Agency)*, *ASTM (American Society for the Testing of Materials)*, *OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development)* y *APHA (American Public Health Association)* (Environmental Protection Agency, 2002).

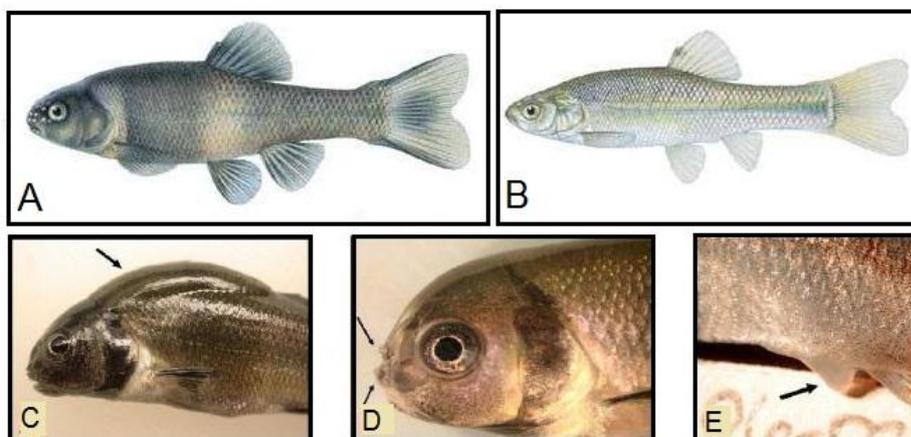


Figura 1. Dimorfismo sexual de *Pimephales promelas*. A. macho característico, B. hembra característica de la especie, C. se señala con una flecha la paleta dorsal desarrollada en machos, D. tubérculos nupciales desarrollados en machos y E. ovipositor presente por delante de la aleta anal, normal para una hembra reproductora. Extraído y modificado de Wolfand, 2007.

1.2. Sistema endócrino de peces teleósteos

El sistema endócrino es el principal regulador de importantes procesos metabólicos tales como: nutrición, desarrollo y reproducción. Responde al mantenimiento de los mecanismos homeostáticos mediante acciones de regulación positiva y negativa, permitiendo mantener los niveles hormonales en equilibrio (IPCS, 2002).

La sincronización de los reproductores entre sí y de éstos con las variaciones ambientales permite que los individuos maduren simultáneamente y en el momento más idóneo lo cual garantiza una mayor supervivencia de la progenie (Carrillo y col. 1993). La sincronización de los individuos con los factores ambientales resulta de gran importancia en el ciclo reproductivo de los peces teleósteos, que presentan cambios cíclicos en sus niveles hormonales y viven en un medio que experimenta marcadas variaciones estacionales, en factores tales como: luz, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes, etc. Cada individuo dispone de un sistema que recibe las informaciones procedentes tanto del exterior como del interior del organismo, las integra y determina el establecimiento de un estado endocrino idóneo, regulando a su vez, todos los eventos fisiológicos que conducirán a la reproducción. Estas complejas funciones se llevan a cabo a través de múltiples interacciones que tienen lugar a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG) (Kah y col. 1993). La información proveniente de los factores ambientales es procesada por el sistema nervioso en forma rápida y con una respuesta a corta distancia (a través del hipotálamo), luego por el sistema endocrino (a través de la hipófisis), respondiendo en forma lenta, liberando hormonas que tendrán acción a larga distancia (Vizziano, 2008).

Las hormonas son producidas y secretadas al torrente sanguíneo por las glándulas endócrinas (hipotálamo, hipófisis y gónadas) en pequeñas concentraciones. Posteriormente las mismas se unen a sus receptores específicos en las células blanco, desencadenando una cascada de señales que dará lugar a las funciones correspondientes (EPA, 1997).

1.2.1. Hormonas hipofisarias

La hipófisis está presente en todos los vertebrados y en teleósteos se encuentra situada en la base del tercer ventrículo, alojada en la silla turca. Consta de una porción nerviosa, la neurohipófisis, constituida por axones de células neurosecretoras que proyectan a la hipófisis, y de una porción endócrina, la adenohipófisis, constituida por células secretoras no nerviosas. La adenohipófisis se divide normalmente en dos regiones: la pars intermedia (PI), en aposición al tejido nervioso neurohipofisario y la pars distalis (PD), que constituye generalmente la parte mayor y más compleja de la adenohipófisis (Rand-Weaver y Kawachi, 1993). En la figura 2 se muestran los tipos celulares y hormonas producidas en cada región de la adenohipófisis. En el presente trabajo se centrará la atención en la hormona de crecimiento (GH) y su receptor (GHR), ya que este último formará parte del ensayo.

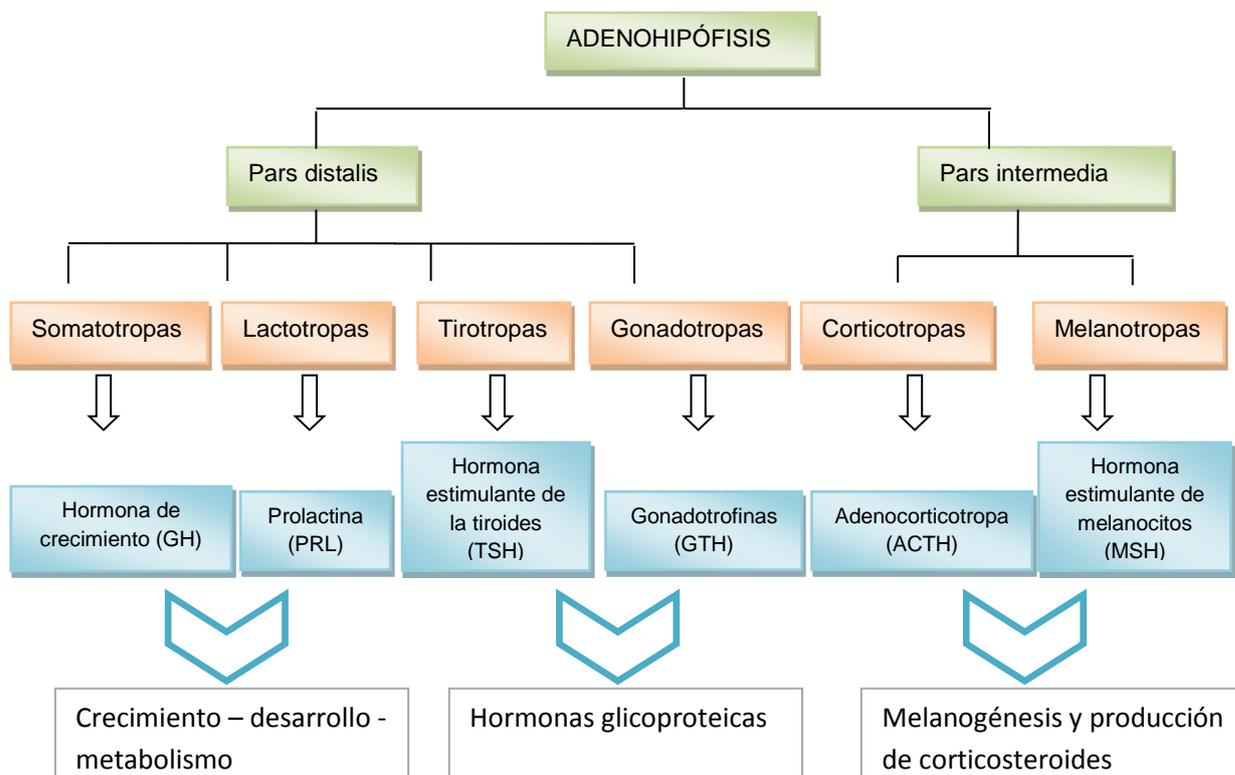


Figura 2. Grupos de células y hormonas de la adenohipófisis. En recuadros naranjas se mencionan los tipos celulares presentes en cada parte de la adenohipófisis, en celeste las hormonas producidas por dichas células. Las hormonas de la adenohipófisis pueden ser agrupadas en tres familias: un primer grupo está constituido por las hormonas tróficas, es decir, la GH, relacionada con el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo, y la PRL relacionada con el crecimiento, la osmorregulación y la reproducción. El segundo grupo lo componen las hormonas glicoproteicas, que comprende a la TSH y a las GTHs. El último grupo está compuesto por MSH implicada en la melanogénesis y en la dispersión de la melanina, y la ACTH que estimula la producción de corticosteroides.

Hormona de crecimiento (GH)

El crecimiento es el resultado de un proceso enormemente complejo en el que interactúan factores ambientales, nutricionales y genéticos. La medida del crecimiento sirve como un indicador de la aptitud del organismo, se relaciona con la habilidad de adquirir o asimilar alimento, de mantener la homeostasis y de regular su metabolismo. El eje somatotrópico, con la GH como pieza central, regula el crecimiento de los vertebrados integrando todos estos factores (Saera Vila, 2010).

La GH ha mantenido la estimulación del crecimiento somático como una de las funciones principales a lo largo de la evolución, aun así, también posee funciones relacionadas con la maduración sexual, la regulación osmótica y la modulación del sistema inmune (Rand-Weaver y Kawauchi, 1993; Saera Vila, 2010). Dicha hormona, en general, ha seguido una evolución altamente conservativa, sin embargo, en mamíferos y en peces la tasa de evolución se ha incrementado marcadamente, de tal forma que existen diferencias entre las secuencias de teleósteos y mamíferos e incluso entre los propios teleósteos (Wallis y col. 1996).

La GH se sintetiza en la pars distalis proximal (RPD) (Laiz-Carrión y col. 2003) y se libera al torrente sanguíneo tras la escisión del péptido señal, dando proteínas maduras de 188 o 189 aminoácidos. Presenta varios residuos de cisteína implicados en la formación de puentes disulfuro y en la estructura tridimensional (Kawauchi y Sower, 2006). Una vez liberada al torrente circulatorio, la GH se acompleja con proteínas de transporte específicas (GHBP), las cuales potencian su acción incrementando su vida media en sangre (Inoue y col. 2003).

La GH ejerce su acción a través de sus propios receptores presentes mayoritariamente en células hepáticas. Estimula con ello la síntesis del factor de crecimiento tipo I (Insulin-like Growth Factor I - IGF-I), inductor final del crecimiento. Se considera que la GH actúa sobre el crecimiento óseo y estimula a su vez la síntesis y la liberación de IGF-I tanto a nivel hepático (acción sistémica) como extra hepático (acción local), siendo la síntesis hepática la mayor fuente de IGF-I circulante (Figura 3) (Saera Vila, 2010; Nelson y col. 2010).

GH e IGF-I cumplen funciones similares en cuanto al crecimiento y sus niveles poseen una significativa relación positiva entre sí (Beckman, 2011). Además, cumplen otras funciones como por ejemplo, GH incrementa la gluconeogénesis y la lipólisis además de contrarrestar la acción de la insulina, e IGF-I aumenta el consumo de glucosa, la lipogénesis y disminuye la gluconeogénesis. IGF-I además de efector de la acción de la GH, amplifica las acciones anabólicas de la misma, a la vez que contrarresta sus efectos sobre el metabolismo de lípidos y azúcares (Kaplan y Cohen, 2007).

GHR es una proteína de unos 640 aminoácidos que al eliminar el péptido señal presenta un tamaño de unos 620 aminoácidos, con un peso molecular de 70 KDa. Posee una región extracelular compuesta por dos dominios: un dominio N-terminal conservado, compuesto de unos 200 aminoácidos y responsable de la interacción con el ligando, y un dominio adyacente a la membrana plasmática al que se le atribuyen funciones estructurales. Cada dominio presenta 7 hojas β y únicamente el dominio N-terminal contiene residuos de cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro intramoleculares o intermoleculares durante la dimerización del receptor (Van den Eijnden y col. 2006).

1.2.2. Gónadas

Morfología de testículos

Los testículos de teleósteos son órganos alargados y bilobulados, asociados a la pared dorsal de la cavidad corporal. Como en otros vertebrados, se encuentran envueltos de una capa celular de tipo fibrosa denominada túnica albugínea, y están compuestos de una porción intersticial y de otra porción lobular. La porción intersticial se localiza entre los lóbulos testiculares y está compuesta por células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. En la porción lobular se localizan las células de la línea germinal y las células somáticas o células de Sertoli (Nagahama, 1994; Vizziano, 2008). Las células de Sertoli conforman un soporte estructural, poseen funciones en la nutrición, transporte, filtración y metabolismo; a su vez actúan como una barrera testicular y fagocitan las células germinales remanentes (Vizziano, 2008).

Morfología de ovarios y ovocitos

La mayoría de los teleósteos posee 2 ovarios unidos en la porción caudal. El ovario es un órgano hueco, que presenta una cavidad central o luz, cuyo tamaño varía según la fase del ciclo ovárico. Está recubierto de una membrana serosa peritoneal que constituye el epitelio germinal y en cuyo tejido conjuntivo laxo hay vasos sanguíneos, terminales nerviosos así como también tejido adiposo. Bajo la capa serosa se encuentra la túnica albugínea formada por tejido conjuntivo denso, y un manto muscular liso constituido por dos capas, una externa longitudinal y una interna más gruesa y circular (Muñoz Cueto, 2005).

Los folículos ováricos se originan a partir del epitelio germinal y están constituidos por las ovogonias u ovocitos y células somáticas de función diversa. Las células de la granulosa y de la teca constituyen la envoltura folicular y presentan un desarrollo más o menos sincrónico con las células de la línea germinal (Figura 4).

De acuerdo con el patrón de desarrollo de los ovocitos, se distinguen tres tipos de ovarios: el ovario con sincronismo total que contiene ovocitos en el mismo estado de desarrollo y es característico de teleósteos que desovan sólo una vez y mueren, el ovario con sincronismo por grupos se caracteriza por la presencia de, al menos, dos poblaciones de ovocitos en

diferente estado de desarrollo; suelen ser especies con una puesta anual y una estación de puesta relativamente corta, y el ovario asincrónico que contiene ovocitos en todos los estados de desarrollo; este tipo de ovario se da en especies con puestas múltiples y una estación de puesta dilatada, tal cual la especie en estudio *Pimephales promelas* (Muñoz Cueto, 2005).

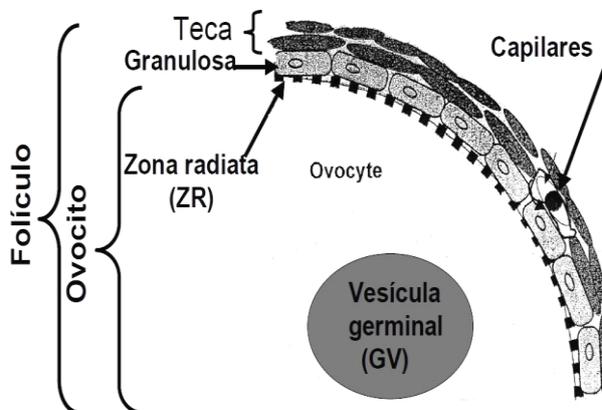


Figura 4. Estructura de un folículo Extraído y modificado de Muñoz Cueto, 2005.

1.2.3. Hormonas esteroideas

Los esteroides son moléculas lipídicas sencillas, de bajo peso molecular. Su ruta biosintética presenta como precursor común el colesterol, comenzando con el transporte del mismo a través de la membrana mitocondrial de las células por medio de proteínas reguladoras de la esteroidogénesis (STAR) (Nakamura y col. 2009). Los órganos sintetizadores de dichas hormonas se pueden clasificar como esteroidogénicos, aquellos capaces de procesar el colesterol, y convertidores, aquellos con capacidad de convertir un esteroide en otro. Las gónadas de teleósteos son órganos esteroidogénicos, poseen las enzimas necesarias para la síntesis de estos esteroides y para su transformación en toda una serie de intermediarios implicados en las distintas fases de la reproducción y en ciertos comportamientos sexuales. Producen tres tipos de esteroides importantes para la reproducción: estrógenos o esteroides C18, andrógenos o esteroides C19 y progestágenos o esteroides C21 (Figura 5) (Muñoz Cueto, 2005).

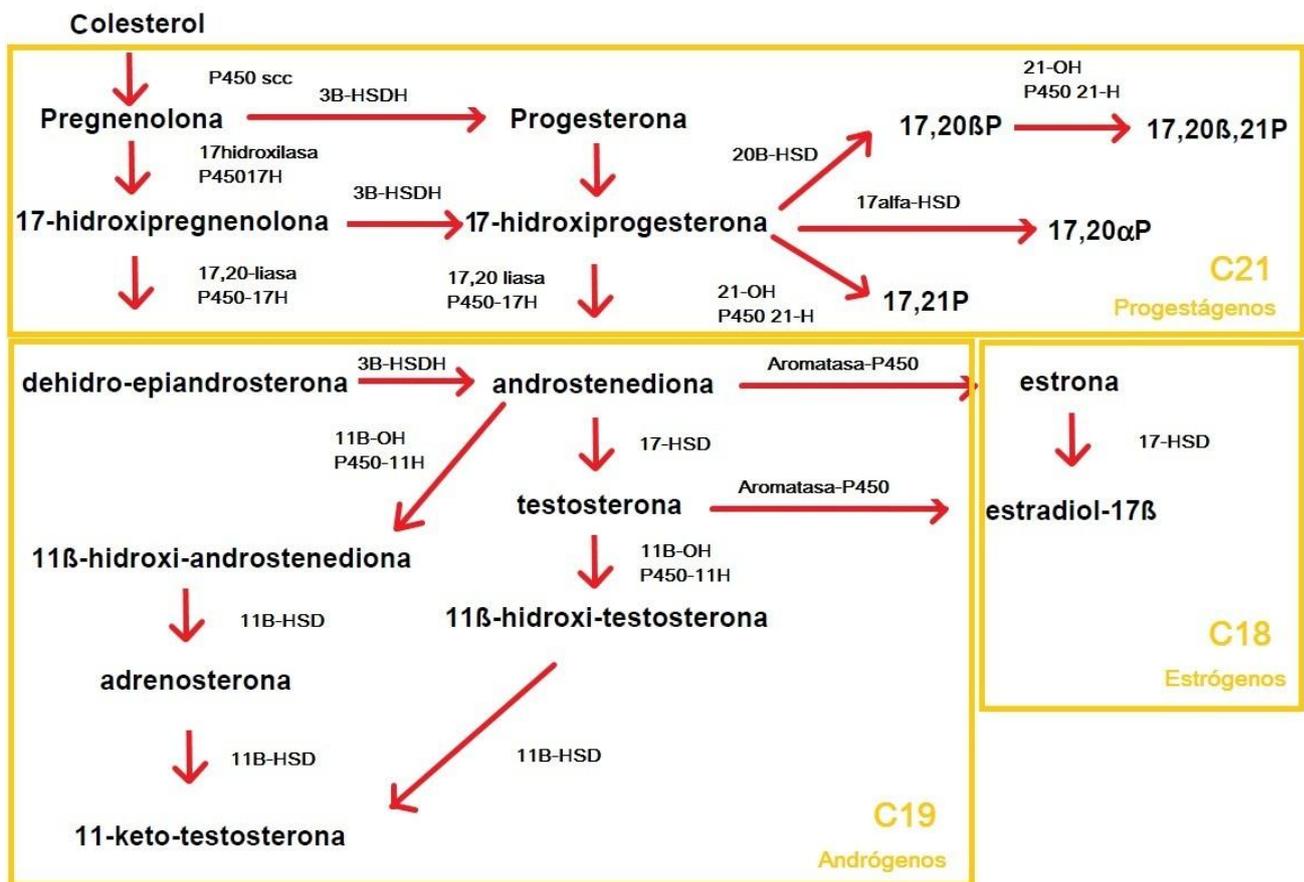


Figura 5. Esteroidogénesis gonadal. Clasificación de esteroides en: Progesterágenos (C21), Andrógenos (C19) y estrógenos (C18). Extraído y modificado de Vizziano, 2008.

Esteroidogénesis gonadal

En testículos de teleósteos la síntesis de hormonas esteroideas tiene lugar, principalmente, en las células de Leydig. Las mismas poseen distintas enzimas implicadas en la esteroidogénesis y características ultraestructurales propias de células productoras de esteroides. Si bien la capacidad esteroidogénica de las células de Sertoli es aún incierta, en algunas especies se han observado características bioquímicas, histoquímicas y ultraestructurales que permiten sospechar su implicación en la síntesis de esteroides (Rinchart y col. 1993).

En el ovario de teleósteos la síntesis de esteroides tiene lugar en las células somáticas que acompañan al ovocito (Nagahama, 1994). Las células de la teca poseen la maquinaria enzimática que sintetiza testosterona (T) y 17α-Hidroxiprogesterona (17α-HP), pero carecen de actividad aromatasa y 20β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (20β-HSD), por lo que son incapaces de producir 17β-Estradiol (E₂) y 17α, 20β - Dihidroxiprogesterona (17α, 20β-DHP) (Figura 5). Por otro lado, las células de la granulosa poseen actividad aromatasa y 20β-HSD, pero carecen de la maquinaria enzimática para sintetizar T y 17α-HP, por lo que requieren el suministro de las mismas desde la teca. Las células de la teca, en respuesta a las gonadotrofinas, producen y secretan esteroides como la T en vitelogénesis y la 17α-HP durante la maduración, luego dichos esteroides son transportados a la granulosa y activadas las

enzimas implicadas, son transformados a E_2 y $17\alpha, 20\beta$ -DHP a través de la aromatasa y 20β -HSD respectivamente (Nagahama, 1994).

Acción fisiológica de las hormonas esteroideas

La acción de las hormonas esteroideas requiere de su entrada a la célula por difusión pasiva a través de la membrana celular, su unión a un receptor proteico intracelular, la inducción de un cambio conformacional, y la acción directa del complejo hormona-receptor sobre el ADN, determinando la modulación de la expresión génica (Power y col. 1992). Lo que implica la activación o la inhibición de determinados genes en dicha célula (Beato, 1989; Fuller, 1991).

En peces teleósteos, los esteroides gonadales desempeñan un importante papel en los procesos de gametogénesis. Dichas acciones pueden ser ejercidas directamente sobre las gónadas o ser el resultado de la acción de estas hormonas sobre el hígado, la hipófisis y/o el cerebro (Anglade y col. 1994; Valotaire y col. 1993). En hembras, las hormonas esteroideas gonadales tienen acción sobre el ovario y estructuras sexuales secundarias, inciden de forma directa o indirecta sobre el proceso de ovogénesis, en las etapas de proliferación de las ovogonias, crecimiento, vitelogénesis, zonagénesis, maduración de los ovocitos y la emisión de los óvulos (Arukwe y Goksoyr, 2003).

Receptores de hormonas esteroideas

Las acciones de las hormonas esteroideas son mediadas a través de interacciones con receptores nucleares específicos de estrógenos (ESR) (Filby y Tyler, 2005), localizados principalmente en hígado, hipófisis, cerebro, glándula pineal y gónadas (Muñoz Cueto, 2005).

Los ESR son receptores nucleares que actúan como factores de transcripción dependientes de ligandos, regulando la expresión de sus genes diana, ya sea, directamente mediante la unión específica a un elemento de respuesta a estrógenos (estrogen responsive elements – ERE) en los promotores de los genes diana, o indirectamente a través de interacciones con otros factores de transcripción (Hall y col. 2001).

Los ESR poseen un extremo N-terminal con una considerable divergencia. En el mismo se encuentran: un dominio A/B implicado en la transcripción, un dominio D (región bisagra) necesario para el mantenimiento de la estructura tridimensional del ESR, y un dominio F muy pobremente conservado. A su vez los ESR poseen dos dominios conservados, un dominio C, región central de unión al ADN organizado en forma de dos hélices estabilizadas por zinc, y un dominio E, responsable de la unión al ligando, la localización nuclear, y la activación transcripcional (Filby y Tyler, 2005). La alta conservación de los dominios E en peces implica propiedades similares en cuanto a la unión de ligandos para los distintos subtipos de ESR (Matthews y col. 2001).

Años atrás se pensaba que las numerosas acciones de los estrógenos sobre sus diversos tejidos diana eran mediadas a través de un único receptor, ESR α o ESR1. La presencia de un segundo subtipo, ESR β o ESR2 ha sido demostrada en mamíferos, aves, peces y anfibios. Más recientemente, un tercer subtipo ESR β 2 o ESR γ se ha descubierto en los peces teleósteos y está estrechamente relacionado con ESR2, lo que sugiere una duplicación de este gen en parte o completamente los peces (Filby y Tyler, 2005). El descubrimiento de múltiples ESRs ha añadido complejidad adicional a la comprensión de la acción de estrógenos y provocado un gran interés en las respectivas funciones de cada subtipo.

La importancia biológica de múltiples ESR aún no se ha aclarado completamente, ESR1 y ESR2 tienen patrones de expresión muy variados en diferentes especies de peces (Menuet y col. 2002). Los subtipos ESR2 tienen menor expresión en hígado y la misma no varía durante el desarrollo gonadal, a su vez tienen mayor expresión en testículo, lo cual hace pensar que juegan un rol en la espermatogénesis o desarrollo testicular y no en la inducción de la producción de proteínas vitelogénicas en hígados de hembras como se conoce para ESR1 (Filby y Tyler, 2005).

Existen evidencias de que los esteroides regulan la expresión de sus propios receptores en las células hepáticas, hipotalámicas e hipofisarias, propiedad que parece común a los efectores con receptores nucleares (Salbert y col. 1993). Por ejemplo se ha descrito que los estrógenos inducen un rápido aumento en los niveles de ARNm del ESR hepático en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris), determinando un fuerte incremento en la síntesis de vitelogenina (VTG) (Muñoz Cueto, 2005).

1.2.4. Espermatogénesis

La espermatogénesis en teleósteos tiene lugar en estructuras císticas del testículo delimitadas por las células de Sertoli. El estrógeno regula la expresión de gonadotrofinas (GTHs) y las mismas regulan la espermatogénesis y la espermiación. Dichas hormonas suprimen la producción de proteínas, tales como Proteínas de la Zona Radiata o Zona Pelucida (ZRP o ZP) y VTG, inducen enzimas responsables de la producción de 11 ceto-testostetona (11KT) y promueven la síntesis de progestinas tales como la 17 α ,20 β -Progesterona (17 α ,20 β -P), denominada también hormona inductora de la maduración (MIH), la cual incrementa el pH en el ducto de espermiación y estimula la maduración del esperma (Devlin y Nagahama, 2002).

Los niveles de T son altos durante la espermatogénesis y alcanzan un máximo nivel durante la espermiogénesis, mientras que la 11KT se incrementa con la espermatogénesis sufriendo un pico en la espermiación. El estrógeno junto a IGFs y otros factores de crecimiento actúan como promotores de la multiplicación espermatogonial (Vizziano, 2008).

1.2.5. Desarrollo del ovocito (ovogénesis)

El término ovogénesis hace referencia al desarrollo progresivo de las células germinales por acumulación de material de reserva, que conduce a la formación de óvulos genéticamente aptos para ser fecundados y con una cantidad de reservas suficiente para mantener las primeras fases del desarrollo embrionario. En los últimos años, la mayoría de los autores coinciden en una clasificación de seis estados de desarrollo ovocitario (Lubzens y col. 2010), los cuales se describirán a continuación:

Ovogonias

Las ovogonias experimentan proliferación por divisiones mitóticas al igual que en el desarrollo de la espermatogénesis. El crecimiento primario se caracteriza por la existencia de dos tipos celulares: ovogonias y ovocitos primarios (Valdebenito y col. 2011).

Cromatina nucleolar

Esta etapa de los ovocitos comprende desde leptoteno a paquiteno de la profase I de la meiosis. La principal característica al microscopio óptico es la redistribución de organelos citoplasmáticos y de los cromosomas por todo el núcleo adoptando variadas figuras cromosomales (Valdebenito y col. 2011). Las células somáticas extienden sus prolongaciones celulares separando los ovocitos contiguos y dando origen a la unidad folicular definitiva, con una capa folicular o granulosa y una lámina basal. El tejido conjuntivo vascularizado (teca) rodea entonces a los folículos y más externamente, aparece una capa de epitelio ovárico (Lubzens y col. 2010).

Fase perinucleolar

En esta fase el crecimiento ovocitario y la diferenciación de la pared folicular continúa (Valdebenito y col. 2011). Los ovocitos primarios experimentan una serie de transformaciones que afectan al núcleo, al nucléolo y al citoplasma: el ovocito comienza un período de crecimiento y aparecen múltiples nucléolos que migran hacia el nucleoplasma periférico (estado perinucleolar). Desde este momento el gran núcleo del ovocito será llamado vesícula germinal (Nagahama, 1994).

Alvéolo cortical

Durante esta fase el ovocito incrementa enormemente su volumen (aproximadamente 1000 veces). Se encuentra rodeado por células foliculares de aspecto escamoso (Wallace y Selman, 1990). Una característica importante es la aparición de microvellosidades y corion, la cual en el caso de *Pimephales promelas* es claramente visible hasta en los ovocitos más pequeños (Valdebenito y col. 2011). Se originan alveolos corticales, vesículas más o menos esféricas que se componen de mucopolisacáridos y glicoproteínas, con abundantes residuos de ácido siálico (Carrillo y col. 1993). La formación de estas vesículas se inicia en la periferia del ovoplasma y a medida que el desarrollo progresa van distribuyéndose por todo el

citoplasma contribuyendo a un incremento de tamaño por parte del ovocito (Leino y col. 2005). Los mismos liberan su contenido al espacio perivitelino en el momento de la fecundación, por lo que no se pueden considerar como vitelo, de ahí que la denominación de vesículas vitelinas que tradicionalmente se asignaba a estos alveolos haya sido abandonada (Lubzens y col. 2010).

Vitelogénesis y Zonagénesis

La vitelogénesis y la zonagénesis consisten en la síntesis de las proteínas VTG y ZP, su secreción, transporte por la sangre hacia el ovario y absorción por parte del mismo (Figura 6).

En los meses anteriores a la puesta, se produce un crecimiento drástico del ovario de la mayoría de los teleósteos, un incremento desde menos del 1% hasta un 20% o más en Índice Gonadosomático (IGS – porcentaje de peso gonadal respecto a peso total), dependiendo de la especie. Este crecimiento es debido al cúmulo de grandes reservas nutritivas o vitelo por parte de los ovocitos (Zanuy y Carrillo, 1987). En los animales ovíparos, la acumulación de materiales en la yema de ovocitos durante la ovogénesis y su movilización durante la embriogénesis son procesos fundamentales para la reproducción exitosa. Las proteínas y lípidos de la yema de la mayoría de los ovocitos derivan de la escisión enzimática de precursores como VTG y lipoproteínas de muy baja densidad (Schneider y col. 1996).

Según Katzenellenbogen (1996), la acción de los estrógenos sobre sus receptores en las células hepáticas induce la vitelogénesis. El complejo hormona-receptor modula la transcripción génica mediante la formación de dímeros y su interacción con EREs, ubicados corriente arriba en los promotores o dentro de los genes de respuesta a estrógenos (Katzenellenbogen, 1996). Esto da lugar a la activación de la transcripción de los genes de VTG, con el consiguiente aumento de sus mensajeros.

Además de la inducción directa de la síntesis y secreción de VTG, el estrógeno altera el metabolismo de carbohidratos, estimulando la degradación del glucógeno hepático, aportando glucosa para la oxidación aeróbica en diversos tejidos e incrementando las enzimas metabólicas de la glucólisis (Petersen y col. 1983). El descenso del glucógeno hepático parece estar relacionado, entre otros aspectos, con los requerimientos energéticos para la síntesis de VTG (Korsgaard y Mommsen, 1993).

La VTG es una proteína específica de hembras vertebradas ovíparas (anfibios, aves, peces y reptiles) (Harries y col. 1999). Es un complejo fosfoglicoproteico plasmático, cuyo peso molecular oscila entre 250 y 600 KDa, (Arukwe y Goksoyr, 2003). Tiene la capacidad de unir cationes divalentes como el calcio y su presencia en plasma coincide con la aparición de los primeros gránulos de vitelo en los ovocitos.

La síntesis de la VTG se produce como parte del ciclo normal de reproducción y es controlada a través del eje HPG (Figura 6). Luego de ser secretada por las células hepáticas, es transportada por el torrente sanguíneo y selectivamente secuestrada e incorporada mediante endocitosis por los folículos ováricos en crecimiento (Sumpter y Jobling, 1995). Los receptores específicos para VTG se agrupan en depresiones revestidas de clatrina, que se fusionan con lisosomas en el ovoplasma externo de los ovocitos y forman órganos multivesiculares (Le Menn y col. 2000). Los lisosomas contienen catepsina D, enzima capaz de procesar la VTG dando lugar a lipovitelina y fosvitina, 2 proteínas fosforadas que actúan como

fuente nutritiva durante el desarrollo del embrión (Nilsen y col. 2004). A medida que el ovocito crece los gránulos de vitelo son de mayor tamaño y más numerosos, emigran hacia el interior del ovoplasma y desplazan a los alveolos corticales hacia la periferia (Leino y col. 2005).

Se reconocen en algunas especies de peces más de una forma de VTG que normalmente se identifican como vitelogenina 1 (VTG1) y vitelogenina 2 (VTG2) (Miracle, 2006). Ambas isoformas tienen aproximadamente un 80% de similitud a nivel nucleotídico (Wahli, 1988). Existe una tercer forma de vitelogenina, VTG3, descrita por Wang y colaboradores (2000) en el pez cebra (*Danio rerio*), la cual difiere dramáticamente en su secuencia de las VTG 1 y 2 de otros peces.

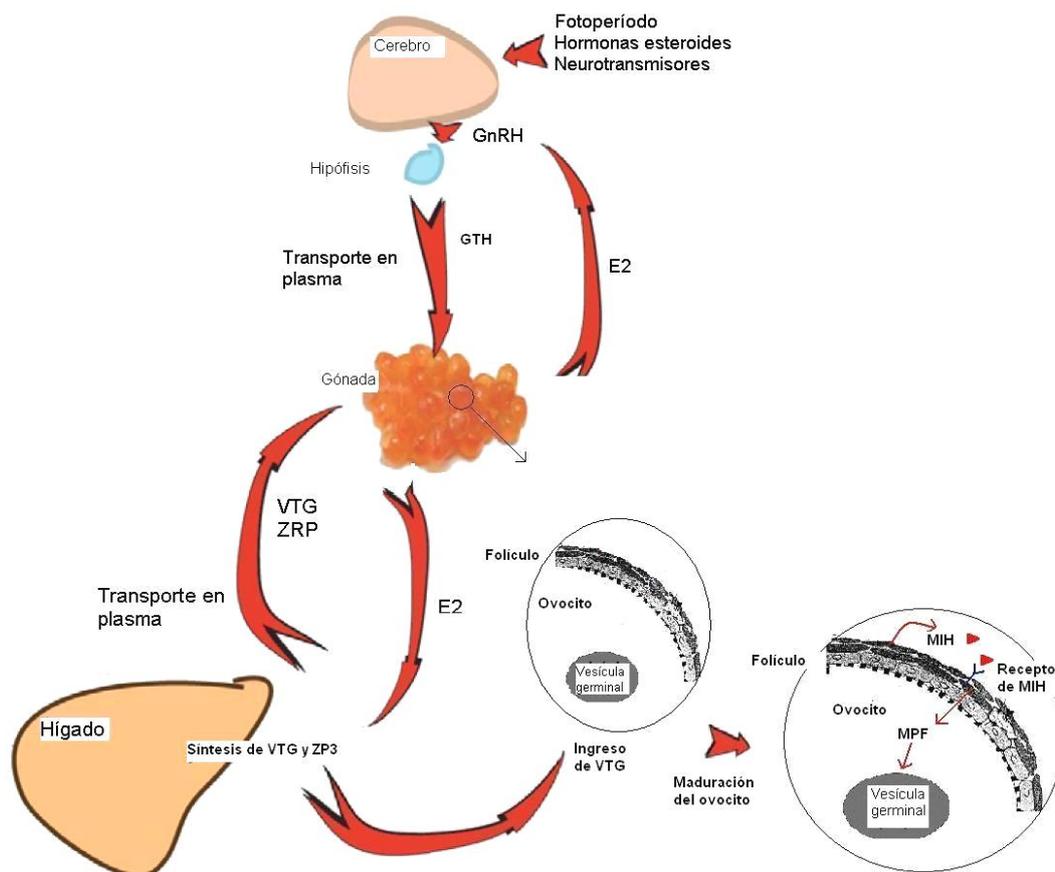


Figura 6. Representación esquemática de la actividad del eje HPG durante la síntesis de proteínas ovogénicas. El eje HPG es regulado a través de la retroalimentación negativa del E₂ (extraído y modificado de Arukwe, 2003)

La envoltura del huevo es una de las principales estructuras determinante de la cáscara de los huevos de los peces, y se define como zona radiata (ZR) por su aspecto estriado al microscopio de luz (Open-Berntsen, 1990) (Figura 7). El recubrimiento que rodea el óvulo cumple un importante rol en los procesos reproductivos y de desarrollo; en primer lugar como una interfaz entre el óvulo y el espermatozoide, y en segundo lugar como una interfaz entre el embrión y su entorno (Grierson y Neville, 1981). Las proteínas ZP sufren un proceso de endurecimiento después de la fecundación, el cual es importante para la prevención de la polispermia, debido a que la cáscara de huevo de peces contiene sólo un estrecho canal o micropilo a través del cual accede el espermatozoide al óvulo. En los peces, la envoltura del

huevo es mucho más gruesa que en los mamíferos, proporcionando protección física del medio y jugando un papel importante en el intercambio de gases (Grierson y Neville, 1981).

Las proteínas ZP de peces consisten en tres o cuatro glicoproteínas claramente conservadas. Contienen un péptido señal en el extremo N terminal con un dominio ZP conservado, un sitio de clivaje y un extremo C terminal hidrofóbico formador del dominio transmembrana (Berois y col. 2011). A pesar de contener un dominio ZP conservado, la ambigüedad en la nomenclatura de dicho grupo de proteínas complica la comparación entre especies, por ejemplo estas proteínas pueden ser denominadas: zona pelucida (ZP), proteínas de la zona radiata (ZRP) y proteínas de la envoltura vitelina (VEP) (Modig y col, 2007). En *Pimephales promelas* la ZP publicada en el "GenBank" es llamada glicoproteína 3 de la Zona Pelucida (ZP3) (Morris y col. 2000), y en *Cyprinus carpio*, perteneciente a la misma familia, es denominada proteína de la membrana del huevo (ZP3) (Chang y col. 1997).

Los sitios de expresión de las proteínas ZP difieren de una especie a otra, por ejemplo en *Rainbow trout* y en *Pimephales promelas* se ha reportado expresión hepática (Hyllner y col. 2001; Klaper y col. 2011), en *Danio rerio* y *Ciprinus carpio* se ha observado expresión solamente ovárica (Wang y Gong, 1999; Mold y col 2001), mientras que en *Medaka* se ha reportado expresión tanto en hígado como ovario (Hyllner y col. 2001). La complejidad es tan grande que la regulación en una misma especie puede diferir, por ejemplo siendo regulada por estrógenos en hígado y no en ovarios (Berois y col. 2011).

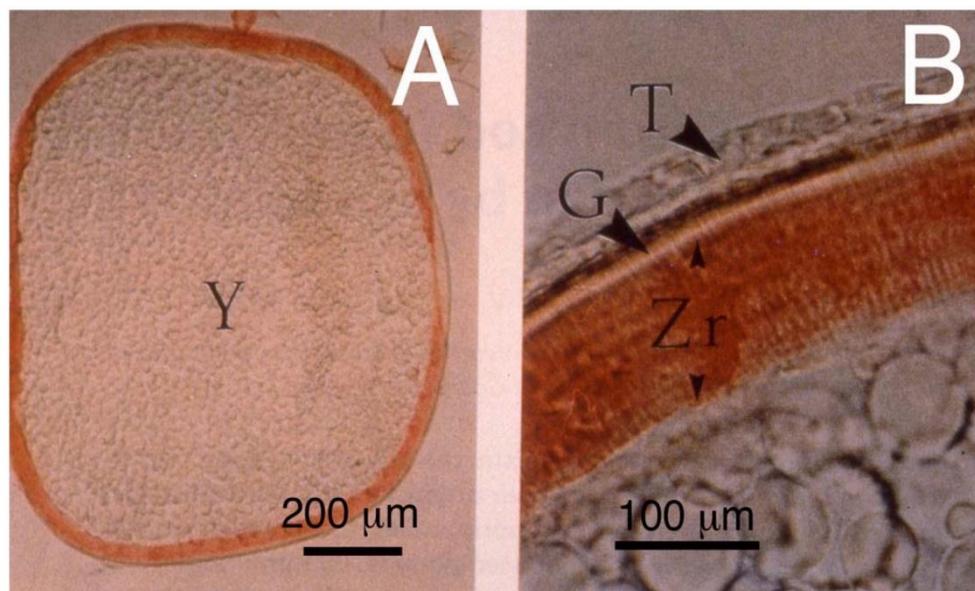


Figura 7. Folículo ovárico de *Gadus morhua* con sonda marcada con anticuerpos anti-ZRP. A. Sección del ovocito, se observan las proteínas de la yema (y). **B.** Corte de una célula folicular en el cual se pueden apreciar las células de la teca (T), Zona pelúcida (Zr) y de la granulosa (G) señaladas con flechas. Extraído y modificado de Aruke y Goksoyr, 2003.

Maduración y ovulación

El proceso de crecimiento de los ovocitos también está regulado por estrógenos, mientras que su maduración está claramente controlada por GTHs y esteroides C21 (Kime , 1995). Generalmente, los niveles de $17\alpha,20\beta$ -DHP y/u otras progestinas se elevan notablemente durante la fase de maduración y puesta en diversas especies. Este hecho ha llevado a que $17\alpha,20\beta$ -DHP sea reconocida como la principal hormona inductora de la maduración (MIH), en salmónidos y en otros teleósteos (Nagahama, 1994).

Esta etapa indica el final de la primera división meiótica y la emisión del primer corpúsculo polar (Nagahama y Yamashitawa, 2008). Luego comienza la meiosis II, la cual se vuelve a detener, esta vez en metafase, hasta que el ovocito es (Valdebenito y col. 2011).

1.3. Disruptores endócrinos

Durante las dos últimas décadas ha aumentado la conciencia mundial en relación con la polución medioambiental. Sobre todo en los últimos años, se ha generado un gran interés en la prensa científica y pública, por los disruptores endócrinos (Endocrine Disrupting Compounds –EDC) (Seki y col. 2002; Colborn y col. 1992). En 1991, en la conferencia de Wingspread (Wisconsin, USA) un grupo de científicos, representantes de más de una docena de disciplinas, concluyó que un gran número de sustancias químicas sintetizadas por el hombre, así como algunas naturales, tienen efecto sobre el sistema endócrino del hombre y los animales, por lo que nació allí el término de disruptores endócrinos (Colborn y col. 1992). Los mismos, fueron definidos por la Agencia de Protección Ambiental (Environment Protection Agency – EPA) como: “agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción y/o eliminación de hormonas naturales responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y crecimiento de seres vivos” (Campbell y col. 2006).

1.3.1. Fuentes de exposición

Muchos EDC son liberados al medio ambiente a través de descargas de aguas residuales, fuentes no puntuales, efluentes industriales, efluentes agrícolas y de la deposición atmosférica de partículas y aerosoles (Monsálves Macaya, 2007).

Entre los EDC de origen natural más importantes se pueden mencionar las feromonas y los fitoestrógenos, como, por ejemplo, isoflavonas y lignanos, presentes en la soja y otras legumbres. Los fitoesteroides son una de las tantas fuentes de contaminación de las industrias de celulosa. Son sustancias con una estructura similar a la del colesterol, lo cual les permite ingresar rápidamente a las rutas metabólicas de organismos expuestos (Monsálves Macaya, 2007).

Entre los EDC artificiales se encuentran: insecticidas (aldrin y paratión), fungicidas (mancozeb, zineb), moluscocidas (tributilestaño) y herbicidas (atrazina, trifluralin). Además, pertenecen a este grupo sustancias de uso cotidiano en el hogar o la industria: alquilfenoles, bifenilospoliclorados (PCBs), ftalatos, bisfenol-A (BPA), estrógenos artificiales como el dietilestilbestrol (DES), 3-benzofenona y contaminantes ambientales como las dioxinas, los furanos y ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Tabla 1) (Soto y col. 1992; Gaido y col. 1997; Kunz y Fent, 2009).

Tabla 1. Grupos de compuestos químicos que actúan como EDC y sus posibles fuentes de exposición.
Extraído y modificado de Olea Serrano, 2001.

Compuesto disruptor endócrino	Fuente de exposición
Pesticidas y organoclorados antiguos (DDT)	Residuo ambiental
Pesticidas y organoclorados nuevos (endosulfán)	Agricultura
Antifúngicos en agricultura (Vinclozolina)	Vino tinto
Alquilfenoles (4-ter-octylfenol, nonilfenol)	Tensioactivos neutros en artículos de limpieza y en ciertos alimentos elaborados
Bifenilospoliclorados (PCBs)	Lubricantes, aisladores y transformadores eléctricos
Bifenilopolibromados (PBBs) y PBDEs	Retardadores de la llama en textiles
Perfluorados (PFOS y PFOA)	Recubrimiento de superficies antiadherentes en sartenes y demás artículos de cocina
BPA-policarbonato	CDs, lentes, plásticos y biberones
BPA-resinas epoxi	Papel y cartón reciclados empleados en envases alimentarios
Ftalatos	Ablandador de plásticos en chupetes y mordedores Artículos de Cosmética
Parabenes	Cosmética
Benzofenonas – Canfenos–Cinamatos	Filtros UV empleados en cosmética

Ingredientes activos de los anticonceptivos orales como el 17 α -etinilestradiol (EE₂) y el DES son considerados compuestos con gran poder estrogénico dentro de los xenoestrógenos, dado que mimetizan el efecto de los estrógenos naturales (Mosher, 2004; Wolfand, 2007). Luego de ser consumidos son excretados en altas concentraciones en orina y eliminados a efluentes municipales y plantas de tratamiento, que en muchos casos no poseen tecnología para remover dichos contaminantes (Wolfand, 2007). La concentración de ambos compuestos en efluentes cloacales, aguas de ríos y arroyos ha ido en aumento, dada su lenta degradación (Verstraeten, 2003; Wolfand, 2007).

Los alquilfenoles polietoxilados (componente de los surfactantes más utilizados a nivel mundial en detergentes, pesticidas y productos industriales) son potentes EDC los cuales son descargados directamente al ambiente o a través de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. La degradación primaria de estos compuestos, en las plantas de tratamiento o en el ambiente, genera cadenas más cortas, de alquilfenoles etoxilados y derivados de ácidos carboxílicos, tales como, nonilfenoles, octilfenoles y alquilfenoles. Se ha demostrado en los

últimos años que los compuestos generados tras la degradación son altamente hidrofóbicos, más tóxicos y persistentes que los originales (Routledge y Sumpter, 1996).

El descubrimiento del nonilfenol como compuesto con acción estrogénica para los mamíferos ha provocado preocupación con respecto a la seguridad medioambiental de una clase importante de surfactantes no iónicos muy utilizados (Routledge y Sumpter, 1996). El nonilfenol es un compuesto estrogénico capaz de actuar como el E₂, pero con una actividad estrogénica 100 veces menor a la del mismo *in vivo*; de todas formas causa inestabilidad genómica y efectos adversos acumulativos. Por esta razón, en los últimos años se han generado biorreactores que utilizan materiales inertes que promueven la formación de biofilm bajo ciertas condiciones de operación (Soares y col. 2005) y son efectivos para la remoción de dicho compuesto de la fase líquida, aunque de todas formas el uso de dicho compuesto y su producción ha sido restringida en la Unión Europea y Canadá (Lavado y col. 2004).

1.3.2. Efectos sobre los seres vivos

Desde mediados del siglo XX numerosas especies muy diferentes entre sí y localizadas en diversas áreas del planeta, están sufriendo alteraciones en su sistema hormonal debido a la exposición a diversos EDC. Por ejemplo, a mediados de los años 60 en Michigan (USA) se reportó que las hembras de visones de los Grandes Lagos no parían o perdían a sus crías al poco tiempo de preñez, el problema se relacionó luego con la presencia de PCBs en los peces con que estas se alimentaban (Istas, 2011).

A finales de los años 80 se descubrió que, solo el 18% de los huevos de caimanes del Lago Apoka de Florida (USA) eran viables, la mitad de las crías morían antes de los 10 días, el 60 % de los machos presentaban penes anormalmente pequeños con caracteres feminizados y las hembras adolescentes presentaban deformaciones en los ovarios siendo su nivel de estrógenos en sangre el doble de lo normal. Al buscar la causa de todo este desequilibrio se detectó que 10 años antes una fábrica de la zona había realizado un vertido de los plaguicidas dicofol y DDT al lago (Istas, 2011).

En el año 2004 se detectó la muerte masiva de cisnes de cuello negro en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" en Valdivia (Chile), la población de cisnes disminuyó desde seis mil a unos cientos. El efecto fue adjudicado a la descarga de residuos líquidos industriales mal tratados de una planta de pulpa de celulosa ubicada río arriba en el Río Cruces (Comunicaciones, Corporación Olca, Octubre 2004)

Las grandes o prolongadas exposiciones a EDC se ha sugerido que tienen incidencia sobre la vida humana causando efectos adversos, en mujeres pueden promover el desarrollo de cáncer de mama y endometritis, en hombres cáncer de testículos y de próstata, además de reducción del número de espermatozoides y calidad de esperma. Por otro lado, pueden provocar aumento de muertes embrionarias y de malformaciones (Pawlowski y col. 2004), incidir negativamente en el descenso testicular en niños, provocar deformaciones en órganos reproductores, bajo peso de nacimiento, dificultades de aprendizaje e hiperactividad (Argemi y col. 2005).

En los animales silvestres las posibles alteraciones reproductivas se evidencian como alteración de los caracteres sexuales propios de cada sexo, por ejemplo procesos de feminización en machos (Figura 8), masculinización en hembras u organismos sexualmente indiferenciados, denominados intersexo (Argemi y col. 2005). Por ejemplo, a mediados de 1990 se documentó la presencia de peces machos feminizados en ríos en los cuales se descartaban efluentes de plantas de tratamiento municipal, asociándose de esta forma el efecto observado con la presencia de sustancias estrogénicas y químicos de industrias (Routledge y Sumpter, 1998; Ista, 2011). Por otro lado, en lugares donde se produce la descarga de efluentes de industrias de pulpa de celulosa y papel se han observado efectos tanto de feminización de machos, como de masculinización de hembras e intersexualidad (Bortone y Davis, 1994). La importancia ecológica de dichos cambios consiste en la pérdida de la competencia reproductiva, y con ello, el cambio en el tamaño corporal, así como, en la estructura y la integridad genética de la población (Larsson y col. 2006).



Figura 8. Fotografía de tres machos de *Pimephales promelas* con caracteres sexuales modificados. El primero a la izquierda macho control, el siguiente expuesto a 2 nM de E₂ y el último a la derecha expuesto a 10 nM de E₂. En los dos ejemplares de la derecha se puede observar la atrofia de los tubérculos nupciales respecto a los prominentes tubérculos del macho control. Extraído de Miles-Richardson y col. 1999.

1.3.3. Mecanismos de acción

Los disruptores endócrinos pueden modificar el nivel de esteroides endógenos, en particular la síntesis, el metabolismo y la distribución de los mismos, alterar la respuesta de ciertos tejidos frente a esteroides modificando los niveles de sus receptores, actuar por un camino secundario y modificar el funcionamiento de los receptores, o competir con los ligandos endógenos e interactuar con los receptores esteroideos comportándose como si fueran hormonas esteroideas. La unión de estos compuestos a receptores esteroideos interfiere con la reacción hormona receptor, puede bloquearla o generar una reacción más potente o más débil que la normal y en el momento inadecuado (Figura 9) (Wolfand, 2007; Gaido y col. 1997).

Los EDC pueden tener efectos de tipo androgénico (BPA, dioxinas, ftalatos), antiandrogénico (vinclozolin, BPC), estrogénico (nonilfenol, E₂) o antiestrogénico (aldrín, dieldrín) sobre los organismos (Sato y col. 2001). Producen su efecto a concentraciones extremadamente bajas (Gaido y col. 1997), dado que poseen la capacidad de interactuar con

los receptores directamente (Birkett y Lester, 2003). El período de latencia entre la exposición y la aparición de efectos observables es variable, pudiendo ser muy largo, inclusive de décadas en casos de exposición fetal (Istas, 2011).

En general, los EDC son sustancias lipofílicas, su afinidad por las grasas posibilita que sean bioacumulados en el tejido adiposo, por lo que persisten y pueden transmitirse en la trama trófica. Como tales, suelen encontrarse en alimentos ricos en grasas, en particular aquellos elaborados a partir de grasas animales recicladas (Olea Serrano, 2001). La bioacumulación de sustancias estrogénicas puede llegar a ser hasta 40.000 veces respecto a la concentración inicial antes de provocar efectos en peces o aves (Tyler y col. 2004).

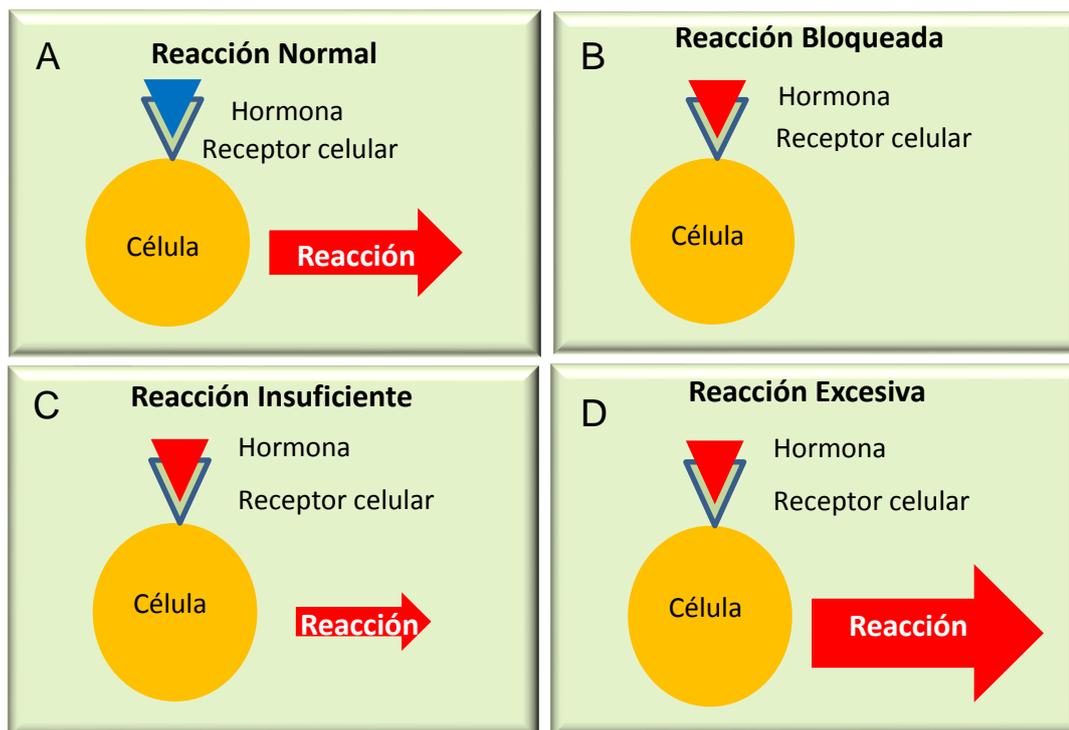


Figura 9. Efecto de los EDCs sobre los receptores esteroideos. **A.** En una situación normal, la hormona se une al receptor celular que desencadena la reacción esperada, al nivel esperado. **B.** Al mimetizar a la hormona natural el disruptor endocrino puede unirse al receptor e interferir en la reacción, bloqueándola. **C.** Los disruptores endocrinos también pueden unirse al receptor y generar una reacción más débil de la normal y en el momento inadecuado. **D.** Los disruptores endocrinos pueden unirse al receptor y generar una reacción más potente de la normal y en el momento inadecuado. Extraída y modificada de Wolfand, 2007.

La mayoría de estos EDCs poseen pequeñas similitudes estructurales con hormonas naturales. De todas formas es prácticamente imposible determinar si un compuesto se comportará como tal a partir de la sola comparación de estructuras químicas. Por el contrario la habilidad de las sustancias de comportarse como un disruptor es encontrada la mayoría de las veces accidentalmente (Soto y col. 1992).

1.3.4. Detección de compuestos disruptores endócrinos

Los grados de exposición de seres humanos y poblaciones de fauna a EDC y la reducción de incertidumbres en la valoración de riesgo de exposición han sido el enfoque mayor de investigación en el tema en la última década (Swan y col. 2003).

El desafío planteado por los EDC ha impuesto la necesidad de incluir nuevos test toxicológicos y nuevos objetivos de investigación, haciendo énfasis en la homeostasis y funcionalidad de los sistemas hormonales, en el desarrollo y el crecimiento de las especies en las etapas de mayor riesgo: embrionaria, embarazo e infancia (Monsálvez Macaya, 2007).

Existen actualmente técnicas de análisis químicos para detectar con gran sensibilidad la presencia de estrógenos naturales y sintéticos, como la espectrometría (UV, visible, IR) y cromatografía (CGMS, HPLC) (Monsálvez Macaya, 2007). Sin embargo, estas técnicas son muy complejas y de alto costo operacional, además la sola confianza en ensayos químicos puede llevar a la caracterización inexacta de la exposición medioambiental. Esto resulta del hecho que estos ensayos no pueden usarse para cuantificar compuestos desconocidos, además de ser incapaces de determinar las interacciones entre los diferentes contaminantes, lo cual puede sobreestimar o subestimar el valor de los estrógenos o andrógenos en una muestra de composición desconocida (Biales y col. 2007). Los ensayos químicos no pueden considerar los efectos sinérgicos ni aditivos de los diferentes compuestos, ni tampoco diferenciar estructuralmente los mismos para determinar si tienen posible efecto disruptor o no (Pawlowski y col. 2004).

En contraste con los análisis químicos los ensayos basados en bioindicadores responden a cualquier fuente disruptora, no sólo distinguen activadores xenobióticos capaces de unirse a receptores celulares, sino también a aquéllos que pueden estimular indirectamente eventos intracelulares (Biales y col. 2007).

- *Bioensayos con peces para detectar compuestos disruptores endócrinos*

Los primeros ensayos de toxicidad realizados con peces fueron exposiciones a corto plazo (96-h), donde la letalidad era la principal variable observada (Nagahama, 1994). Dichos ensayos se centraban en la supervivencia y el desarrollo temprano. Debido a la deficiencia con respecto a la capacidad de evaluar efectos sobre reproducción, fecundidad y viabilidad de las siguientes generaciones se comenzó a prestar mayor atención a las exposiciones crónicas y subletales (Tyler y Sumpter, 1996).

Se han publicado modificaciones durante exposiciones crónicas en ciertos puntos finales como por ejemplo: supervivencia, fecundidad (producción de huevos), fecundación (porcentaje viable de los huevos), porcentaje de nacimientos, aspecto de las larvas, supervivencia de las mismas, apariencia de los adultos expuestos (color particular y características secundarias propias del sexo), condición gonadal medida mediante el IGS (Ankley y col. 2001; EPA, 2002).

Finalmente, en algunos trabajos se ha determinado el factor de condición (KF), el cual consiste en la relación entre el peso y el largo al cubo y refleja el grado de adaptabilidad del organismo al medio, en términos de un adecuado balance energético entre las necesidades fisiológicas y el incremento de la biomasa corporal. Se cree que la exposición a estresores naturales o artificiales provoca cambios en el almacenamiento y transferencia de lípidos y proteínas tendientes a contrarrestar el efecto del estresor en desmedro del aumento del peso corporal (González y Oyarzún, 2002).

- Proteínas y genes bioindicadores

El uso de proteínas y genes como bioindicadores de exposición permite la medida inmediata del potencial estrogénico acumulado en los sistemas acuáticos y la evaluación no solo de compuestos estrogénicos conocidos, sino también de mezclas complejas (Lattier y col. 2002).

Durante el desarrollo del ovocito la incorporación de las proteínas ovogénicas es la causa principal del crecimiento de los mismos y uno de los indicadores más sensibles a cambios del medio ambiente endócrino y exposición a productos químicos. Una medida indirecta de la alteración de la síntesis hepática y gonadal de proteínas es la variación del Índice Hepato-Somático (IHS - porcentaje de peso hepático respecto a peso total) y del IGS respectivamente (Kime, 1995). Mientras que una cuantificación directa de estas alteraciones se puede obtener a partir de la determinación de la concentración de proteínas ovogénicas o de la expresión de ARNm codificante para las mismas en plasma o hígado (Kime, 1995).

Los xenoestrógenos o andrógenos aromatizables han sido descritos como capaces de provocar la producción de VTG y ZP3 en hígados de machos y hembras inmaduras de ciertos peces como *Kriptolebias marmoratus* (Rhee y col. 2009). De esta forma afectan la salud de machos e inducen en hembras la síntesis de VTG y proteínas ZP fuera del período normal de maduración, pudiendo resultar en el despilfarro de los recursos de energía almacenada. Individualmente, la síntesis proteica descontrolada puede causar insuficiencia renal y aumento de las tasas de mortalidad como consecuencia del estrés metabólico. Las implicancias ecológicas serían el fracaso en la reproducción de los peces afectados y a largo plazo de toda la población (Rhee y col. 2009).

Los efluentes sospechosos de contener compuestos estrogénicamente activos, como por ejemplo efluentes del tratamiento de alcantarillado (Jobling y col. 1998), de planta de tratamiento municipal (Panter y col. 1998), de planta de pulpa de celulosa (Werner y col. 2010) y de refinerías de aceites (Le Guellec y col. 1998) se han usado para estudiar la actividad hormonal y analizar experimentalmente la transcripción de ciertos genes y la subsiguiente acumulación de las proteínas correspondientes. Por ejemplo, se han detectado en hígados, de peces de ambos sexos expuestos a dichos efluentes, proteínas y ARNm de VTG y proteínas ZP, indetectables en hembras inmaduras y en machos en condiciones normales debido a que el estrógeno circulante es insuficiente para inducir su síntesis (Mellanen y col. 1999).

Algunos investigadores afirman que los cambios inducidos en la síntesis de ZP poseen un mayor potencial de efectos adversos en la ecología que los cambios sobre VTG, ya que pequeños cambios en la síntesis de ZP puede causar que el grosor y la resistencia mecánica

de la envoltura vitelina sea alterada, provocando pérdida en su capacidad la protección del embrión durante el desarrollo (Arukwe y Goksoyr, 2003).

Al estudiar los disruptores endócrinos, la mayoría de las investigaciones hasta la fecha se han centrado en la modificación de proteínas ovogénicas, la acción y la función de esteroides sexuales y en menor medida se han estudiado los efectos sobre los ejes endócrinos, analizando por ejemplo GH, IGF-I, TSH y los ejes de corticosteroides que también son objetivos de las alteraciones endócrinas (Filby y Tyler, 2007^B).

Filby y Tyler (2007), propusieron la expresión de GHR e IGF-I en hígado como posibles indicadores de la presencia de disrupción en peces, debido a las variaciones de expresión observadas a lo largo del desarrollo en la especie *P. promelas*. En condiciones normales, el dimorfismo sexual de GHR e IGF-I hepática en *P. promelas* es evidente sólo a partir de los 120 días de vida, coincidiendo con el período de mayor divergencia en las tasas de tamaño y crecimiento entre los sexos. Los niveles elevados de GHR e IGF-I hepática en los machos durante este tiempo promueven el rápido crecimiento somático (Beckman y col. 2004). Mientras que los niveles bajos de IGF-I en las hembras redireccionan la energía metabólica del crecimiento somático al crecimiento del ovario, respondiendo a los efectos que el estrógeno produce en el hígado y la posterior síntesis de proteínas ovogénicas en las gónadas (Filby y Tyler, 2007; Campbell y col. 2006).

Los diferentes subtipos de ESRs también han sido propuestos como indicadores de disrupción endócrina, dado que los estrógenos son inductores de sus propios receptores. Según Filby (2005) los subtipos ESR1 y ESR2 tienen diferencias en su composición bioquímica y estructural, lo que indica que poseen diferentes características funcionales, patrones de expresión e inducibilidad por E₂. Según lo describe Filby en 2005 los estrógenos inducen el incremento de la expresión de sus receptores tipo 1, pero no de los tipos 2, los cuales en general no modifican su expresión o la disminuyen frente al mismo.

Las funciones de ESR2 no se conocen muy bien hasta el día de hoy (Filby y Tyler, 2005). La regulación al alza en testículo de ESR2, pero no de ESR1 en el período de diferenciación testicular implica que los subtipos ESR2 pueden desempeñar el papel principal en el desarrollo testicular y la espermatogénesis en los peces. Debido a ello se ha relacionado más a ESR2 con el receptor de andrógenos (Naderi y Hughes, 2008), y se ha descrito que el mismo responde y aumenta su expresión en las mismas condiciones que este último. Ha sido utilizado en las últimas investigaciones en muchos casos como bioindicador de androgenicidad junto a receptor de andrógenos (Werner y col. 2010).

- Biosensor–*Saccharomyces cerevisiae* recombinante

Una técnica efectiva para determinar la estrogenicidad en diferentes tipos de matrices ha sido el uso de biosensores, la ventaja de estos es la capacidad de estimar el efecto acumulativo de diversos EDC en una misma muestra (Campbell y col. 2006). De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor define un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito, produce una señal discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo (Keel y col. 2010).

Para la detección de EDC se utilizan *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, una levadura modificada genéticamente, con el objetivo de otorgarle la capacidad de detectar el potencial estrogénico de compuestos con actividad hormonal, por medio de respuestas colorimétricas. La técnica lleva el nombre de YES (Yeast Estrogen Screen) (Routledge, 2006). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo considerado como modelo simple de célula eucariótica y su genoma está totalmente secuenciado. Para transformarlo en un biosensor se lo modifica específicamente, con la inserción de la secuencia de ADN codificante del receptor estrogénico humano (hER- α) en el cromosoma propio de la levadura (Roda, 2006), y un plásmido que lleva un gen reportero (Lac-Z), el cual codifica para la enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda del promotor transcripcional que contiene elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y de un promotor fuerte (PGk) (Monsálvez Macaya, 2007).

El receptor de estrógenos humanos es expresado en la levadura de forma que en presencia de estrógenos es capaz de unirse a EREs ubicados en el promotor del plásmido reportero de expresión (Figura 10). Un contaminante estrogénico se une al receptor hormonal transformándolo en un receptor activo. Luego dicho receptor interacciona con el ERE, modulando así positivamente la transcripción del gen reportero *Lac Z* y con ello de la producción de la enzima B galactosidasa, la cual es secretada al medio. Esta última puede metabolizar un sustrato cromogénico por medio del cual puede ser cuantificada (Xie y col. 2004).

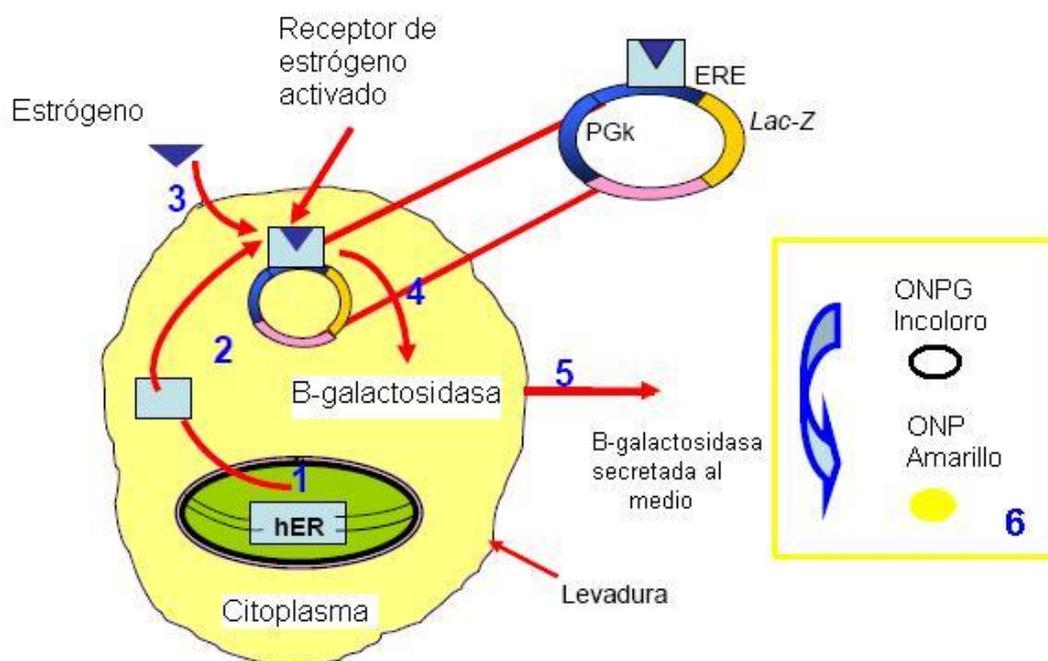


Figura 10. *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente mediante la incorporación de un hER en su genoma. Los receptores de estrógenos humanos integrados dentro del genoma de la levadura, son expresados de forma que son capaces de unirse a ERE (1). Estas secuencias están ubicadas en el promotor del plásmido de expresión (2). La presencia de un contaminante con potencial estrogénico es detectada por el sistema ya que el contaminante se une al receptor hormonal y este se transforma en un receptor activo (3). El receptor activo interacciona con el elemento ERE, modulando así positivamente la transcripción génica. Esto provoca la expresión del gen reportero *Lac Z* (4) y la producción de la enzima B galactosidasa, la cual es secretada al medio (5). Esta última puede metabolizar sustratos cromogénicos como: Rojo Clorofenol β -D-Galactopiranosido (CPRG), produciendo un viraje de color de amarillo a rojo, u O-Nitrofenol- β -D-Galactopyranosidp (ONPG) el cual es hidrolizado a O-Nitrofenol (ONP) y galactosa en una solución alcalina, observándose un viraje de incoloro a amarillo debido a la presencia de ONP. Extraído y modificado de Xie y COL. 2004.

En el presente trabajo se propuso evaluar la presencia de compuestos disruptores endócrinos en el Arroyo Fray Bentos, el cual recibe el efluente municipal de dicha ciudad y en un efluente industrial proveniente de una planta de pulpa de celulosa, mediante la exposición de *Pimephales promelas* y la posterior evaluación de la expresión proteica de VTG y de la expresión de los ARNm de VTG, ZP3, y de genes de los ejes endócrinos como IGF-I y GHR y de dos tipos de ESR (ESR1 y 2) en células hepáticas de peces expuestos.

Se seleccionó trabajar con *Pimephales promelas*, no solo por ser referencia a nivel mundial en bioensayos, sino también porque desde el año 2007 el Departamento de Aguas y Productos Químicos (PQAR) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), lugar donde se realizó el presente trabajo, se han venido realizando bioensayos de toxicidad aguda y crónica con dicha especie.

El interés que llevó a seleccionar estas muestras fue, en el primer caso, evaluar los efectos de los efluentes municipales sobre las corrientes acuáticas y las consecuencias que ello puede acarrear sobre la vida acuática, y en el segundo caso por el gran desarrollo de la industria papelera que se está dando en el país en estos últimos años y la incertidumbre que existe en cuanto a sus efluentes y sus nuevas tecnologías de tratamiento de los mismos.

Se conoce que ambas muestras a analizar tienen una composición muy compleja. De todas formas, se espera que el efecto del agua de arroyo sobre *Pimephales promelas* sea similar al provocado por el estradiol, debido al aporte del efluente cloacal de la ciudad de Fray Bentos a dicho arroyo, el cual debe contener: estradiol proveniente del consumo de anticonceptivos y su eliminación en la orina, sustancias agonistas de estrógenos derivados de deshechos de pequeñas industrias, y de detergentes de uso cotidiano en los hogares.

Por el contrario, se sospecha que el efluente de planta de pulpa de celulosa puede provocar efectos variables. Su composición es muy diversa, posee sustancias orgánicas agonistas de estrógenos provenientes de fenoles, resinas, fitoestrógenos, etc. Pero se debe tener en cuenta que en la bibliografía se han encontrado resultados muy diversos y dependientes de la tecnología utilizada en la planta y en el tratamiento de los efluentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la presencia de efectos de disrupción endócrina en 2 muestras: agua del Arroyo Fray Bentos el cual recibe el efluente municipal de dicha ciudad, y efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario ubicada en las cercanías de esta ciudad. Establecer mediante bioensayos sus efectos sobre la expresión de varios genes relacionados con la regulación endócrina en peces *Pimephales promelas* expuestos a dichos efluentes.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar ensayos de exposición con *P. promelas* a muestras de Arroyo Fray Bentos, efluente industrial y dos concentraciones conocidas de 17 β -Estradiol (E₂).
- Comparar la puesta de huevos y las características anatómicas de *P. promelas* expuestos con sus respectivos controles negativos con agua de cultivo.
- Estudiar los niveles de proteína VTG en hígados de *P. promelas* expuestos y controles por cuantificación mediante un Kit ELISA específico.
- Analizar la expresión de ARNm de los genes *VTG*, *ZP3*, *ESR1*, *ESR2*, *GHR* e *IGF-I* en peces *P. promelas* expuestos y controles, por medio de PCR en tiempo real a partir de ARN total de hígado.
- Poner a punto el biosensor *Saccharomyces cerevisiae* recombinante modificado con el receptor de estrógenos humano y utilizarlo para estudiar la presencia de actividad estrogénica en las muestras de interés.

3. METODOLOGÍA

3.1. Extracción de las muestras

Las muestras analizadas fueron:

- agua proveniente del Arroyo Fray Bentos, zona de mezcla de agua natural con efluente cloacal de la ciudad de Fray Bentos.
- efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario de una industria de la ciudad de Fray Bentos.

Ambos muestreos fueron realizados por técnicos del LATU. En el primer caso se realizó una toma directa enjuagando previamente los envases con la misma muestra. Para la toma del efluente industrial se instaló el muestreador automático portátil refrigerado ISCO Avalanche, en el canal de vertido final, a la salida del segundo clarificador. Se observó el caudal de agua y se eligió el mejor punto para ubicar la succión del mencionado equipo (donde se generan la menor turbulencia y espuma). Se tomó un ciclo continuo de 2 minutos como toma para enjuague de los envases con el propio efluente. Posteriormente se inició el programa de muestreo y la colecta de muestras. El tipo de muestra fue continua con 1 minuto de pausa automática entre los envases. El volumen final tomado de ambas muestras fue de 150 litros en envases de 10 litros.

3.2. Ensayo de exposición con *Pimephales promelas*

3.2.1. Procedimiento del bioensayo

Los peces *Pimephales promelas* que se utilizaron fueron criados en el laboratorio de Aguas y Productos Químicos del LATU, de acuerdo al protocolo para calidad de agua reconstituida y cultivo de peces (EPA/600/S3-87/001 1988). Los ejemplares fueron adultos (>6 meses de edad) y estuvieron previamente aclimatados durante una semana a los acuarios experimentales, los cuales poseían las siguientes condiciones: volumen de agua 8 L en acuarios de 10 L, $T(^{\circ}\text{C})=25\pm 2$, $\text{pH}=7,0-8,0$, fotoperíodo controlado 16D:8N y calidad de agua según protocolo (EPA/600/S3-87/001 1988, EPA-D-06-096 1996). En cada acuario experimental se colocaron 2 machos y 4 hembras y se les instalaron 2 sustratos de oviposición (Figura 11). Los peces seleccionados fueron de similar tamaño dentro del mismo sexo.



Figura 11. Acuarios en que se realizaron los ensayos de exposición. En ellos se pueden ver los sustratos de oviposición. Imagen obtenida en el laboratorio de Aguas y Productos Químicos del LATU.

Los peces *P. promelas* fueron expuestos durante 21 días a una muestra de agua proveniente del Arroyo Fray Bentos y a una muestra de un efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario de una planta cercana a dicha ciudad.

Se realizaron además dos ensayos control positivo de exposición a concentraciones conocidas de una sustancia estrogénica. Dentro de las sustancias estrogénicas naturales más frecuentemente descubiertas en los efluentes tanto municipales como industriales se encuentra el 17- β -estradiol (E_2) (Lerner y col. 2007), es por ello que el mismo fue el seleccionado para la realización de dichos controles. Las concentraciones que se utilizaron fueron 150 y 450 ng/l de E_2 (material certificado, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania). El E_2 se adicionó mediante el agregado de una solución acuosa del mismo al agua reconstituida, lo cual asegura que no se usen solventes que causen toxicidad (Arukwe y Goksoyr, 2003).

Se llevaron a cabo 4 ensayos, uno por cada muestra. Cada uno de ellos se realizó en lotes control negativo con agua de cultivo ($n = 3$) y lotes tratados con las muestras ($n = 3$). En total se utilizaron 36 peces por cada ensayo, 18 para lotes control y 18 para lotes tratados (Figura 12). La alimentación de los peces continuó igual a la etapa de cría, *Artemia salina* una vez al día (en la mañana) y escamas para peces tropicales Tetramin® dos veces al día (mediodía y tarde). Se renovó el 90% del agua correspondiente cada 48 horas en cada pecera y diariamente se limpió el fondo del acuario para mantener las condiciones del agua. Los acuarios experimentales fueron aireados durante todo el ensayo.

Durante el período de exposición se evaluó la mortalidad, el estado físico de los peces y la puesta diaria de huevos (fecundidad). En caso de que en el período de aclimatación los peces desarrollasen enfermedades y/o muerte los mismos eran descartados y no se utilizaban para el desarrollo del bioensayo.

Una vez finalizado el bioensayo, los peces se pesaron en balanza con precisión de 1 mg y se midió el largo de cada uno de ellos con calibre, luego se sacrificaron por incisión cervical siguiendo la guía normalizada de cuidados de laboratorio (UFAW, 2010) avalada por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Se extrajeron los hígados para realizar los presentes ensayos y otros órganos como cerebro, gónadas y músculos para otros equipos de trabajo. De cada pecera se extrajeron, 2 hígados de hembra y 1 de macho para posterior análisis de proteína vitelogenina (VTG) y 2 hígados de hembras y 1 de macho para análisis de expresión de niveles de ARNm mediante PCR en tiempo real.

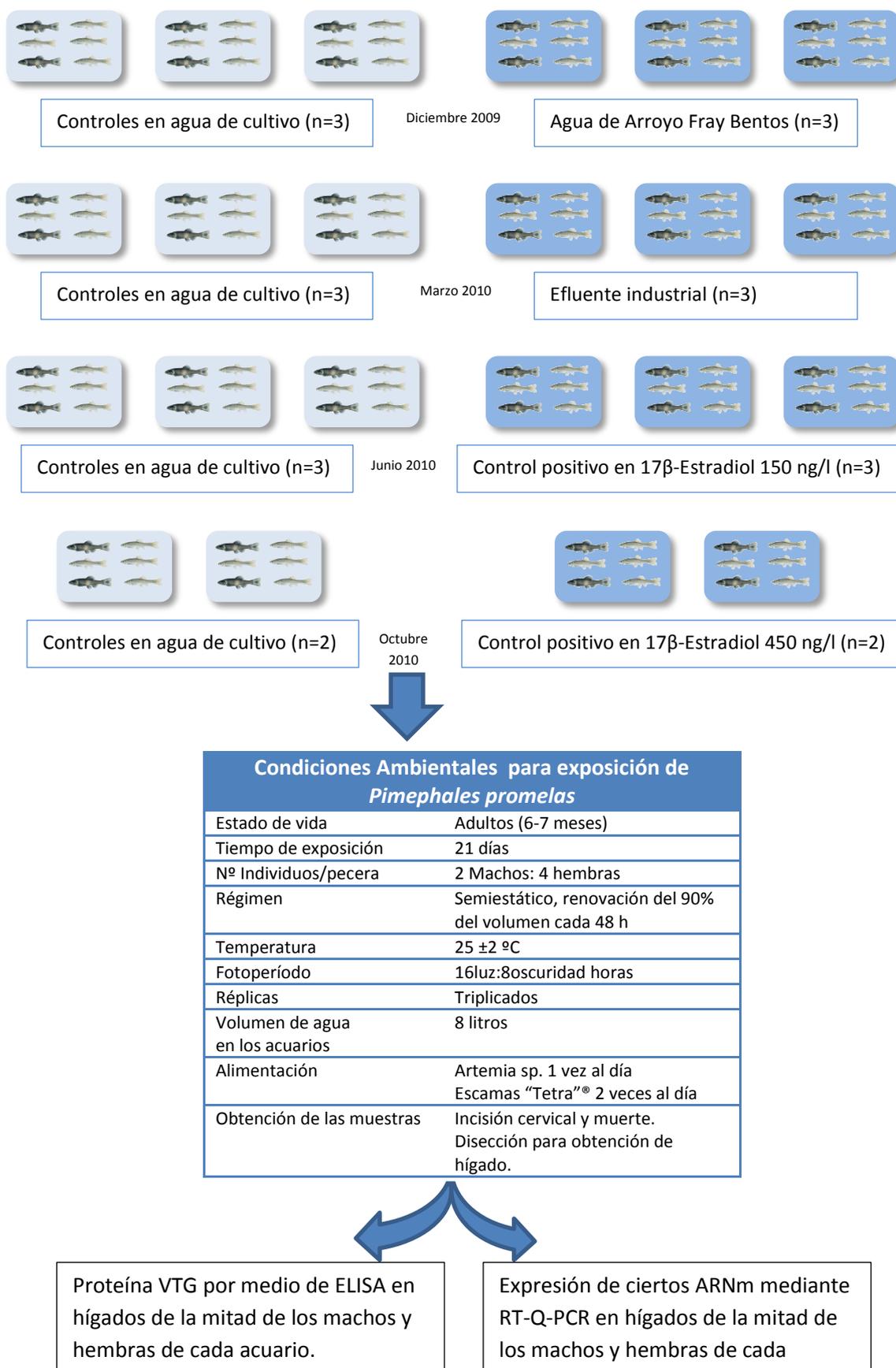


Figura 12. Esquema de las condiciones ambientales y diseño de los ensayos de exposición con *Pimephales promelas*. Los cuatro ensayos se llevaron a cabo por separado, en cada uno de ellos se realizaron lotes control (n=3) y lotes tratados (n=3) excepto para el caso de 450 ng/l de E₂ (n=2).

3.2.2. Cálculos y tratamiento estadístico

Con el fin de observar el grado de adaptabilidad del organismo al medio, en términos de un adecuado balance energético entre las necesidades fisiológicas y el incremento de la biomasa corporal se calculó el factor de condición (KF), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$KF = \left(\frac{\text{peso}(g)}{\text{largo}^3(\text{cm}^3)} \right) \times 100$$

A fin de estudiar en forma general alteraciones gonadales, se calculó a partir de los valores de los pesos gonadales y los pesos totales el Índice Gónado-Somático (IGS).

$$IGS = \frac{\text{pesogónada}}{\text{pesototal}} \times 100$$

En el análisis estadístico de todas las características físicas tales como: peso, largo, KF, peso de hemigónadas e IGS, se verificó ausencia de datos atípicos y se realizó un test de normalidad (Shapiro Wilks) para cada conjunto de datos. En caso que la distribución fuese normal se realizó un test de F con el fin de confirmar si las desviaciones típicas eran comparables, en caso afirmativo se realizó test de T. Si la distribución de los datos no era normal o las desviaciones típicas eran diferentes entre sí se aplicó el test Mann-Whitney Wilcoxon o test de medianas.

El análisis estadístico de la puesta de huevos se realizó mediante la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov, de acuerdo a lo realizado por Thorpe y col. (2007). Todo el tratamiento estadístico se llevó a cabo en el programa Stagraphics Plus considerando un nivel de significación (α) de 0,05.

3.3. Quantificación de vitelogenina mediante ELISA

Varios métodos han sido utilizados para evaluar indirectamente VTG plasmática en *P. promelas*, entre ellos las mediciones de fósforo alcalino-lábil, fosfoproteínas con pesos moleculares similar al de VTG y concentración de calcio. Además se han realizado determinaciones directas de la proteína a través de espectrometría de masas (Van Veld y col. 2005).

En investigaciones actuales similares a ésta han realizado la evaluación de VTG a través del ensayo de inmunoabsorción vinculado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays - ELISA), basado ya sea en anticuerpos anti-VTG heterólogos u homólogos (Jensen y Anckley, 2006). Es una técnica sensible, ampliamente utilizada para detectar y cuantificar

antígenos o anticuerpos en una variedad de muestras biológicas, no requiere técnicas avanzadas, ni conocimientos especializados. Los dos tipos de ELISA más usados son el ELISA de captura o tipo sándwich y el de competición (Arukwe y Goksoyr, 2003). En el presente caso se seleccionó el primer tipo de ELISA debido a que la experiencia actual de distintos laboratorios demostraba que este era el más robusto y reproducible en el rango de trabajo (Scott y col. 2006).

En la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía se analizaron los niveles de proteína VTG en plasma, pero fue descrito que dicha medida posee algunas desventajas, como por ejemplo, que la VTG desaparece rápidamente del plasma en hembras por su pasaje a ovarios y se ve altamente aumentada en machos debido a su acumulación, obteniendo subestimaciones o sobreestimaciones de la misma (Ho Yoon y col. 2008). Debido a ello se determinó la VTG en el hígado, lugar de síntesis, en ambos sexos.

3.3.1. Reactivos

- *Ácido Sulfúrico 0,3M*

Se colocó en 50 ml de agua ultrapura 1,7 ml de ácido sulfúrico (96% pureza, Carlo Erba) y se llevó a 100 ml de volumen final con agua ultrapura (resistividad >18MΩ), equipo de purificación de agua Milipore Simplicity 185.

- *Componentes del Kit "Fathead minnow vitellogenin ELISA kit" (Biosense)*

- *Buffer de dilución:* se diluyeron 15 ml del buffer de dilución 5X del kit en 60 ml de agua, esta solución es estable por 7 días si se almacena en heladera.
- *Buffer de lavado:* la tableta de buffer de lavado que contiene el kit se disolvió en agua a un volumen final 1 L, dicha solución es estable por un mes almacenada a 4°C.
- *Solución de anticuerpo monoclonal Anti VTG:* se diluyeron 24 µl de anticuerpo de detección en 12 ml de buffer de dilución en el momento de realizar el ensayo.
- *Solución Stock de Vitelogenina:* se resuspendió la proteína liofilizada que contiene el kit en 1 ml de buffer de dilución (5 µg/ml).
- *Solución intermedia de Vitelogenina:* se realizó tomando 50 µl de la solución stock y agregándole 4,95 ml de buffer de dilución (50 ng/ml).

3.3.2. Tratamiento previo de muestras

Las muestras analizadas fueron homogenizados de hígados extraídos de *P. promelas* expuestos a agua de arroyo, efluente industrial, E₂ (150 y 450 ng/l) y sus controles negativos

correspondientes. Cada hígado (con un peso aproximado 80-100 mg) se colocó en 0,5 ml de buffer de lavado de ELISA con el agregado de 1% de Sero Albúmina Bovina (BSA) (Amresco, Ohio, USA) y 2 TIU/ml de Aprotinina (Amresco, Ohio, USA.), homogeneizando dicha solución con un homogeneizador de mano. Luego se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos para eliminar restos de tejidos (Centrifuga, Spectrafuge, Labnet Internacional 24D, USA), se extrajeron los sobrenadantes a un tubo limpio y se almacenaron en el freezer a -80°C hasta la realización del ensayo.

Una desventaja citada en la bibliografía a la hora de utilizar VTG como marcador es que el rango dinámico de concentraciones encontradas puede variar millones de veces, desde nanogramos en machos hasta miligramos en hembras o machos expuestos a un estrógeno (Tyler y Van Aerle, 2002). Para poder cuantificar este enorme rango en las muestras de forma ciega, el campo de trabajo del ensayo debe ser lo más amplio posible.

Debido a ello la totalidad las muestras fueron diluidas en serie por lo menos 3 veces para asegurar que al menos una dilución coincida con el rango de trabajo, según lo realizado por Arukwe y Goksoyr en 2003. A los homogeneizados de hígados se le realizaron las siguientes diluciones: 1/500, 1/1.000 y 1/5.000 para los correspondientes a machos y 1/5.000, 1/10.000 y 1/20.000 para los correspondientes a hembras. Luego de realizado el ensayo con dichas diluciones se repitió por triplicado para aquellas en las cuales se obtuvieron resultados de absorbancias dentro del rango de la curva de calibración.

3.3.3. Desarrollo del método

Se prepararon los pocillos de la placa según se indica en la Figura 13, con un volumen final de 100 µl, determinando posición de los blancos (filas A y B de columna 1), de la curva de calibración con los estándares de VTG (filas A y B, columnas 2 a la 12) y de cada muestra con sus diluciones correspondientes en los demás pocillos. Se selló la placa y se incubó durante 1 hora y 30 minutos entre 20 y 25°C, durante este tiempo los anticuerpos de captura se unen a sus epítopes correspondientes. Luego la placa se lavó tres veces con 300 µl de buffer de lavado por celda. Posteriormente se le agregaron 100 µl de anticuerpo de detección, diluido previamente, a todas las celdas. Se selló la placa y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego de este tiempo el anticuerpo de detección marcado con la enzima peroxidasa se une a la VTG inmovilizada por el anticuerpo de captura. A continuación se lavó la placa 5 veces con 300 µl de buffer de lavado por celda.

Se adicionaron 100 µl de sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) a todos los pocillos. Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos cubriendo con papel de aluminio (desarrollándose un color azul en los pocillos), luego se detuvo la reacción mediante el agregado de 100 µl de ácido sulfúrico 0,3 M (virando dicho color a amarillo). Por último se leyó la absorbancia a 450 nm con el lector de microplaca Multiskan EX Thermo Scientific, Shanghai, China. La absorbancia medida se relaciona directamente con la concentración de anticuerpo de detección inmovilizado en la placa y este último, con la concentración de VTG existente en la muestra.

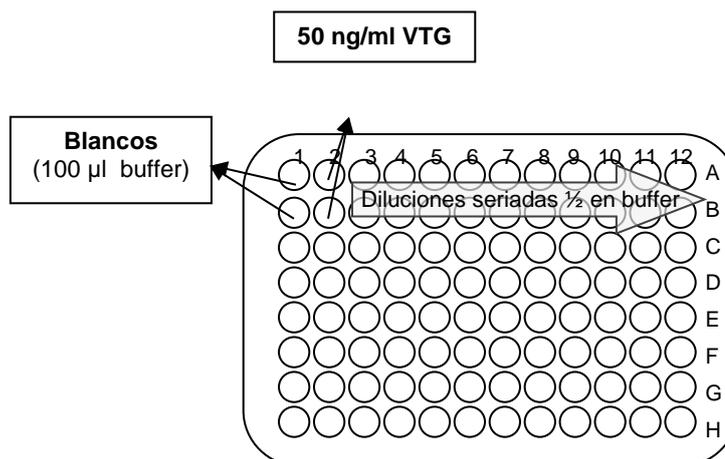


Figura 13. Esquema de la placa para el desarrollo del ELISA. Se agregaron 100 µl de buffer dilución a las filas A y B de la columna 1 para realizar la medida de los blancos y 100 µl de buffer dilución a las filas A y B desde la columna 3 a la 12. Se colocaron 200 µl del estándar de vitelogenina 50 ng/ml en las filas A y B de la columna 2, realizando luego diluciones seriadas al medio, transfiriendo 100 µl de la columna 2 a la 3 y así sucesivamente hasta la columna 12 donde los últimos 100 µl extraídos fueron descartados. Se agregaron en el resto de la placa 100 µl de las muestras con sus diluciones correspondientes por triplicado.

Se determinó el límite de detección según lo publicado por Nilsen y col. en 2004, como la concentración promedio correspondiente a la medida de absorbancia de 10 blancos, más 3 desvíos estándares.

La VTG es una proteína relativamente fácil de purificar a partir de plasma o hígado de peces hembras. Sin embargo, es una proteína intrínsecamente inestable, debido a su papel como precursor de fragmentos de péptidos más cortos (Arukwe y Goksoyr, 2003). Con el fin de afrontar el problema de la inestabilidad de la VTG y su tendencia a ser degradada rápidamente se enriquecieron algunas muestras de homogeneizados de hígados de *P. promelas* en cada ensayo con un estándar de concentración conocida de VTG, se aplicó el mismo procedimiento y se evaluó la recuperación (porcentaje del valor de concentración obtenido mediante el ELISA respecto a la concentración total agregada).

Por otro lado, para cada muestra de hígado se realizó la determinación de proteína total mediante el método colorimétrico con reactivo de Bradford midiendo absorbancia a 595 nm. Para ello se construyó una curva de calibración con estándares de BSA de 0,1 a 1 mg/ml, y se diluyeron las muestras de homogeneizado de hígado al décimo.

3.3.4. Cálculos y tratamiento estadístico

Se construyó la curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas y concentraciones de vitelogenina estándar utilizada. Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) y la ecuación de la recta. Como resultados de las diluciones correspondientes de las muestras y la ecuación de la recta obtenida se obtuvieron las concentraciones de VTG existentes en los

homogeneizados de hígados analizados. Se calculó la masa de VTG (μg) por proteína total (mg) en cada muestra, mediante la división de los $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VTG obtenidos luego de realizar el ELISA y considerar las diluciones correspondientes y los mg/ml de proteínas totales resultante del Bradford.

Los test estadísticos utilizados fueron los mismos que para las características físicas descritas en el punto 3.2.2.

3.4. Detección y cuantificación del nivel de ARNm para genes asociados a la regulación endócrina

El análisis de ARNm de distintos genes se ha utilizado como un enfoque prometedor debido a su alta sensibilidad y a la capacidad para detectar cambios relativamente rápidos después de exposición a un producto químico (Jensen y col. 2006), debido a que el tiempo de respuesta en comparación con la aparición de la proteína en la sangre es menor (Hemmer y col. 2002).

3.4.1. Tratamiento de muestras y extracción del ARN

Las muestras de hígado extraídos en condiciones libre de RNAsa se colocaron en tubos eppendorf, se les adicionaron 50 μl de TRIZOL (Invitrogen) y se homogeneizaron con homogeneizador de mano. Luego se le adicionaron 450 μl de TRIZOL y se sumergieron en nitrógeno líquido siendo almacenadas a -80°C hasta la realización de los ensayos.

Se pasaron por jeringa con aguja pequeña 4 o 5 veces para reducir la viscosidad del lisado y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio. Se agregaron luego 100 μl de cloroformo, se homogeneizó invirtiendo varias veces y se incubó por 5 a 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C , dicha centrifugación genera 3 fases, una fase orgánica roja compuesta por las proteínas, una interfase en la cual se encuentra el ADN y una fase superior no coloreada que contiene el ARN. Esta última fase se transfirió a un tubo limpio donde se le adicionaron 250 μl de isopropanol, se vortexó entre 5 y 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos.

Luego se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C , en esta etapa el ARN precipitado forma un pellet en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y los pellets conteniendo el ARN se lavaron agregando 0,5 ml de etanol 75 % y centrifugando a 7.500 g por 10 minutos a 4°C . En caso que el precipitado flotara o no se formara un pellet compacto se repitió la centrifugación a 12.000 g por 5 minutos más. Luego se removió el etanol con un pequeño tip y se secó el pellet por 3 a 5 minutos bajo lámpara.

El ARN obtenido se disolvió en 20 μl de agua libre de RNAsa (Amresco, Ohio, USA) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.4.2. Cuantificación y verificación de integridad del ARN

Luego de su extracción el ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro Nano Drop 1000, thermo Scientific, Wilmington, U.S.A. Para verificar su integridad se realizaron para todas las muestras, electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml en buffer TBE (Tris Base 89,25 mM, Ácido Bórico 88,95 mM, EDTA 2 mM a pH 8). Las muestras sembradas en el gel fueron preparadas de la siguiente forma: 8 µl de agua, 1 µl de Loading buffer (10X) y 1 µl de la muestra correspondiente de ARN. La observación de los geles se realizó en un transiluminador G.box Syngene.

3.4.3. Retro Transcripción (RT)

Las mezclas preparadas para la reacción de retrotranscripción fueron las siguientes:

Mezcla 1 (X1): 1 µl de oligo dT (equivalente a 400 ng, Irvine, USA), 1 µl de “random primers” (equivalente a 400 ng, Irvine, USA) y 1 µl de dNTPs (10 mM, Irvine, USA).

Mezcla 2 (X1): 4 µl de “first strand buffer” (5X, Invitrogen), 2 µl de DTT (0,1 M, Invitrogen) y 1 µl de inhibidor de RNAsa por muestra (40,000 U/ml, Biolabs, Inglaterra).

Se colocaron 3 µl de la mezcla 1 en cada tubo de reacción. Luego se agregó el volumen de muestra necesario para adicionar 2 µg de ARN extraído antes y agua libre de RNAsa hasta completar 12 µl. Los tubos se calentaron a 65°C durante 5 minutos y se colocaron rápidamente en hielo. A continuación se dio un spin de centrifugación para llevar todo el líquido al fondo.

Se agregó a cada tubo 7 µl de la mezcla 2 y se aplicó nuevamente un spin de centrifugación. Se incubó a 37°C durante 2 minutos y luego se agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV RT - 200 U/µl, Invitrogen) homogeneizando con la micropipeta y agitando en forma circular. El volumen final de la reacción fueron 20 µl.

Además de las muestras correspondientes, se realizaron 2 controles de retrotranscripción: al primero de ellos no se le agregó muestra, con el fin de verificar ausencia de contaminación, NTC (“No-Template Control”) y al segundo se le agregó una muestra que se esperaba contuviera alto nivel de ARNm para cada gen, pero no se colocó enzima M-MLV con el fin de verificar ausencia de ADN genómico, NRT (“No-Reverse Transcriptase”).

Las temperaturas y tiempos asignados fueron según los determinados en el manual de M-MLV de Invitrogen, se incubó a 25°C durante 10 minutos para la hibridación de los cebadores, luego se mantuvo a 37°C durante 50 minutos para la extensión y por último se inactivó la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos. Luego de terminada la reacción los ADN copia se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.4.4. PCR tiempo final

Las secuencias de los cebadores para los genes VTG, IFG-I y GHR fueron obtenidas de citas anteriores (Tabla 2). Para los demás genes (ESR1, ESR2 y ZP3) los cebadores fueron diseñados y solicitados en IDT (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>). Todos los cebadores mencionados fueron analizados también mediante la opción Oligoanalyzer de IDT, considerando que poseían un contenido de GC de 50 a 60 %, una temperatura de fusión (T_m) cercana a 60°C, un largo entre 20 y 22 pares de bases, que no fueran complementarios ni tuvieran temperaturas de formaciones de horquillas mayores a 40°C. Se realizaron en todos los casos alineamientos en el NCBI comparando con los genes a estudiar y verificando 100% de complementariedad en cada uno de ellos.

Para la PCR en tiempo final se realizó para cada muestra la siguiente mezcla (X1):

- 0,4 μ l de dNTP (10 mM)
- 2 μ l de Buffer 10X
- 1 μ l de Cebador directo (10 μ M)
- 1 μ l de Cebador reverso (10 μ M)
- 0,2 μ l de Enzima ADN polimerasa High Fidelity (5U/ml, Fermentas)
- 13,4 μ l de Agua para PCR (Amresco, Ohio, USA)

Se agregaron 18 μ l del mix anterior a cada tubo y 2 μ l del ADN copia con su dilución correspondiente según el gen a amplificar (Tabla 2).

Para poner a punto las temperaturas de hibridación para cada gen se realizó PCR en gradiente, seleccionando en una primera etapa temperaturas 1, 3 y 5 grados menores a la T_m de los cebadores. Luego de realizar electroforesis en geles de agarosa con los productos de amplificación obtenidos, se seleccionaron las temperaturas que producían las bandas del tamaño esperado más nítidas e intensas. En casos necesarios se realizaron PCR con temperaturas intermedias o mayores.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron, una primer etapa de desnaturalización del ADN y activación de la ADN polimerasa a 95°C durante 10 minutos y luego 40 ciclos de: 94°C 10 segundos para desnaturalizar el ADN, temperatura de hibridación específica de cada gen 20 segundos (Tabla 2) y 72°C durante 20 segundos para la extensión. Se culminó con un último ciclo de extensión a 72°C durante 7 minutos. El termociclador utilizado fue Palm Cycler de Corbett Research (Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur).

Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR en buffer TAE (Tris HCl al 0,484 % p/v, Ácido Acético glacial 5,71 % v/v y EDTA 5 mM, pH=8, al 10 % v/v). En agarosa al 1 % para amplicones donde se esperaba una cantidad de pares de bases mayor a 100, o en agarosa al 2% para aquellos donde se esperaban productos más pequeños. Se le agregó al gel 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio en buffer TAE. Se sembraron en cada pocillo 12 μ l totales (10 μ l de muestra resultante de la PCR y 2 μ l de buffer de carga 6X) y

se corrió a 100 V durante 20 minutos aproximadamente. La observación de los geles se realizó en un transiluminador G.box Syngene.

Tabla 2. Cebadores y temperaturas de hibridación utilizados para la PCR en tiempo real

Gen	Juego de Cebadores	Tm (°C)	Nº Acceso Gen Bank	Fuente	Nº pares bases amplicón	Temp. hibridación (°C)	Dilución del ADNc
VTG	F 5'-TGACAAGCCAACAGCAAGAG-3'	55,7	AF130354	Biales y col. 2007	279	60	1/100
	R 5'-TTAGCCGCCATAGGAATGTG-3'	54,9					
ESR2	F 5'- TAGCCACCACCTCCAGATTCAGA -3'	59,5	AY566178.1	Diseñados en IDT	121	55	1/10
	R 5'- CACACCTTCAGGAGTCTGTGACAA -3'	58,6					
ESR1	F5'-GTCAGTGCTTTATGCATGCCACCT-3'	59,7	AY775183	Diseñados en IDT	165	59	1/5
	R5'-AGGCGATCATGTGGACGAGTTCTT-3'	60,0					
ZP3	F5'- ACAATCATGTGCCTCTGCGTGT - 3'	59,5	AF192407.1	Diseñados en IDT	118	57	1/10
	R5'- TTTGGCATCCACAAAGCACCCA - 3'	60,2					
GHR	F5'- CGGCTCTGATACACAACACCTGC - 3'	60,1	DQ007448.1	Filby y Tyler, 2007	83	55	1/10
	R5'- CCCGAATCGTCGTCGCTTTTGAAA -3'	60,0					
IGF-I	F5'-GCCTTTAAGTGTACCATGCGCTGT-3'	59,6	AY533140.1	Filby y Tyler, 2007	190	59	1/5
	R5'-GACCCATATCCTGCTGGTTTGTG-3'	57,8					
18S	Ambion® QuantumRNA™ 18S	-	AY855349		324	-	-

3.4.5. PCR en tiempo real (Q-PCR)

La Q-PCR es uno de los métodos más sensibles y de mayor alcance en la cuantificación de ARNm específicos (Lattier, 2002). Ha demostrado tener un rango lineal de trabajo de ocho órdenes de magnitud siendo lo suficientemente sensible para detectar desde 10 moléculas de partida (Ding, 1994).

El objetivo a amplificar puede ser un ADN al cual se le conoce su secuencia o, como es el presente caso, un ADN copia (ADNc) obtenido por retrotranscripción a partir de ARN (Lattier y col. 2002). Para la cuantificación se mide en cada ciclo de la PCR la cantidad de amplicón producido. Dicha medida se realiza mediante la adición de sondas marcadas con un fluoróforo o un fluoróforo intercalante, los cuales se unen al amplicón de forma cuantitativa. El sistema de PCR detecta la fluorescencia en cada ciclo y los programas utilizados representan dicha fluorescencia respecto al número de ciclos (Manual Invitrogen, 2011).

La cantidad de amplicón es proporcional a la concentración inicial de ADNc, de forma que aquellas muestras con mayor expresión incrementarán su fluorescencia en ciclos anteriores que aquellas con menor expresión. De esta forma la cantidad de copias al inicio de

la reacción se puede determinar a través del Ciclo Umbral (“Cycle Threshold” – CT). El mismo se define como el número de ciclos necesario para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional al número inicial de moléculas de molde (Manual Invitrogen, 2011).

En función de qué tipo de cuantificación se realice, se obtiene el número absoluto de copias (haciendo una curva de calibración con un estándar) o un número relativo mediante normalización con un gen universal (Lattier y col. 2002).

Para normalizar los datos y minimizar los errores inter-ensayos al hacer Q-PCR se realiza la medición en forma simultánea del gen en estudio y de un gen universal (“house keeping”) (Lattier, 2002). El nivel de expresión de dichos genes es constante y se utiliza por tanto para normalizar los valores de ADNc objetivo. El ARN 18S ribosomal, la hipoxantina fosforibosil transferasa (*hprt1*) y proteínas de unión a caja tata, son de los más utilizados en peces, y menos propensos a fluctuar bajo condiciones que afectan la expresión de ARNm celular (Filby y Tyler, 2007^A). Sin embargo no son recomendados algunos genes que han sido utilizados hasta ahora como universales en peces como lo son: factor de elongación 1 alfa (EF1 α), Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PD), β -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Filby y Tyler, 2007^A; Werner y col. 2010).

La PCR en tiempo real para los ARNm de VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I se realizó por triplicado para cada muestra. Con el fin de normalizar los datos y minimizar los errores inter-ensayos se realizó la medición en forma simultánea a los ARNm en estudio del gen universal 18S. Para ello, en todas las muestras al mismo tiempo y en las mismas condiciones de temperatura y dilución que para cada gen, se incluyeron triplicados para la amplificación del ARN de 18S.

La Mezcla (X1) preparada para la PCR consistió en: 3 μ l de agua, 5 μ l de Mix con “Light Cycler SYBR Green I Master” (Roche), 0,5 μ l del cebador directo (10 μ M) y 0,5 μ l del cebador reverso (10 μ M). Se colocaron 9 μ l de dicha mezcla en cada tubo de reacción y 1 μ l de muestra con su dilución correspondiente (Tabla 2).

Debido a que la técnica de PCR en tiempo real es altamente sensible y que dicha sensibilidad está influenciada, en parte, por la cinética de reacción de cada pareja de cebadores, se decidió determinar la eficiencia de los mismos. Esperando que la diferencia de eficiencia del par de cebadores diseñados para cada gen respecto a la del ribosomal 18S no fuera mayor a 0,02 puntos según describe el Manual de PCR de Invitrogen. Se realizó para el cálculo de eficiencia de cada par de cebadores, realizando diluciones seriadas de una misma muestra control positiva y determinando el valor del CT en cada caso. Se graficó CT en función del logaritmo de la concentración relativa de ADN copia utilizado en la amplificación y se determinó la pendiente de dicho gráfico. Las diluciones utilizadas fueron 1/10, 1/100, 1/500, 1/2000 y 1/5000. A partir de las pendientes calculadas se obtuvo la eficiencia de cada par de cebadores mediante el siguiente cálculo:

$$Eficiencia = 10^{\frac{-1}{pendiente}} - 1$$

A través del programa Rotor gene 6000 se obtuvieron los CT para cada gen, correspondiente al número de ciclos en que la fluorescencia supera un valor umbral fijado. Los CT > 30 ciclos se consideraron como ausencia de expresión, así como también en aquellos casos donde el CT fue menor pero las curvas de fusión mostraban la presencia de dímeros de primers (T_m menores a las esperadas).

Debido a que los cálculos de normalización y eficiencia implican relaciones y múltiples fuentes de error, sería extremadamente difícil diseñar una prueba estadística tradicional, en su lugar se utilizan las técnicas de aleatorización (David, Resampling Statistics: Randomization and the Bootstrap). Para realizar los cálculos se utilizó el programa REST, el cual se basa en el método de Pfaffl. El propósito de dicho método es determinar si existe una diferencia significativa entre las muestras tratadas y los controles, teniendo en cuenta la normalización respecto al gen universal utilizado (ribosomal 18S). La hipótesis alternativa representa la probabilidad de que la diferencia entre la muestra tratada y los controles se deba sólo al azar (Herrmann y Pfaffl, REST 2005. Utiliza un procedimiento de reinicialización y aleatorización realizando entre 2.000 y 50.000 iteraciones. La aleatorización es el proceso por el cual los datos experimentales son asignados al azar a los grupos tratamiento y control. Cada dato tiene que tener igual probabilidad de recibir cualquiera de los tratamientos, la asignación a los tratamientos debe ser impredecible y el proceso debe ser reproducible. La aleatorización elimina el sesgo de selección, previene aparición de variables confusas, provee grupos de estudio en donde las variables pronósticas conocidas y desconocidas están distribuidas al azar, provee bases estadísticas para pruebas de significación.

3.5. Detección de actividad estrogénica mediante YES (Yeast Estrogen Screen)

La técnica YES utiliza *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, una levadura modificada genéticamente, con la adición de la secuencia de ADN para el receptor estrogénico humano en el cromosoma propio de la levadura y un plásmido que lleva un gen reportero que codifica para la síntesis de la enzima β -galactosidasa. Dicha modificación le confiere la capacidad de detectar el potencial estrogénico de compuestos con actividad hormonal, por medio de respuestas colorimétricas, a través de la reacción de la β -galactosidasa sobre sustratos cromogénicos.

Durante la realización de este método se trabajó con material estéril y en ambiente aséptico, ya sea mediante el uso de mecheros o flujo laminar.

3.5.1. Reactivos

- *Solución de YNB 10X*

Se pesó 33,5 g de medio "Yeast Nitrogen Base without Amino Acids" (YNB) (Difco – Becton, Dickinson and Company Sparks, MD21152) disolviéndolo en agua mediante agitación magnética. Se transfirió a un matraz aforado de 500 ml y se llevó a volumen con agua. Se filtró

a través de filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm estériles (Santorius, Alemania) y se transfirió a una botella estéril conservándose en heladera.

- *Dextrosa 20%*

Se colocaron 200 ml de agua en un erlenmeyer de 500 ml, se agregaron lentamente 50 g de Dextrosa D-glucosa anhidra granular (Mallinckrodt Chemical, USA) mientras se agitaba vigorosamente con agitador magnético. Se llevó a 250 ml de volumen final, se trasvasó a un frasco de 500 ml y se autoclavó. Se conservó en heladera.

- *Solución de Lisina 0,36%*

Se pesaron 0,36 g de L-Lisina Monohidroclorada (Amresco, Ohio, USA) y se llevaron a un volumen de 100 ml con agua. La solución se autoclavó y conservó a 4°C.

- *Solución de Histidina 0,24%*

Se pesaron 0,24 g de L- Histidina monohidratada (Mallinckrodt Chemical, USA) y se llevaron a un volumen de 100 ml con agua. La solución se autoclavó y conservó a 4°C.

- *Medio de crecimiento*

Se filtraron con filtros de 0,2 μm 100 ml de solución de YNB 10X, 100 ml de dextrosa 20%, 10 ml de solución de lisina 0,36% y 10 ml de solución de histidina 0,24%. Se completó hasta 1000 ml filtrando agua ultrapura. Se almacenó en botella estéril en heladera.

- *Sulfato de cobre 10 mM*

Se pesaron 0,25 g de sulfato de cobre pentahidratado (Mallinckrodt Chemical, USA) y se colocaron en un matraz de 100 ml, se llevó a volumen y se filtró por filtros de 0,2 μm . Se transfirió a botella estéril y se almacenó en heladera.

3.5.2. Tratamiento previo de muestras

Las muestras ensayadas fueron: agua del Arroyo Fray Bentos y efluente industrial de planta de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario. Se realizó una toma de 1 litro de muestra, acidificando con H_2SO_4 hasta pH 2,0 y se filtró por 0,45 μm (filtros de membrana de vidrio, Macherey Nagel, Deutshan, Suiza). Se realizó una extracción en fase reversa (Sep-Pak® Vac 6cc, 500 mg, Waters, Irlanda) con equipo de filtración Easy-Prep (Whatman, Inglaterra). Previamente la columna se acondicionó con 5 ml de metanol anhidro y 5 ml de agua. Luego de la extracción, la columna se centrifugó por 10 minutos a 2000 g y se secó bajo corriente de nitrógeno. La elución se realizó con 5 ml de acetona, luego se secó bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 ml de etanol absoluto. Se almacenó a 4°C durante un máximo de 14 días hasta la realización del ensayo (Pawlowski y col. 2004).

3.5.3. Reconstitución de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

Se recibieron de la Universidad de Cranfield (Inglaterra) filtros con la levadura recombinante liofilizada, *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BJ3505) (Gaido, 1997). La levadura se reconstituyó, colocando los filtros en forma invertida en placas con medio selectivo (Apéndice I), e incubando las mismas a 30°C durante 4 a 5 días hasta que las colonias se hicieron visibles. Se repicaron algunas colonias a otra placa con medio selectivo y una vez que se observó crecimiento se seleccionó una colonia y se la colocó en 5 ml de medio gold (Apéndice I) en un tubo de propileno de 50 ml, se mantuvo toda la noche a 30°C con agitación constante (300rpm) (Nelson, 2007).

El cultivo obtenido se almacenó a -80°C, para ello se preparó y autoclavó una solución de glicerol al 30% (99,5% pureza, Merck), se mezclaron partes iguales de cultivo de levadura y glicerol, se colocaron en crioviales y se congelaron a -80°C.

3.5.4. Exposición de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

Se colocaron 200 µl de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en un tubo de propileno de 50 ml y se le agregaron 1,8 ml de medio de crecimiento. Se cultivó toda la noche a 30°C y 300 rpm (Shaker New Brunswick Scientific Co.Inc, USA). A la mañana siguiente se le adicionaron 2 ml de medio de crecimiento y se le permitió crecer hasta la tarde en las mismas condiciones. Se diluyó con medio de crecimiento hasta una densidad óptica (OD) de 0,03 a 660 nm y luego se le adicionaron 100 µl de solución de sulfato de cobre por cada 20 ml de solución de trabajo final obtenida.

En tubos de propileno de 50 ml se colocaron 5 ml del cultivo anterior por duplicado. Se adicionó a cada tubo: 5 µl de etanol absoluto (99,9% de pureza, Merck) en caso de los blancos, 5 µl de cada estándar de 17β-Estradiol de concentración conocida para la curva y 5 µl de la muestra correspondiente en los tubos experimentales. Para los estándares de estradiol se utilizó un stock de 1,89 g/l (material certificado, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania) disuelto en etanol absoluto, realizándose diluciones seriadas en agua ultrapura hasta obtener 10 soluciones de concentraciones entre 1,75 ng/l a 7,5 µg/l.

Se incubaron los tubos toda la noche a 30°C y 300 rpm. A la mañana siguiente se realizaron diluciones hasta una OD de 0,25 a 660 nm (Espectrofotómetro –Shimatzu, UV 160^a, Norte América), luego se tomaron 70 µl de cada tubo por duplicado y se colocaron en una placa de ELISA. En 3 pocillos se colocó medio de crecimiento y se fijó el cero de absorbancia del equipo de lectura.

Se preparó la solución de trabajo a partir del Kit YES (“Yeast β Galactosidase Assay kit”, Thermo Cientific, Shanghai, China) mezclando partes iguales del reactivo Y-PER y “β-galactosidase Assay Buffer” (Manual, YES). Se agregaron 70 µl de dicha solución de trabajo en cada pocillo conteniendo O-nitrofenol-β-D-galactopiranosido (ONPG) en solución alcalina. Se comenzó a contar el tiempo con cronómetro y se midió absorbancia a 660nm en cada pocillo

de la placa con lector de multiplaca (Multiskan EX de ThermoScientific, Shanghai, China) para obtener una medida de la concentración de células de levadura en cada pocillo.

Si la levadura se encuentra en contacto con un contaminante estrogénico, este último se une al receptor hormonal transformándolo en un receptor activo, produciendo su interacción con el promotor del gen reportero provocando la expresión del gen Lac Z y la posterior producción de β -Galactosidasa, la cual es secretada al medio pudiendo hidrolizar el ONPG agregado a O-nitrofenol (ONP) y galactosa en una solución alcalina, provocando un viraje de incoloro a amarillo debido a la presencia de ONP. Luego de observar el color amarillo se anotó el tiempo transcurrido y se midió la absorbancia a 420 nm colocando como cero del equipo la medida del pocillo que contenía solo medio de cultivo.

El límite de detección se determinó al igual que para el ELISA como la concentración promedio correspondiente a la medida de absorbancia de 10 blancos, más 3 desviaciones estándares.

3.5.5. Cálculos

Para el cálculo de la actividad β -Galactosidasa que representa la actividad estrogénica presente en cada muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$Actividad(\beta-Galactosidasa) = \frac{1000 \times A_{420nm(muestra)} - A_{240nm(medio)}}{t_{\text{minutos}} \times V_{ml} \times A_{660nm(muestra)} - A_{660nm(medio)}}$$

t: tiempo en minutos transcurrido desde agregado de solución de trabajo hasta la medida de absorbancia

V: volumen final del cultivo

A cada actividad medida se le resta la actividad promedio de los blancos y se calculó el porcentaje de actividad en relación al estándar de estradiol de mayor concentración aplicando la siguiente fórmula:

$$Actividad(\%) = \frac{Actividad(x) \times 100}{Actividad(7,5 \mu g_{17\beta\text{-estradiol}} / l)}$$

Los ensayos de dosis-respuesta fueron ajustados mediante la función de Hill en el programa SIMFIT de la Universidad de Salamanca de acceso libre en la web (inrateHill-n/Michaelis-Menten/line/quadratic/lag-phase/monomolecular). Se calculó una sigmoide de 3 parámetros a partir de la actividad relativa y las dosis de E_2 utilizadas usando una regresión no lineal.

$$Actividad(\%) = \frac{V_{\max} \times Dosis^n}{K_m^n + Dosis^n} + C$$

V_{\max} : es la respuesta máxima obtenida

K_m : dosis a la cual se obtiene un 50% de actividad relativa

n: coeficiente de Hill

C: constante

A partir de la función de Hill obtenida y los datos de actividad porcentual de cada muestra se calcularon las dosis estrogénicas correspondientes a las muestras, se expresaron como nanogramos por litro de E_2 tal cual los estándares utilizados para la construcción de la curva.

4. RESULTADOS

En el anexo II se presentan algunas características fisicoquímicas y contenido de estrógenos de ambas muestras analizadas. Los ensayos para dicha caracterización fisicoquímica fueron llevados a cabo dentro de otra investigación realizada en el LATU. La mayoría de los análisis se realizaron dentro del Departamento de Aguas y Productos Químicos del LATU, mientras que algunos como el contenido de estrógenos fue enviado a analizar a laboratorios del exterior.

4.1. Ensayos de exposición con *Pimephales promelas*

Los ensayos con *Pimephales promelas* se realizaron exponiendo por triplicado 4 hembras y 2 machos en acuarios de 10 litros a concentraciones conocidas de E₂ (150 y 450 ng/l), a agua extraída del Arroyo Fray Bentos y a un efluente industrial de planta de pulpa celulosa con tratamiento secundario. Cada uno de los ensayos se realizó con sus controles negativos respectivos colocando la misma cantidad de peces en iguales condiciones pero en agua reconstituida. Durante los 21 días de exposición no se observaron muertes, cambios físicos, ni de coloración en los peces, ya sea en aquellos de acuarios con agua reconstituida, con estradiol, con muestras de efluente industrial o con agua de arroyo. Al día 21, antes de la incisión cervical todos los peces fueron observados a simple vista y fotografiados, no encontrándose anomalías físicas en ninguno de ellos (Figura 14).



Figura 14. Foto de *Pimephales promelas* expuestos a 450 ng/l de E₂. A: Hembra, B: Macho

4.1.1. Modificaciones en características anatómicas

- Peso corporal individual: luego de comprobar que la distribución de los pesos fue normal y las desviaciones típicas entre los subgrupos fueron comparables, se realizó un test ANOVA con el fin de comparar los pesos de peces de los controles de diferentes

ensayos entre sí, considerando machos y hembras por separado, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas.

Luego se compararon los valores de pesos de peces expuestos a ambas concentraciones de E_2 , al Arroyo Fray Bentos y al efluente industrial, con los de sus respectivos controles mediante un test de T, no encontrándose en ninguno de los sexos, ni subgrupos de peces diferencias significativas respecto a los controles (Figura 15).

- Largo total: se verificó distribución normal de los datos y la no existencia de diferencias entre las desviaciones típicas. Al igual que para los pesos se compararon mediante un test ANOVA los largos de peces de los controles entre sí, considerando machos y hembras por separado, no obteniéndose diferencias significativas. A su vez se compararon los largos de machos y hembras expuestos a los diferentes tratamientos con sus respectivos controles mediante un test de T, no obteniendo diferencias significativas en ninguno de los subgrupos ni sexos (Figura 15).

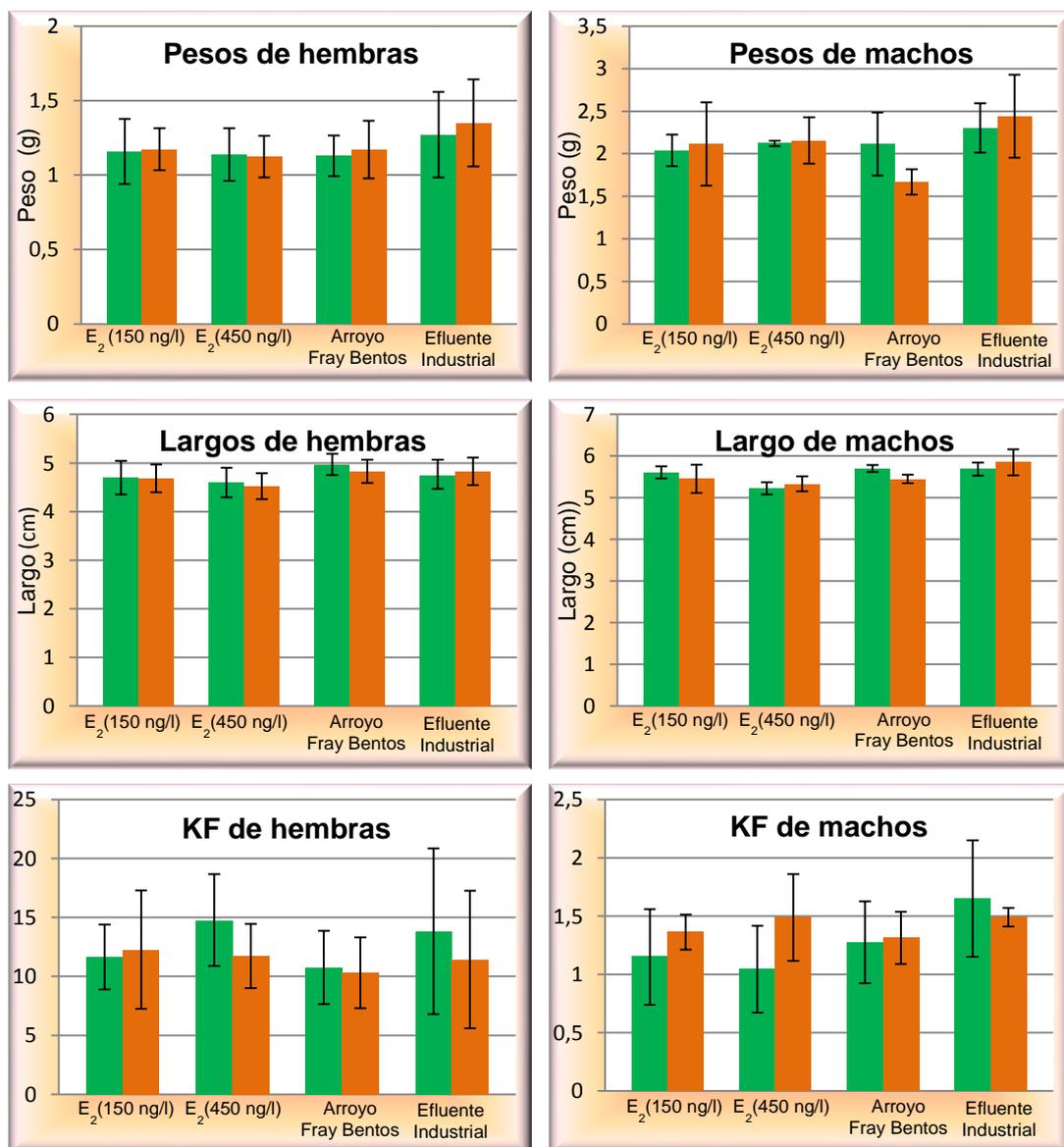


Figura 15. Características anatómicas de peces controles y expuestos a: E_2 (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Se muestran las medias de los controles en color verde y de los expuestos a los diferentes tratamientos en color naranja con líneas diagonales. Las barras de error indican la desviación estándar.

- Factor de condición (KF): a partir de los KF individuales obtenidos se realizaron comparaciones de cada grupo expuesto con sus respectivos controles mediante un test de T, diferenciando como hasta ahora entre machos y hembras. Como era de esperarse a partir de los resultados anteriores, en ninguno de los casos ni sexos se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 15)

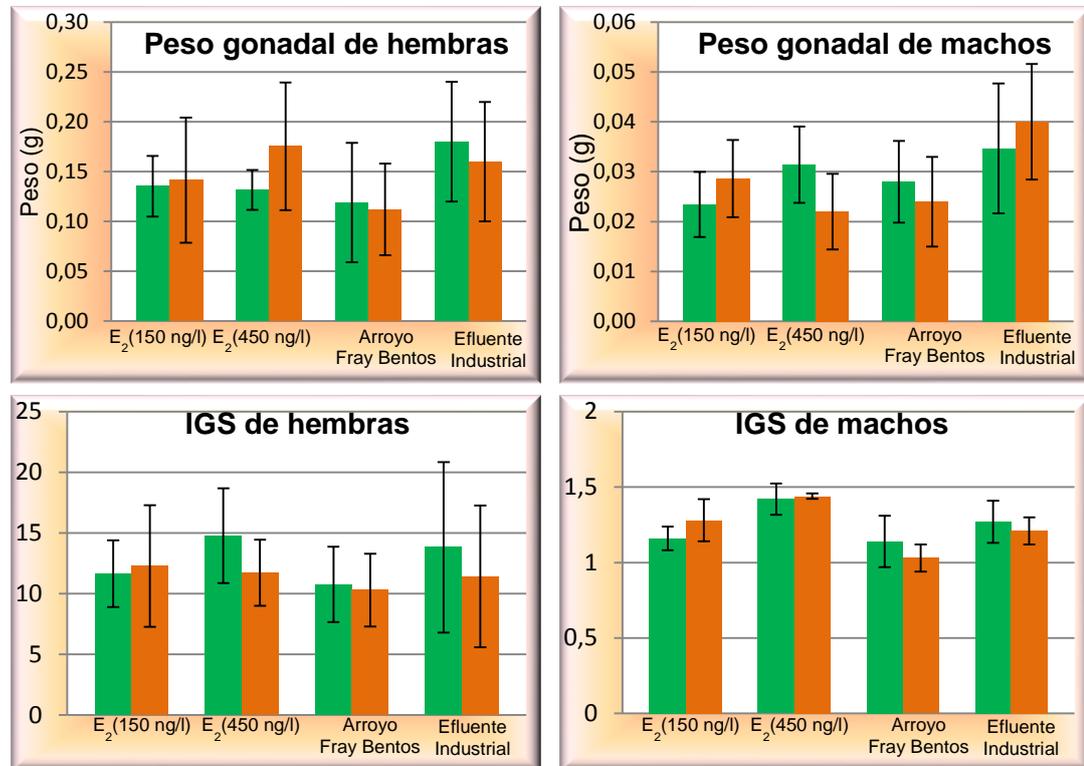


Figura 16. Característica gonadales de *Pimephales promelas* controles y expuestos a: E_2 (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Se muestran controles en color verde y expuestos a los diferentes tratamientos en color naranja con líneas diagonales. **Peso gonadal de hembras.** Se grafican los valores de medias y desviaciones estándares para las expuestas a efluente industrial, 150 y 450 ng/l de E_2 , y los valores de medianas y rangos intercuatílicos para las del Arroyo Fray Bentos y su control. **Peso gonadal de machos.** Se grafican los valores de medias y desviaciones estándares para los expuestos a efluente industrial, 150 y 450 ng/l de E_2 , y los valores de medianas y rangos intercuatílicos para los del Arroyo Fray Bentos y su control. **IGS de hembras.** Se grafican los valores de medias y desviaciones estándares. **IGS de machos.** Se grafican los valores de medias y desviaciones estándares para los expuestos a 150 y 450 ng/l de E_2 y Arroyo Fray Bentos, y los valores de medianas y rangos intercuatílicos para los del efluente industrial y su control.

- Peso gonadal: se verificó distribución normal de los datos para peces expuestos a ambas concentraciones de E_2 , al efluente industrial y para la totalidad de los controles, no siendo así para los peces de ambos sexos expuestos al agua del Arroyo Fray Bentos. Se compararon nuevamente los valores de los controles entre sí mediante un ANOVA verificándose que no existían diferencias significativas entre ellos.

Se compararon con sus controles correspondientes, los valores de pesos de gónadas de machos y hembras expuestos a ambas concentraciones de E_2 y al efluente industrial mediante un test de T y los de peces expuestos al agua de arroyo mediante un test de medianas (no paramétrico), no obteniéndose en ninguno de los casos diferencias significativas (Figura 16).

- IGS: este parámetro es calculado como el porcentaje del peso gonadal respecto al peso total de cada individuo. Se realizó el mismo tratamiento estadístico que para las gónadas con el fin de comparar los valores de IGS de peces expuestos con sus respectivos controles. Se verificó normalidad de los datos para peces hembras expuestas al efluente industrial y para peces de ambos sexos expuestos a ambas concentraciones de E_2 , al Arroyo Fray Bentos y para la totalidad de los controles, no siendo así para los peces machos expuestos al efluente industrial. Se compararon nuevamente los valores de los controles entre sí mediante un ANOVA verificándose que no existían diferencias significativas entre ellos. Luego se compararon con sus controles correspondientes, los valores de IGS de machos y hembras expuestos a ambas concentraciones de E_2 y al Arroyo Fray Bentos y los de hembras expuestas al efluente industrial mediante un test de T y los de machos expuestos al efluente industrial mediante un test de medianas, no obteniéndose en ninguno de los casos diferencias significativas (Figura 16).

4.1.2. Evaluación de fecundidad

Durante la totalidad de los días de ensayo se contaron los huevos depositados en los sustratos de cada acuario, se calculó el número de huevos promedio puesto por hembra por día y la frecuencia acumulada (número totales de huevos a cada día en cada acuario) para los controles y los expuestos.

En la tabla 3 se presentan el número de huevos promedio puesto por hembra por día para cada ensayo. Se puede apreciar que el número se incrementó en aquellas expuestas a 150 ng/l de E_2 y al agua del Arroyo Fray Bentos, disminuyó en las expuestas al efluente industrial y no tuvo cambio significativo luego de exponerlos a 450 ng/l de E_2 .

Tabla 3. Promedio de huevos puestos por hembra por día durante el ensayo de exposición

	Hembras controles	Hembras expuestas
E_2 (150 ng/l)	8,4	15,9
E_2 (450 ng/l)	13,1	15,3
Arroyo Fray Bentos	7,1	16,2
Efluente Industrial	20,0	9,0

Para comparar las distribuciones de frecuencia acumulada de los controles y los ensayos de exposición entre sí se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de los peces expuestos a 150 ng/l de E_2 se observó diferencia significativa de distribución (p valor=0,0006), pero no fue así para 450 ng/l de E_2 (p valor=0,36) (Figura 17). Cuando se analizaron las distribuciones de puesta luego de la exposición al agua de arroyo se encontró diferencia de distribución estadísticamente significativa entre controles y expuestos (p valor=0,042), observándose un incremento en la puesta de huevos. Mientras que al comparar los resultados de la frecuencia acumulada de huevos de los expuestos al efluente industrial con sus controles, también se observó diferencia de distribución (p valor=0,003), pero apreciándose un descenso en la puesta.

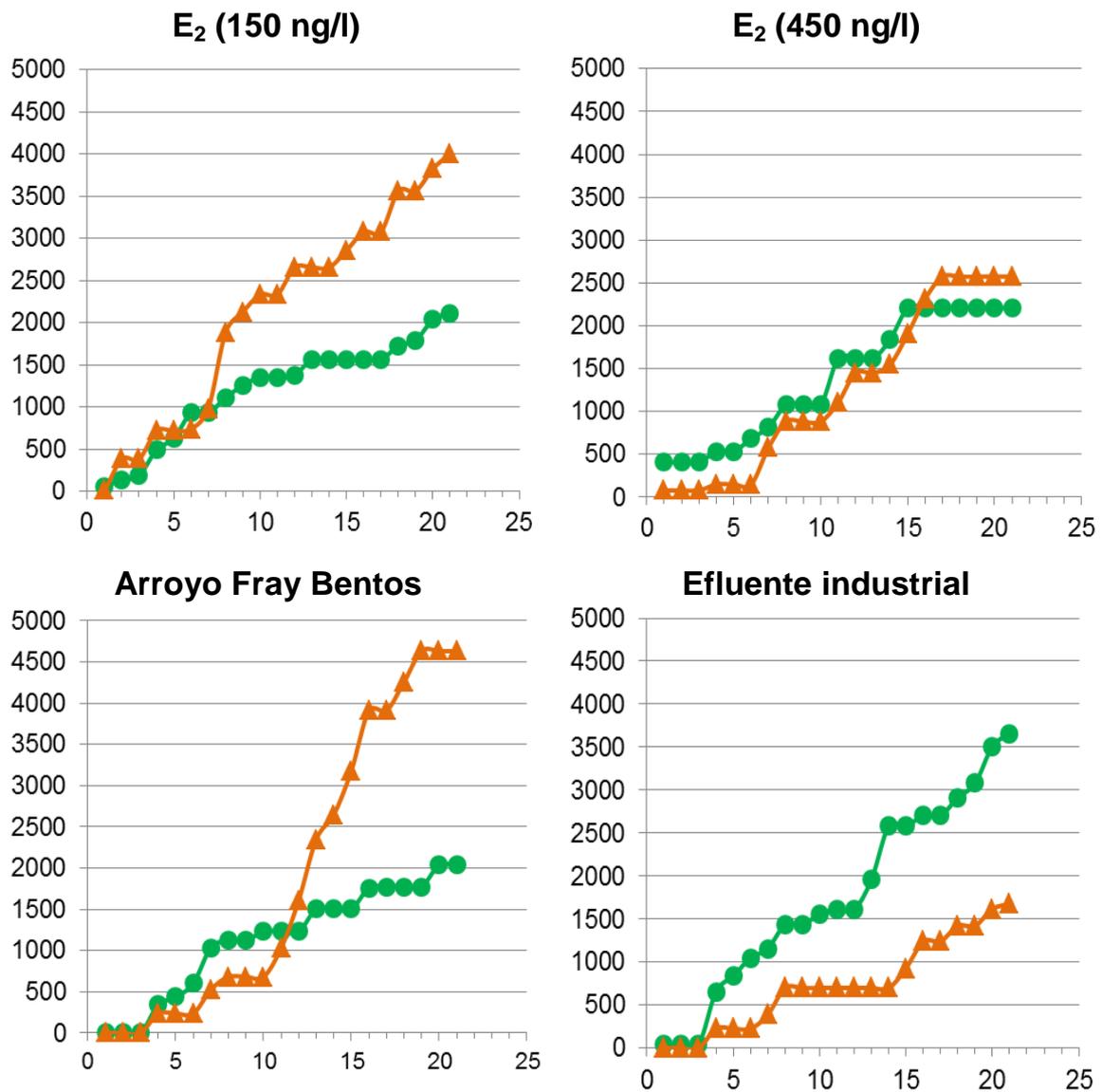


Figura 17. Puesta de huevos acumulada en función del tiempo para las acuarios controles y de exposición a: E₂ (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Se grafica el número de huevos totales en función de los días de exposición. Con círculos de color verde se muestran acuarios control y con triángulos de color naranja acuarios expuestas a la muestra objetivo.

4.1.3. Expresión proteica de Vitelogenina en *Pimephales promelas*

Al término de los 21 días, luego de sacrificados los peces, se les extrajo el hígado, se realizó un homogeneizado. Los extractos correspondientes a dos hígados de hembras y uno de macho por acuario, fueron utilizados en un Kit ELISA específico para la especie, con el fin de determinar los niveles de VTG. Al realizar cada ELISA se desarrolló una curva de calibración y a partir de la ecuación de la recta obtenida y las diluciones correspondientes se efectuaron los cálculos de concentración de VTG en cada muestra ensayada.

Las curvas de calibración obtenidas tuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,995 en todos los casos, aceptable para este tipo de método, ya que según la bibliografía se aceptan coeficientes mayores a 0,99 (Nilsen y col. 2004) (Figura 18).

Con el fin de afrontar el problema de la inestabilidad de la VTG y su tendencia a ser degradada rápidamente se enriquecieron algunas muestras de homogeneizados de hígados de *P. promelas* en cada ensayo con un estándar de concentración conocida de VTG, se aplicó el mismo procedimiento y se evaluó la recuperación (porcentaje del valor de concentración obtenido mediante el ELISA respecto a la concentración total agregada), la cual siempre se estableció entre 80 a 120 % (Tabla 4), lo que es considerado aceptable para dicho método (Valderrama y col. 2009)

Se calculó también el límite de detección del método mediante la realización de 10 blancos, el cálculo de VTG correspondiente y la suma de 3 desvíos estándares. El valor del límite de detección obtenido fue 2,5 ng/ml. Valores de VTG menores al límite de detección fueron considerados iguales a dicho límite a la hora de hacer los cálculos. La concentración de VTG obtenida fue normalizada respecto a la concentración proteica total en cada muestra extraída, expresándola como microgramos de VTG por miligramo de proteína total.

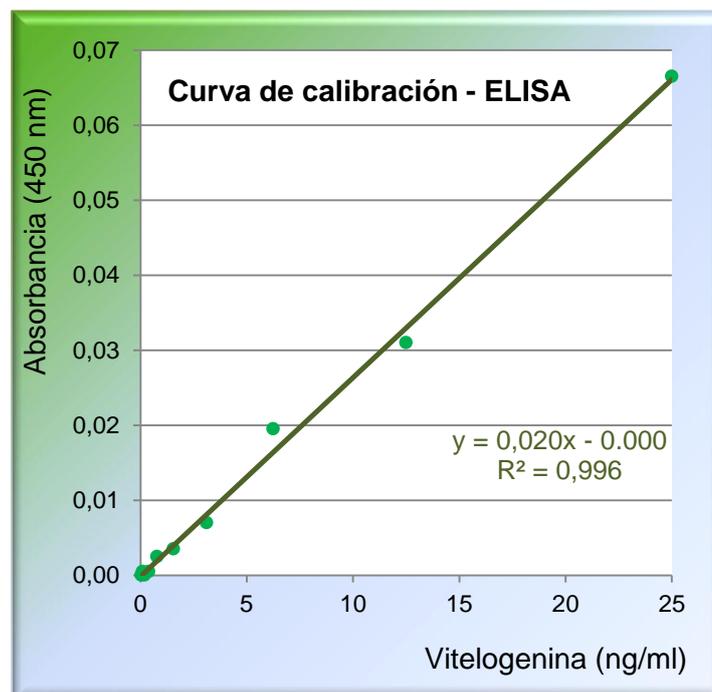


Figura 18. Ejemplo de una curva de calibración obtenida en el ELISA de VTG. En ella se muestra la ecuación de la recta y el R^2 .

Tabla 4. Ejemplos de recuperaciones obtenidas a partir de agregado de un estándar conocido de proteína VTG a diferentes muestras de hígado.

Muestra	Absorbancia 450 nm	Absorbancia corregida	Vitelogenina (ng/ml)	Concentración esperada (ng/ml)	Recuperación (%)
A*	0,055	0,011	4,2	5,33	80,0
	0,058	0,014	5,3	5,33	100
B^	0,063	0,019	7,3	6,86	106
	0,065	0,021	8,0	6,86	117

*Se agregaron 3 μ l de un estándar 50 ng/ml de VTG en un volumen de 30 μ l de muestra final diluida 1/200. El resultado de la muestra A fue 66,0 ng/ml de VTG, diluida 1/200 se obtienen 0,33 ng/ml. Si se le agregan 5 ng/ml obtenemos una concentración final de 5,33 ng/ml.

^ Se agregaron 4 μ l de un estándar 50 ng/ml de VTG en un volumen de 40 μ l de muestra final diluida 1/20.000. El resultado de la muestra B fue 37,1 ng/ml de VTG, diluida 1/20.000 se obtienen 1,86 ng/ml. Si se le agregan 5 ng/ml obtenemos una concentración final de 6,86 ng/ml.

Los test estadísticos realizados para comparar VTG de los grupos de peces expuestos frente a sus respectivos controles fueron no paramétricos (Man Whitney-Wilcoxon) debido a que los grupos de datos no tenían distribución normal y no eran normalizables. Los niveles de VTG encontrados en hembras expuestas a 150 ng/l de E₂ fueron significativamente menores a los encontrados en sus controles (p valor=0,007) (Figura 19), mientras que los valores para hembras expuestas a 450 ng/l de E₂ no mostraron diferencias significativas (p valor=0,31). Por otro lado, las hembras expuestas al Arroyo Fray Bentos mostraron una disminución en los niveles de VTG respecto a sus controles (p valor=0,035), mientras que aquellas que se expusieron al efluente industrial no sufrieron cambios (p valor=0,31).

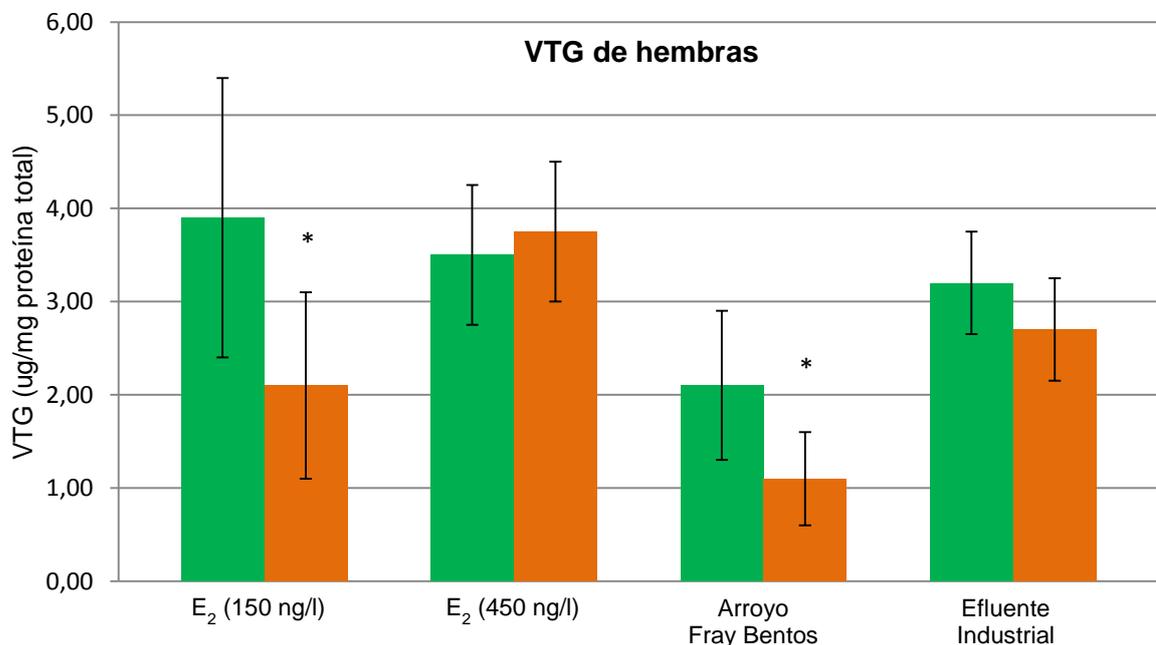


Figura 19. VTG expresada como μ g de VTG por mg de proteína total para hembras controles y expuestas a: E₂ (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Los controles se muestran en color verde y las expuestas a los diferentes tratamientos en color naranja con líneas diagonales. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre controles y expuestos.

Al aplicar los mismos test estadísticos en machos, se observó un aumento significativo en los niveles de VTG en aquellos peces expuestos a ambas concentraciones de E₂ respecto a sus controles correspondientes (p valor=0,025 para 150 ng/l y 0,004 para 450 ng/l) (Figura 20). Al comparar los expuestos al agua de arroyo y al efluente industrial con los controles adecuados, no se observaron cambios significativos en los niveles de VTG (p valor= 0,30 para expuestos a agua de arroyo y 0,94 para expuestos a efluente industrial).

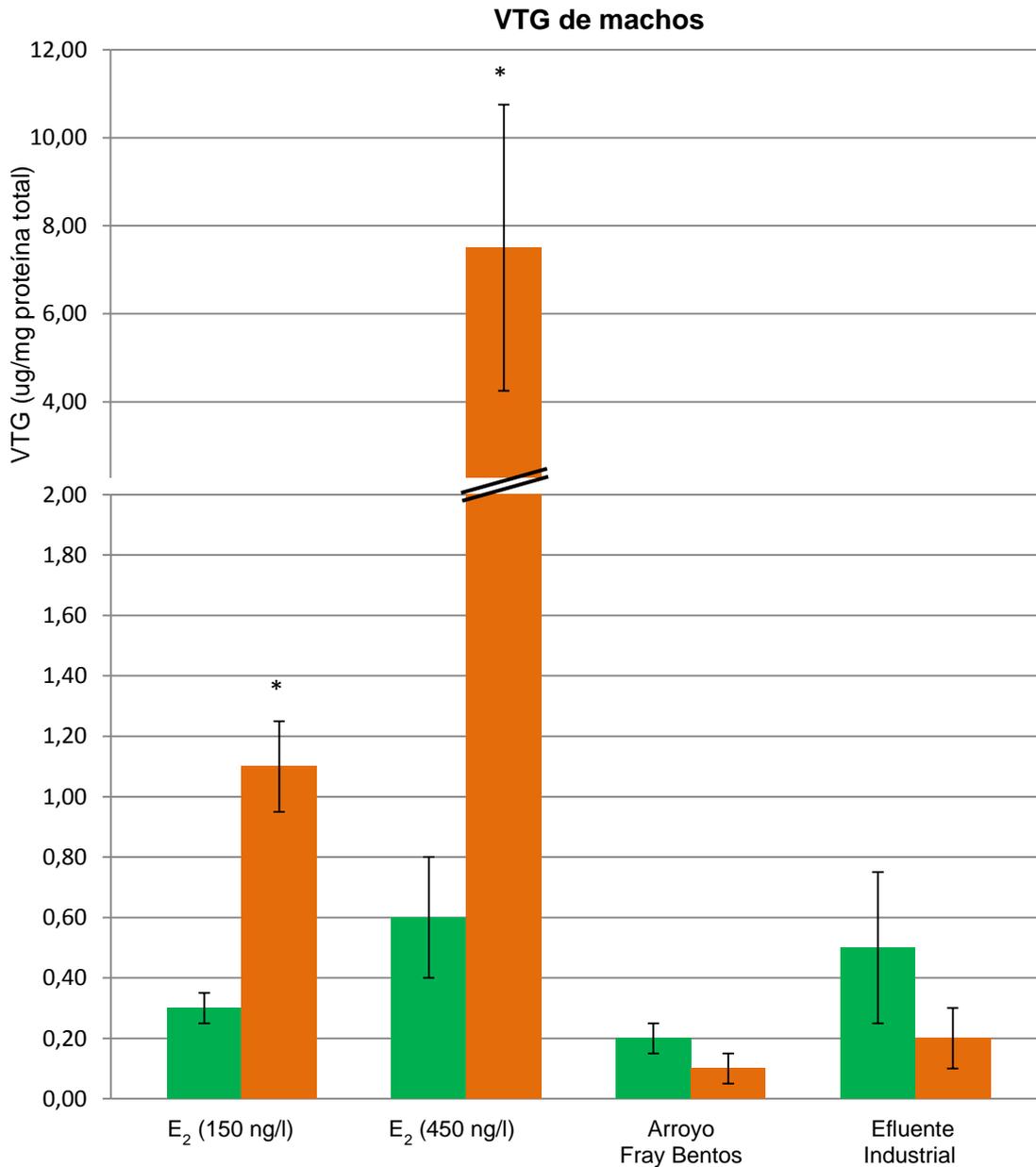


Figura 20. Proteína VTG expresada como μg de VTG por mg de proteína total para machos controles y expuestos a: E₂ (150 y 450 ng/l), Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Los controles se muestran en color verde y los expuestos a los diferentes tratamientos en color naranja con líneas diagonales. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre controles y expuestos.

4.1.4. Evaluación de la expresión génica de *Pimephales promelas*

- *Concentración e integridad del ARN*

A partir de las muestras de hígado obtenidas de peces expuestos y controles de los diferentes experimentos de exposición realizados, se extrajo ARN total. La concentración del ARN extraído se determinó mediante la medida de absorbancia a 260 nm. La pureza de los ARN se comprobó mediante el cociente de absorbancias a 260/280 nm, siendo dicho cociente en todos los casos superior a 1,8. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa obteniendo resultados aceptables, observándose en todos los ARN extraídos las dos bandas características de ARN ribosomal, 28S y 18S (Figura 21).

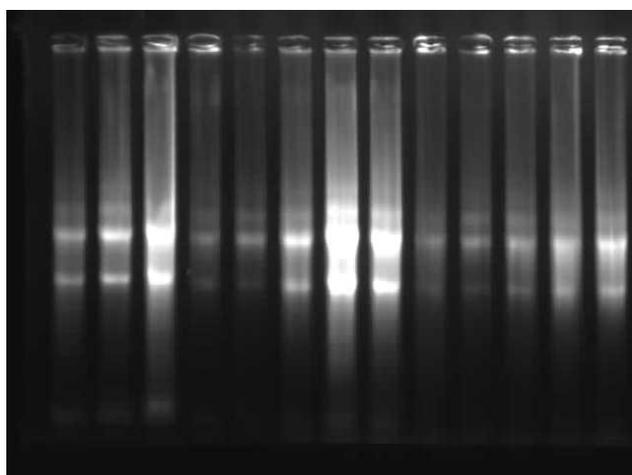


Figura 21. Electroforesis en geles de agarosa al 1% realizada a los ARN extraídos de los hígados de peces expuestos al Arroyo Fray Bentos.

Cantidades equivalentes de ARN (2 µg) de cada muestra fueron utilizadas como molde para la síntesis de ADN copia mediante reacciones de retrotranscripción. Los cebadores para la reacción de PCR fueron interrogados utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en NCBI (National Center for Biotechnology Information) comprobándose un 100 % de identidad con la secuencia de cada gen objetivo de *Pimephales promelas*.

- *Puesta a punto mediante PCR en tiempo final*

Antes de la realización de la Q-PCR se puso a punto la técnica de amplificación por medio de la aplicación de PCR en tiempo final y el análisis de los productos de amplificación. Dicho análisis se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa y verificación del tamaño de las bandas obtenidas en todos los casos. Se ajustaron ciertas condiciones de la reacción como: temperatura, concentración de cebadores, tiempo de los ciclos, números de

ciclos y diluciones de las muestras hasta obtener una sola banda clara y nítida en el gel de agarosa. Para todos los productos de amplificación se obtuvo en el gel de agarosa una banda nítida y de tamaño esperado luego de la amplificación con los cebadores diseñados (Figura 22).

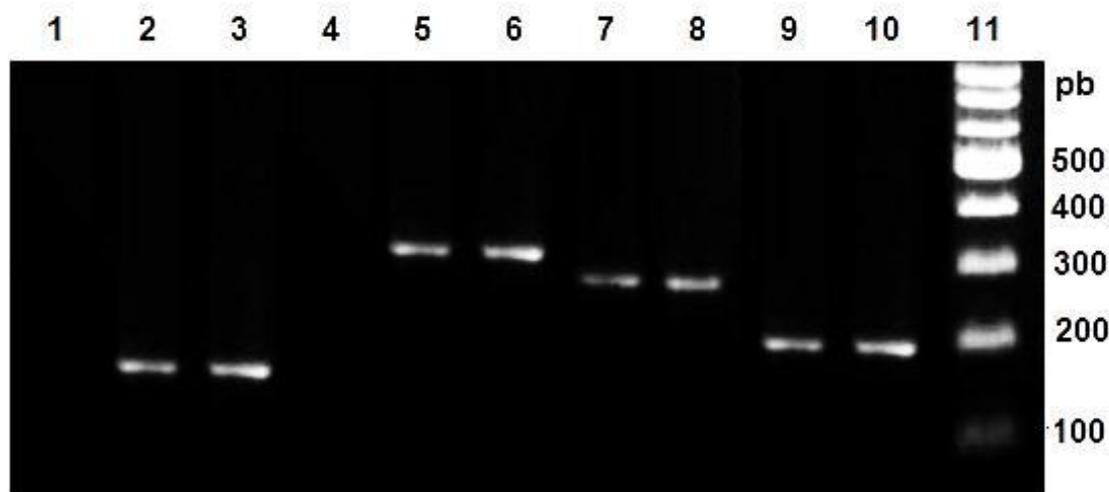


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de los productos de amplificación, por PCR en tiempo final, con los cebadores correspondientes a los genes: ESR1, IGF-I, 18 S y VTG. Se muestra en carril 1 blanco de PCR de ESR1, en carriles 2 y 3 ESR1, carril 4 blanco de PCR de VTG, carriles 5 y 6 18 S, carriles 7 y 8 VTG, carriles 9 y 10 IGF-I y carril 11 marcador de PM 100 pb ladder de Invitrogen. Los tamaños de las bandas obtenidas fueron los esperados: VTG 279 pb, ESR1 187pb, IGF-I 190 pb y 18S 324pb.

- Control de calidad de PCR en tiempo real

Debido a que las muestras de ARN total de hígados no fueron tratadas con DNAsa, se debió corroborar la inexistencia de ADN genómico en las muestras, ya sea diseñando cebadores para hibridar en exones diferentes o utilizando el ARN extraído como molde en reacciones de amplificación. Como no han sido publicadas secuencias genómicas de *P. promelas* en el Genbank para comprobar que dichos cebadores hibridaban en exones diferentes se utilizaron las secuencias de ADN genómico de *Cyprinus carpio* (perteneciente a la misma familia que *Pimephales promelas*) pudiendo comprobar que los cebadores correspondientes a VTG, ZP3 e IGF-I se encuentran en exones diferentes flanqueados al menos por un intrón y que los cebadores para GHR se encuentran localizados en un mismo exón (Figura 23).

Por el contrario, para ninguno de los genes de receptores de estrógenos se lograron encontrar publicadas secuencias con la posición de exones e intrones correspondientes a otros peces de la misma familia, no pudiendo corroborar la localización de los cebadores. Para verificar la posición de los cebadores de GHR y ambos ESR y descartar posible contaminación con ADN genómico, se debió realizar una PCR en tiempo real con ARN total, ADN copia y ADN genómico como moldes.

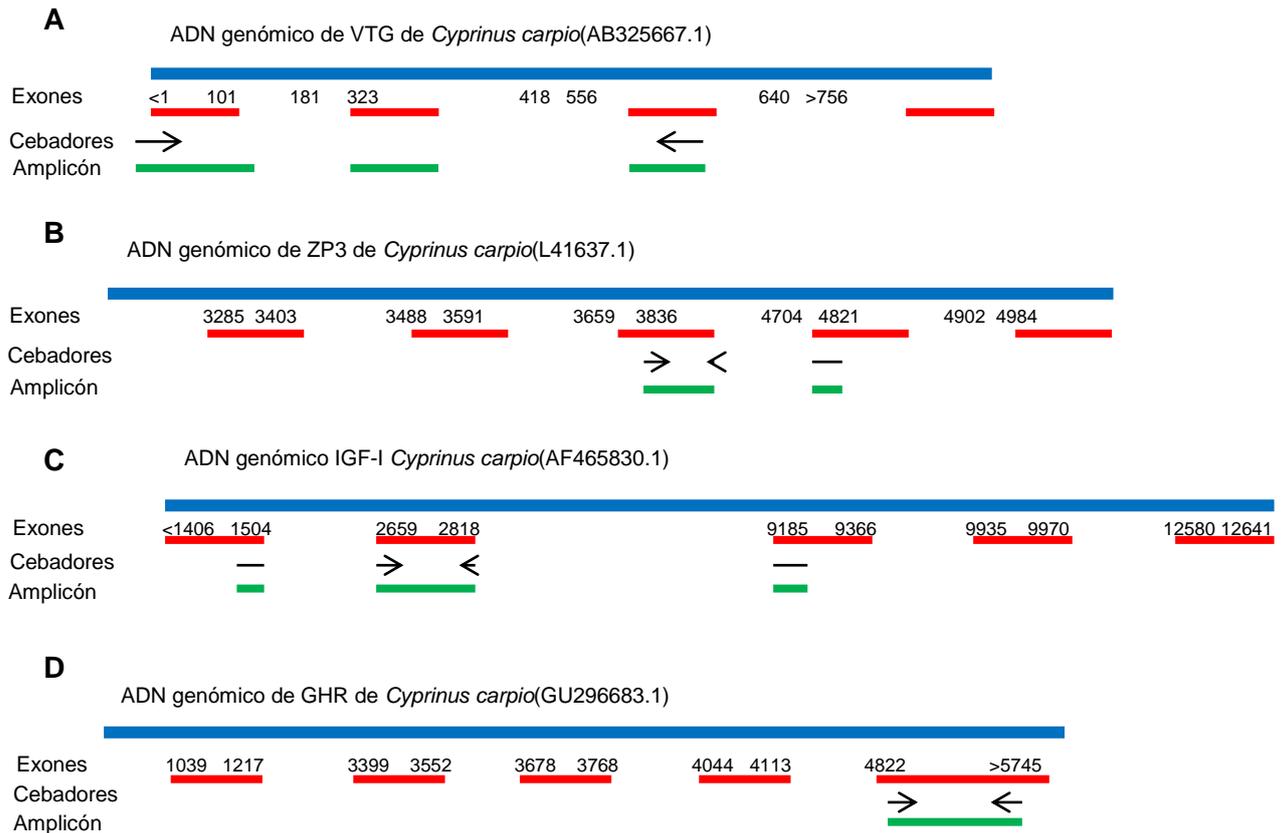


Figura 23. Esquema de la estructura genómica de VTG (A), ZP3 (B), IGF-I (C) y GHR (D) de *Cyprinus carpio*. El ADN genómico se representa en color azul, los exones con su correspondiente posición en números de pares de bases en color rojo, los cebadores en negro y el amplicón obtenido luego de la PCR en verde.

La reacción de PCR en tiempo real para GHR y ESR1 muestra resultados similares, CT de 17,5 y 16 para el ADN genómico respectivamente, menor a 20 para ADN copia (Figura 24). Dichos resultados muestran que los cebadores para GHR y ESR1 fueron diseñados en un mismo exón, ya que existió amplificación tanto a partir de ADN copia como de ADN genómico y con curvas de fusión muy similares. A su vez podemos detectar que no existió contaminación de ADN genómico en las muestras de ARN ya que utilizando dicho ARN como molde no hubo amplificación, los CT para ARN fueron mayores a 30 y/o con temperaturas de fusión diferentes a las obtenidas para los ADN genómico y copia.

Los cebadores diseñados para ESR2, por el contrario, están ubicados en diferentes exones ya que solo se observó aumento de fluorescencia cuando se amplificó ADN copia y no hubo amplificación con el molde de ADN genómico así como tampoco con el ARN.

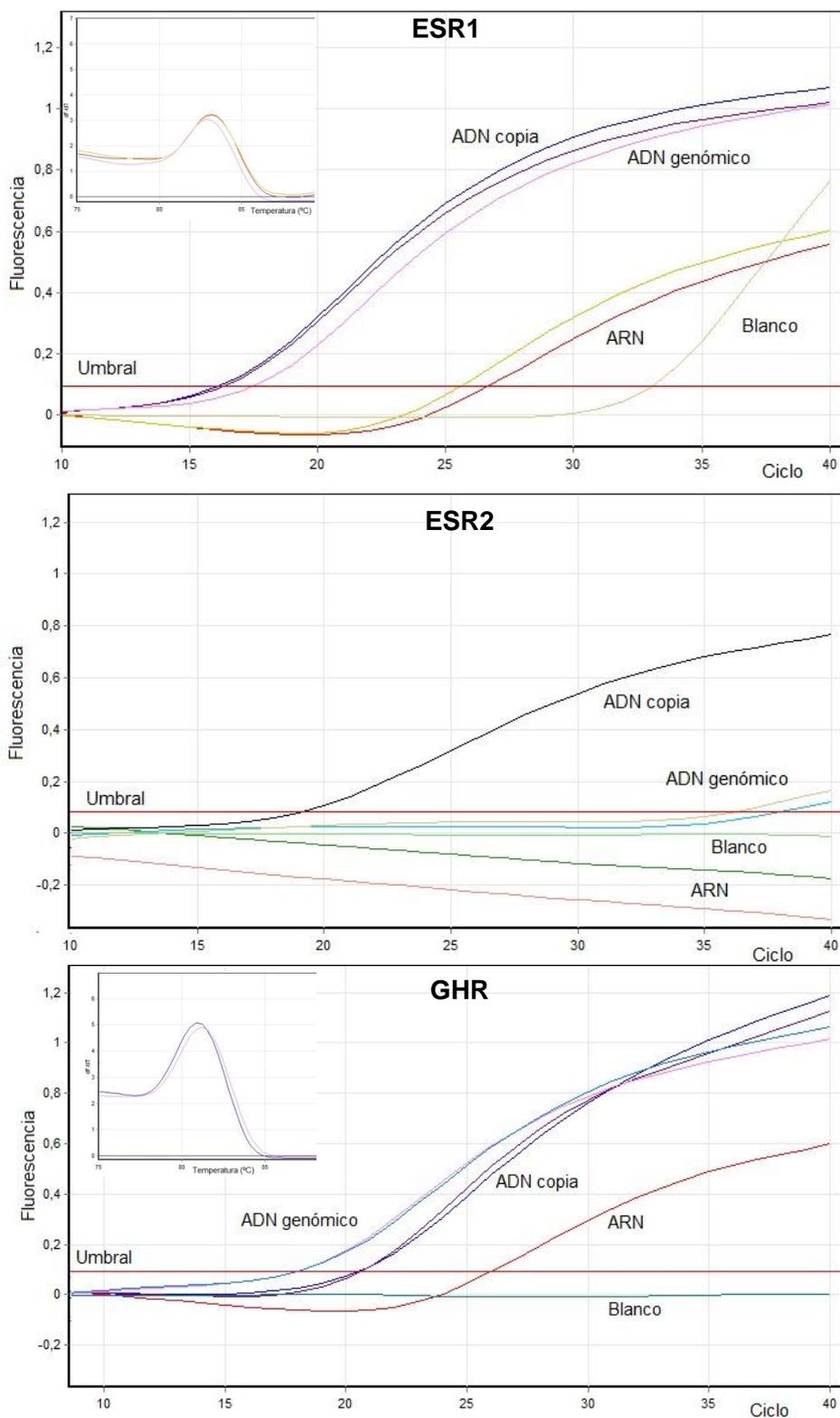


Figura 24. Gráficos de fluorescencia en función de los ciclos obtenidos como resultado de las PCR en tiempo real aplicadas a ADN genómico, ADN copia y ARN con los cebadores de ESR1, ESR2 y GHR. Los gráficos más chicos sobre ESR1 y GHR corresponden a los gráficos de fusión de los productos de amplificación a partir de ADN copia y ADN genómico.

Debido a que la técnica de PCR en tiempo real es altamente sensible y que dicha sensibilidad está influenciada, en parte, por la cinética de reacción de cada pareja de cebadores, se decidió determinar la eficiencia de cada par de cebadores. Con este fin se utilizaron diferentes diluciones de muestras, de las cuales se conocía que poseían niveles altos de ARNm para cada gen, se realizó PCR en tiempo real y se determinó el valor del CT. Se graficó CT en función del logaritmo de la concentración de ADN copia utilizado en la amplificación y se determinó la pendiente de dicho gráfico (Figura 25).

A partir de las pendientes calculadas y la aplicación de la fórmula presentada en metodología se obtuvo la eficiencia de cada par de cebadores (Tabla 5). Las eficiencias estimadas fueron mayores a 0,93 y menores que 1, la mayor diferencia entre cada uno de los pares de cebadores del gen de interés y los de 18S fue 0,02, características aceptables para este ensayo según el Manual de PCR de Invitrogen.

Se realizaron también amplificaciones para los controles provenientes de la retrotranscripción, control sin ARN (NTC) y control con ARN de muestra en la cual se espere alta concentración de ARNm de cada gen pero sin M-MLV (NRT). Ambos productos fueron amplificados, obteniendo CT considerablemente mayores que 30. Los mismos verificaron que no existía contaminación en los reactivos ni en el agua (NTC), y verificaron nuevamente que no existía contaminación de ADN genómico en el ARN (NRT) (Lattier y col. 2002).

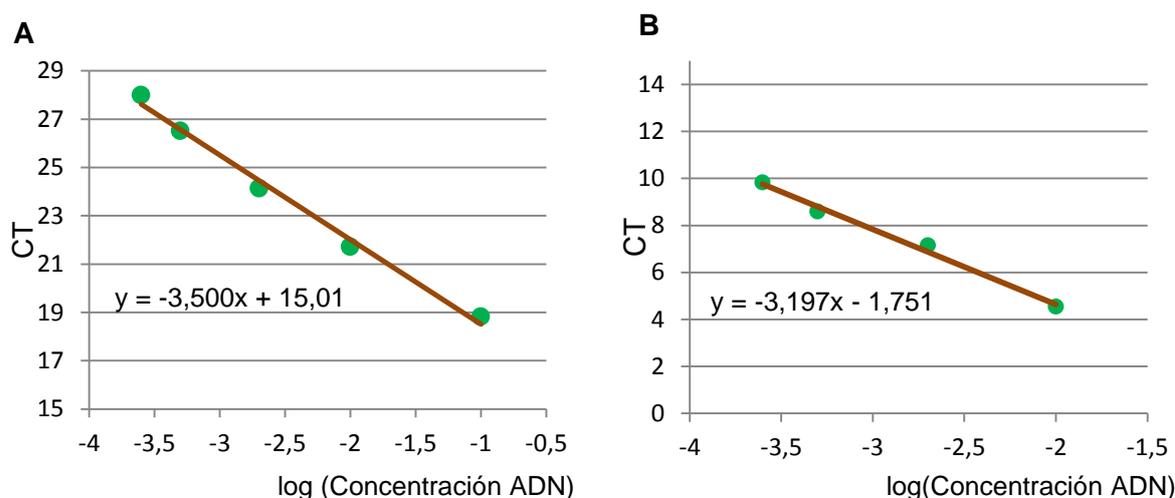


Figura 25. Gráficos de CT en función del logaritmo de la concentración relativa de ADN realizados a partir de la amplificación de diluciones de muestras control positivas. A. Amplificación de IGF-I y B. Amplificación de 18S a 57°C.

Tabla 5. Estudio de eficiencia de PCR en tiempo real para diferentes pares de cebadores.

Gen	Pendiente	$10^{(-1/pend)}$	Eficiencia ($10^{(-1/pend)} - 1$)
18S (60°C)	-3,38	1,98	0,98
VTG	-3,36	1,99	0,99
18S (55°C)	-3,40	1,97	0,97
ESR2	-3,45	1,95	0,95
GHR	-3,35	1,99	0,99
18S (59°C)	-3,46	1,95	0,95
ESR1	-3,42	1,96	0,96
IGF-I	-3,50	1,93	0,93

- *Estudio de la expresión génica de Pimephales promelas mediante Q-PCR*

Luego de poner a punto la técnica de Q-PCR y haber realizado los controles de calidad correspondientes, se aplicó dicha técnica a cada muestra de ADN copia por triplicado. Las curvas de fusión evidenciaron la presencia de un solo pico para cada gen con igual temperatura de fusión para cada uno de ellos, demostrando que los cebadores permitían amplificar un solo producto a la vez. En cada experimento se incluyeron blancos de corrida para evidenciar que no existía contaminación, sus curvas de amplificación para los diferentes cebadores mostraron CT mayores a 30 ciclos, o en casos de blancos con CT menores a este valor se correspondían con Tm diferentes a las de los genes estudiados (demostrando presencia de dímeros de primers). Las reacciones de PCR para aquellos genes que necesitaban las mismas temperaturas y dilución se realizaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones junto al 18S, obteniendo gráficos como los que se muestran en las figuras 26 a 29. A partir de dichos gráficos se obtuvieron los CT para cada corrida, ejemplo de algunos CT para diferentes genes se pueden observar en las tablas 6 a 9.

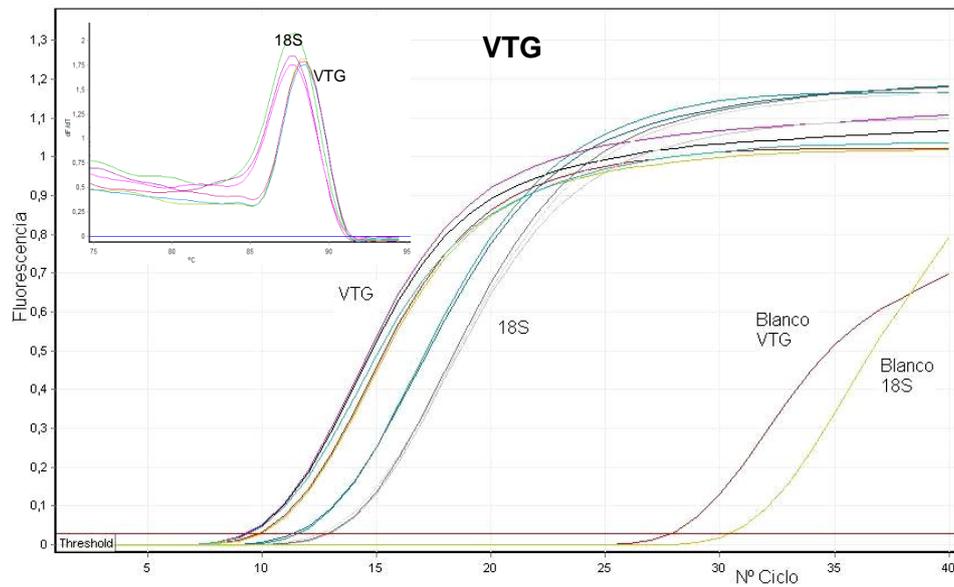


Figura 26. Gráfico obtenido a partir de la PCR en tiempo real con los cebadores para VTG y 18S. Se representa la fluorescencia en función del número de ciclos. Se grafican los resultados para 18S, y VTG de una hembra expuesta a 450 ng/l de E₂ y una hembra control. Se representaron también blancos para cada uno de los genes. En el gráfico superior se muestran curvas de fusión obtenidas para VTG y 18S en la que se grafica fluorescencia relativa en función de la temperatura.

Tabla 6. Ejemplo de valores de CT para VTG y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E₂

	CT (VTG)	CT (18S)
♂ expuesto	11,3	9,74
♂ control	17,8	9,72
♀ expuesta	11,6	9,98
♀ control	13,1	9,21

Tabla 7. Ejemplo de valores de CT para ZP3 y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E₂

	CT (ZP3)	CT (18S)
♂ expuesto	23,7	6,74
♂ control	24,4	6,72
♀ expuesta	18,0	6,72
♀ control	20,1	6,73

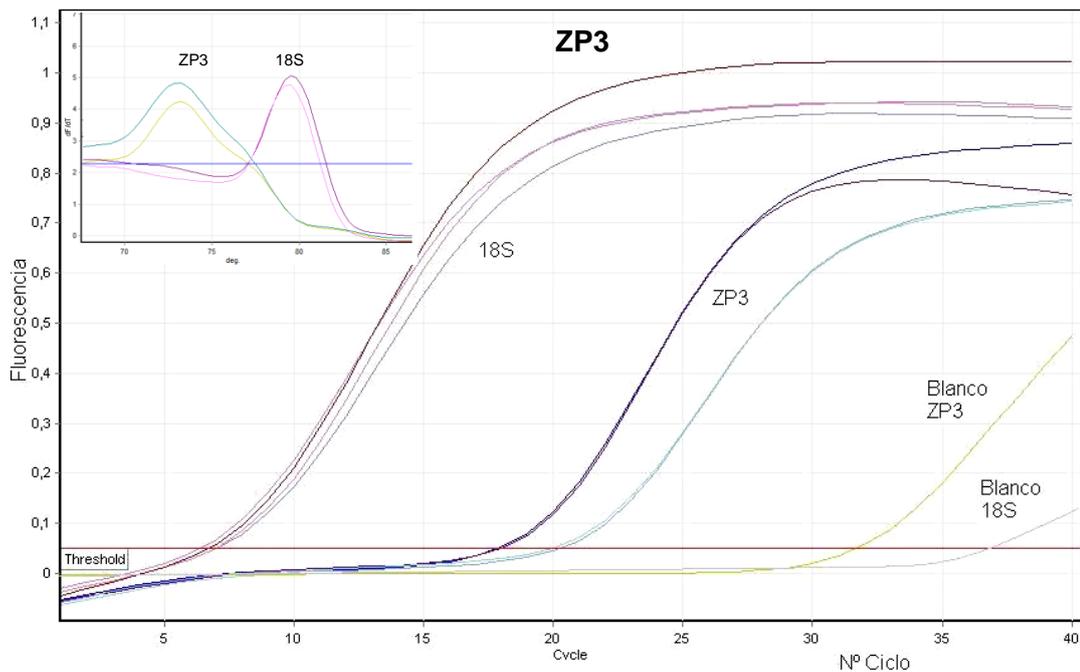


Figura 27. Gráficos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real con cebadores para ZP3 y 18S. Se representa la fluorescencia en función del número de ciclos. Se grafican los resultados para 18S, y ZP3 de una hembra expuesta a 450 ng/l de E_2 y una hembra control. Se representaron también blancos para cada uno de los genes. En el gráfico superior se muestran curvas de fusión obtenidas para ZP3 y 18S en la que se grafica fluorescencia relativa en función de la temperatura.

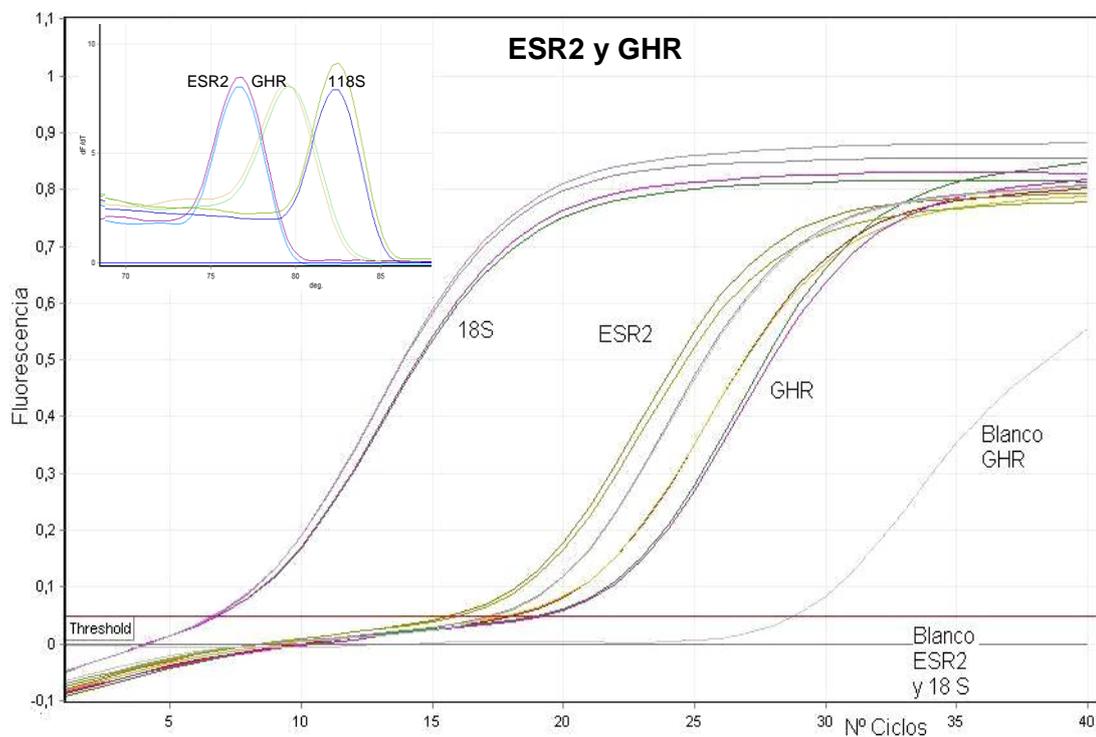


Figura 28. Gráficos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real con cebadores para ESR2, GHR y 18S. Se representa la fluorescencia en función del número de ciclos. Se grafican los resultados para ESR2, GHR y 18S de un hembra expuesta a 450 ng/l de E_2 y una hembra control. Se representaron también blancos para cada uno de los genes. En el gráfico superior se muestran curvas de fusión obtenidas para ESR2, GHR y 18S.

Tabla 8. Ejemplo de valores de CT para ESR2, GHR y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E₂

	CT (ESR2)	CT (GHR)	CT (18S)
♂ expuesto	18,2	21,8	8,3
♂ control	16,1	18,1	7,8
♀ expuesta	15,9	18,0	6,8
♀ control	17,4	19,1	6,7

Tabla 9. Ejemplo de valores de CT para ESR1, IGF-I y 18S obtenidos para machos y hembras controles y expuestos a 450 ng/l de E₂

	CT (ESR1)	CT (IGF-I)	CT (18S)
♂ expuesto	16,5	17,8	3,1
♂ control	17,1	17,4	2,25
♀ expuesta	17,6	24,6	2,52
♀ control	16,2	22,4	2,52

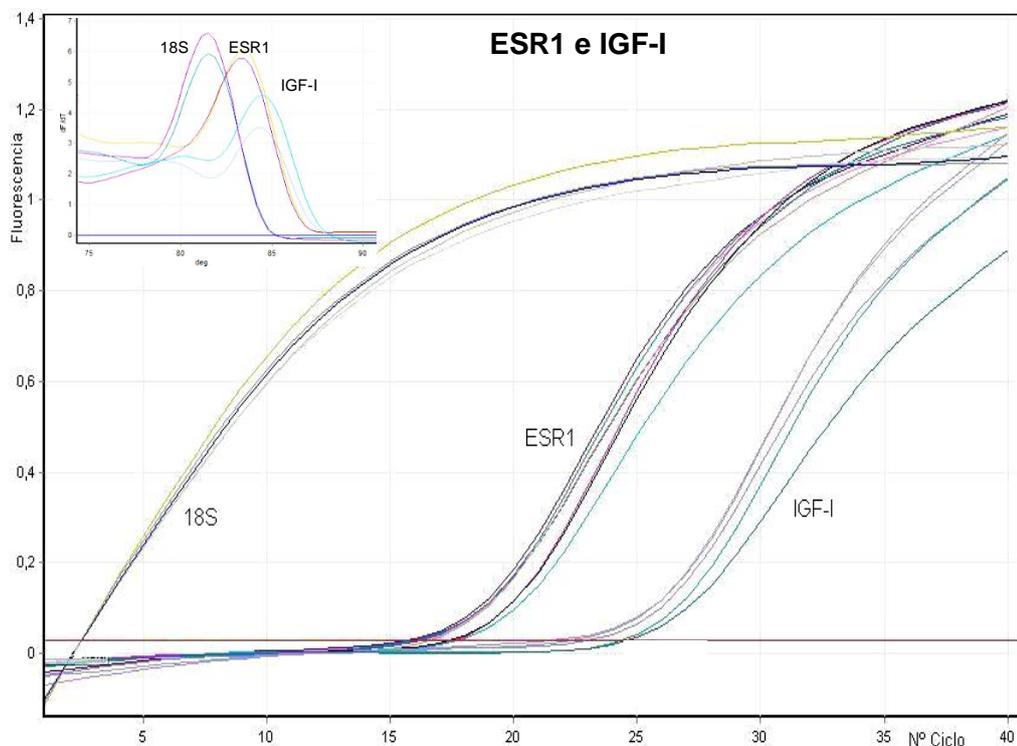


Figura 29. Gráficos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real, con cebadores para ESR1 e IGF-I. Se grafican los resultados para 18S, ESR1 e IGF-I de una hembra control y una hembra expuesta a 450 ng/l de E₂, cada ensayo se realizó por triplicado. En el gráfico superior se muestran curvas de fusión obtenidas para ESR1, IGF-I y 18S.

Se realizaron comparaciones estadísticas de la expresión de cada gen para hembras y machos utilizando el programa REST versión 2009. Para ello se trabajó ingresando a dicho software los CT obtenidos para cada ADN copia, con cada par de cebadores en los diferentes tratamientos.

En la figura 30 y la tabla 10 se puede observar el conjunto de los resultados obtenidos para los seis genes estudiados en hembras expuestas a cada una de las cuatro condiciones. Cuando se analizaron los CT para VTG en hembras, se observó un aumento en el nivel de

ARNm de dicho gen luego de la exposición a E_2 tanto a la concentración 150 ng/l como a 450 ng/l (p valor 0,006 y 0,026 respectivamente). Por otro lado al realizar el mismo análisis para hembras expuestas a agua de arroyo y efluente industrial observamos una disminución significativa de ARNm (p valor 0,047 y 0,002 respectivamente).

Al ejecutar el análisis de datos de ZP3 en hembras, se observó que al exponerlas a 150 ng/l de E_2 no hubo cambios significativos en los niveles de ARNm (p valor=0,72), mientras que al hacer lo mismo con 450 ng/l de E_2 se apreció un aumento significativo (p valor<0,001). Por otro lado el análisis estadístico de ZP3 tanto para hembras expuestas a agua de arroyo como a efluente industrial no mostró variación estadísticamente significativa en el nivel de ARNm (p valor=0,067 para agua de arroyo y 0,33 para efluente industrial).

En cuanto a ESR1, no se observó cambio en el nivel de ARNm en hembras luego de exponerlas a ambas concentraciones de E_2 (p valor=0,51 y 0,45 respectivamente). Pero, por otro lado, hubo un aumento significativo de dicho ARNm en hembras expuestas al agua de arroyo (p valor=0,042) y una disminución en hembras expuestas al efluente industrial (p valor=0,001).

El nivel de ARNm de ESR2 no se vio modificado significativamente en hembras cuando se realizaron los ensayos con E_2 , tanto a 150 como a 450 ng/l (p valor=0,93 y 0,24), así como tampoco en la exposición al Arroyo Fray Bentos (p valor=0,14). Sin embargo, dicha expresión sí se vio alterada en los peces hembras durante la exposición al efluente industrial, sufriendo un incremento significativo (p valor<0,001).

La expresión de ARNm de GHR en hembras no se percibió alterada luego de la exposición a ninguna de las concentraciones de E_2 (p valor=0,35 para 150 ng/l y 0,064 para 450 ng/l), ni tampoco cuando se expusieron al agua de arroyo (p valor=0,083). Sólo se vio modificada durante la exposición al efluente industrial, durante la cual sufrió un aumento de 9,6 veces (p valor<0,001).

Por último, el nivel ARNm de IGF-I no se vio modificado en hembras expuestas al E_2 de concentración 150 ng/l (p valor= 0,068), pero sufrió un significativo descenso de la expresión al utilizar 450 ng/l de E_2 (p valor<0,001). Al exponer las hembras al agua de arroyo no se observó modificación de la expresión (p valor=0,93), mientras que en aquellas hembras expuestas al efluente industrial hubo un aumento significativo de 5,45 veces respecto a los controles (p valor<0,001).

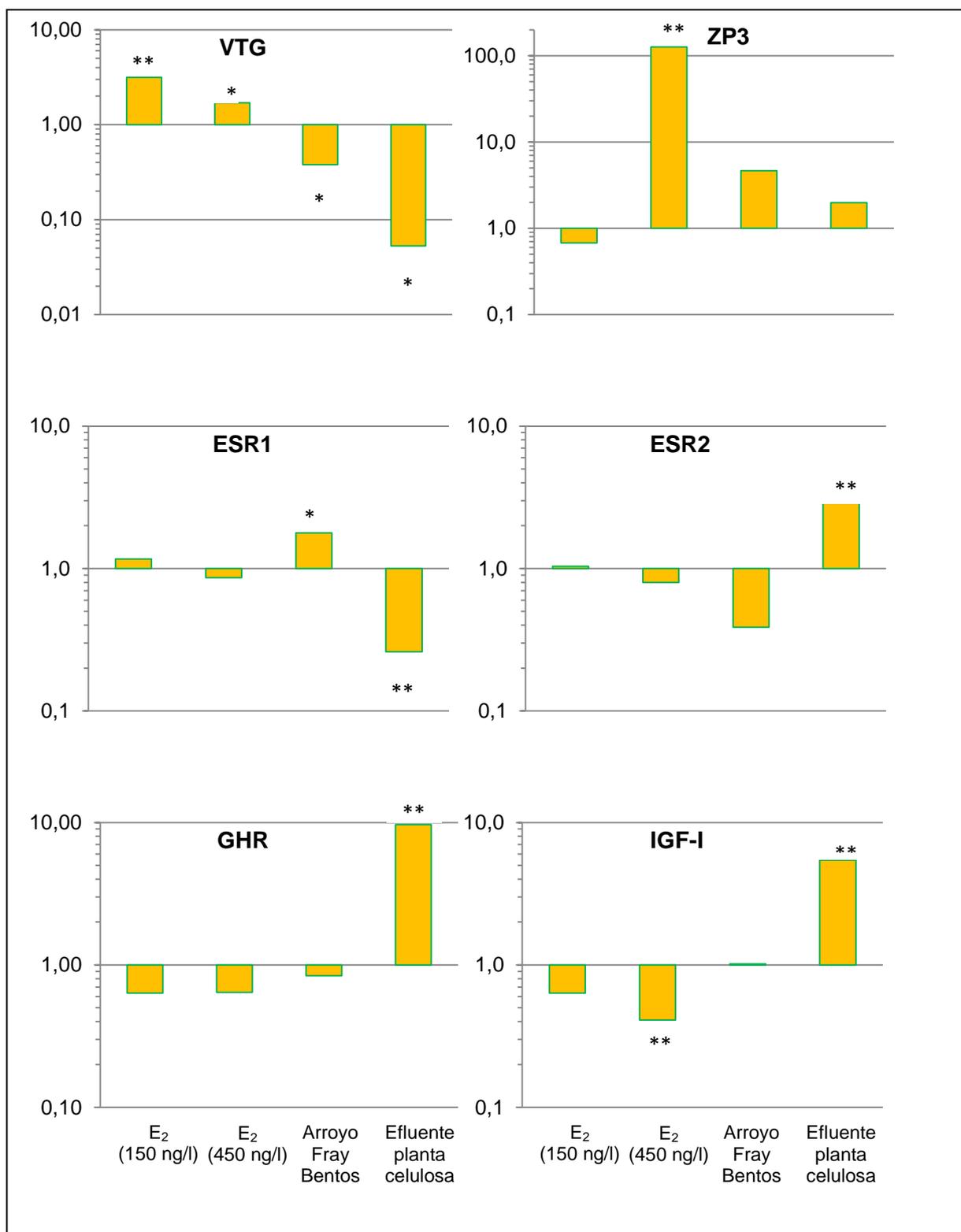


Figura 30. Resultado del análisis de la expresión relativa de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I para hembras expuestas a 150 ng/l, 450 ng/l de E₂, Arroyo Fray Bentos y efluente industrial. En el eje de las ordenadas se grafica la expresión relativa de *P. promelas* expuestas a las muestras respecto a los controles. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre controles y expuestos, * p valor < 0.05 y ** p valor < 0.01

Tabla 9. Resultados obtenidos en la PCR en tiempo real para los ARNm de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I. En la primer fila para cada gen se expresan las veces que se expresa respecto al control considerado cero, en la siguiente el desvío estándar de los resultados y en la tercer fila el pvalor.

	VTG		ZP3		ESR1		ESR2		GHR		IGF-I		
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	
E₂ (150 ng/ml)	3,15	13,62	0,68	0,92	1,17	0,83	1,04	1,04	0,64	0,33	0,64	0,52	Expresión relativa
	0,51 - 18,59	0,21 - 19,0	0,001 - 8,22	0,29 - 28,7	0,367 - 4,72	0,30 - 2,056	0,10 - 8,31	0,10 - 8,31	0,04 - 7,09	0,02 - 4,96	0,12 - 2,10	0,27 - 0,81	Intervalo de confianza
	0,006*	< 0,001*	0,717	0,721	0,508	0,316	0,931	0,938	0,349	0,014*	0,068	< 0,001*	P valor
E₂ (450 ng/ml)	1,70	40,55	126,20	1,70	0,86	2,33	0,80	0,59	0,64	0,75	0,41	0,72	Expresión relativa
	0,56 - 5,30	13,45- 125	0,18 - 170	0,88 - 2,10	0,33 - 2,09	1,97 - 3,01	0,30 - 2,01	0,22 - 1,27	0,20 - 2,10	0,42 - 1,47	0,16 - 0,99	0,54 - 0,87	Intervalo de confianza
	0,026*	< 0,001*	< 0,001*	0,048*	0,453	< 0,001*	0,241	0,055	0,064	0,020*	< 0,001*	< 0,001*	P valor
Arroyo Fray Bentos	0,38	0,81	4,65	6,07	1,78	2,25	0,39	1,04	0,84	1,56	1,02	0,17	Expresión relativa
	0,05 - 2,62	0,11 - 4,23	0,63 - 50,4	4,36 - 8,19	0,55 - 3,63	0,55 - 4,50	0,02 - 8,57	0,57 - 1,89	0,013-6,61	0,847-2.621	0,41 - 2,56	0,05 - 0,48	Intervalo de confianza
	0,047*	0,497	0,067	< 0,001*	0,042*	0,042*	0,143	0,732	0,083	< 0,001*	0,935	< 0,001*	P valor
Efluente industrial	0,05	0,61	1,99	0,15	0,26	0,80	2,90	2,13	9,67	2,33	5,45	1,50	Expresión relativa
	0,00 - 1,95	0,14 - 2,99	0,02 - 91,5	0,09 - 0,23	0,02 - 1,40	0,40 - 1,28	0,77 - 9,85	0,56 - 7,67	2,56- 37,0	1,16 - 4,53	1,53 - 57,34	0,64 - 3,56	Intervalo de confianza
	0,022*	0,202	0,329	< 0,001*	< 0,001*	0,060	< 0,001*	0,003*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	0,010*	P valor

Cuando se expusieron peces machos a E_2 se observó un aumento significativo de la expresión de ARNm de VTG (Tabla 10 y Figura 31). Al ser expuestos a 150 ng/l el aumento respecto a los controles fue de 13,6 veces (p valor $<0,001$) y al exponerse a 450 ng/l el mismo fue de 40,5 veces (p valor $<0,001$). Mientras que cuando los machos fueron expuestos a agua de arroyo y efluente industrial no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en este ARNm (p valor: 0,20 y 0,50 respectivamente).

En el caso de ZP3 no se observaron cambios en el nivel de ARNm en machos cuando los mismos fueron expuestos a 150 ng/l de E_2 (p valor=0,72), pero sí hubo un aumento significativo luego de la exposición a 450 ng/l. Luego de realizar la exposición al Arroyo Fray Bentos el nivel de ARNm sufrió un aumento significativo (p valor $<0,001$), mientras que luego de la exposición al efluente industrial no se observaron cambios del mismo.

Al igual que ocurrió para ZP3, el nivel de ARNm de ESR1 en machos no se vio modificado en peces expuestos a 150 ng/l de E_2 (p valor=0,31), pero se incrementó significativamente luego de la exposición a 450 ng/l de E_2 (p valor $<0,001$). Cuando los peces machos se expusieron al agua de arroyo mostraron un incremento de ARNm de ESR1 (p valor= 0,042), mientras que luego de ser expuestos al efluente industrial no mostraron alteraciones (p valor=0,060).

La expresión de ARNm de ESR2 no se vio modificada significativamente en machos cuando se realizaron los ensayos con E_2 y con el agua de arroyo. Dicha expresión en cambio se vio modificada luego de la exposición al efluente industrial, sufriendo un incremento significativo (p valor=0,003).

El nivel de ARNm de GHR disminuyó en aquellos machos expuestos a ambas concentraciones de E_2 (p valor= 0,014 y 0,020 respectivamente). Mientras que, por el contrario se incrementó en forma significativa en peces expuestos a agua de arroyo (p valor=0,001) y efluente industrial (p valor $<0,001$).

Al analizar los niveles de ARNm de IGF-I en machos expuestos a ambas concentraciones de E_2 se observó una disminución significativa de expresión (p valor $<0,001$ en ambos casos). Iguales resultados se obtuvieron luego de la exposición al agua de arroyo (p valor $<0,001$). Por el contrario, la exposición al efluente industrial provocó un significativo aumento de dicho ARNm (p valor=0,01).

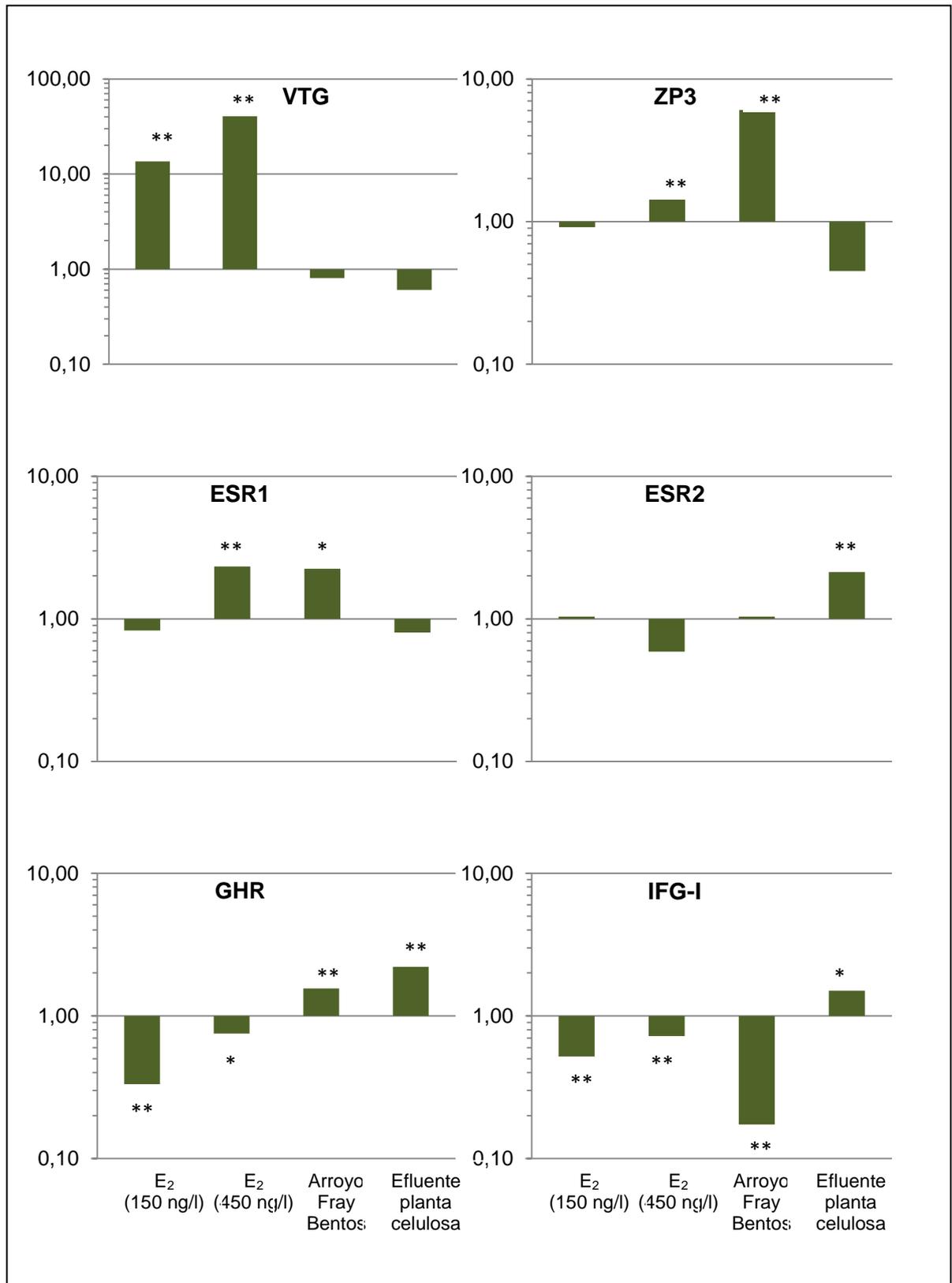


Figura 33. Resultado del análisis de la expresión relativa de los genes VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I para machos expuestos a 150 ng/l, 450 ng/l de E₂, arroyo Fray Bentos y efluente industrial. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre controles y expuestos, * p valor < 0.05 y ** p valor < 0.01

4.2. Actividad estrogénica determinada mediante YES

La levadura modificada ha respondido frente a la presencia del compuesto estrogénico, 17 β -Estradiol. La misma ha aumentado su actividad β -galactosidasa al exponerse a dicho disruptor (Figura 32), el aumento de la actividad relativa respecto al logaritmo de la concentración de E₂ es de tipo sigmoideo, entre 1,75 ng/l y 7,5 μ g/l de E₂.

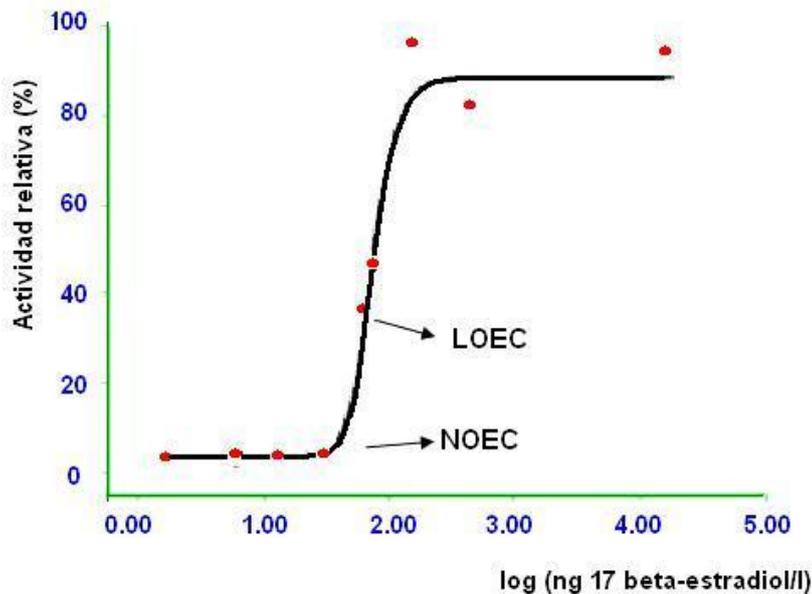


Figura 32. Actividad relativa de la β -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante obtenida luego de la exposición de dichas levaduras a diferentes concentraciones de 17 β -estradiol.

Para los datos de actividad relativa obtenidos se realizó un ajuste según la función de Hill y se obtuvieron los valores de parámetros de la ecuación los cuales se observan en la Tabla 11. Se puede apreciar que la respuesta máxima obtenida está entre 59 y 99 % de actividad total. Se determinó también el valor de K_m (1.85 ± 0.09) el cual corresponde al logaritmo de la concentración de E₂ para el que la actividad relativa alcanza el 50% del total. A partir del valor de K_m calculado se calculó el EC50 (concentración efectiva 50%), concentración de 17 β -estradiol con la cual se produce una actividad estrogénica igual al 50 % del máximo obtenido, el EC50 se calcula como la potencia en base 10 del valor de K_m y es de 71 ± 13 ng/l. Este valor concuerda con los obtenidos con la misma cepa por Gaido en 1997 ($65,9 \pm 8$ ng/l) y por Routledge en 1996 ($55,3 \pm 18$ ng/l).

El coeficiente de correlación de la curva de calibración fue 0,976, aceptable según publicaciones anteriores en que un $R^2 > 0,95$ era considerado un buen valor (Nelson, 2007).

Se determinaron también los valores NOEC (mayor concentración sin efecto observable) y LOEC (menor concentración con efecto observable), los cuales fueron 30 y 59 ng/l respectivamente. Si comparamos los resultados con los obtenidos por Gaido (1997) y Routledge (1996): 8 ng/l (NOEC) y 27 ng/l (LOEC), los valores de este estudio son mayores.

Para determinarlos más precisamente, restaría realizar mayor número de ensayos con nuevos puntos entre ambas concentraciones.

Tabla 11. Valores de los parámetros obtenidos para la función de Hill. Calculada luego del ajuste de datos con el programa SIMFIT

Parámetro	Valor
V_{\max}	79 ± 20
K_m	1.85 ± 0.09
C	3.880
n	19.87
$r^2=0.976$	
$Re\ spuesta = \frac{79,07 \times Dosis^{19,87}}{1,851^{19,87} + Dosis^{19,87}} + 3,880$	

El límite de detección (LD) se determinó a partir de la realización de 10 blancos, con el agregado de 5 µl de etanol absoluto al cultivo de levadura modificada. Se calculó como la concentración correspondiente de E₂ para la actividad relativa promedio obtenida más tres desvíos estándares. El resultado obtenido fue de 55 ng/l (21,9 % de actividad relativa). Coincide este valor con el EC20 para este ensayo, valor arbitrario utilizado como límite de detección por Lorenzen (2004).

Tabla 12. Resultados de estrogenicidad para arroyo Fray Bentos y efluente industrial

Muestras	Actividad relativa promedio (%)	Resultado (ng/l)
Arroyo Fray Bentos	21	No detectable
Efluente industrial	21	No detectable
LD: 55 pg/l		

Las muestras ensayadas no presentaron actividad estrogénica por encima del límite de detección del método (Tabla 12). Para el ensayo de cada muestra, como se describió en metodología, se realizó una toma de 1 litro y luego de su filtración se concentró hasta un volumen final de 1 ml, por lo que el límite de detección considerado para compuestos estrogénicos en la muestra fue de 55 pg/l. Ambas muestras arrojaron actividades estrogénicas menores al límite de detección.

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la posible capacidad de disrupción endócrina en el agua del Arroyo Fray Bentos y en un efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario. Para ello se realizaron ensayos de exposición de 21 días con *Pimephales promelas* frente a dichas muestras, a controles positivos y negativos. Se compararon características anatómicas, puesta de huevos, niveles de proteína VTG medidos mediante un Kit ELISA específico para dicha especie y niveles de ARNm de genes implicados en la ovogénesis y la regulación endócrina por medio de RT-Q-PCR. También se utilizó un biosensor, *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, para determinar la presencia de compuestos estrogénicos en ambas muestras.

El tiempo de exposición utilizado en el presente trabajo fue seleccionado en base a investigaciones anteriores. En las mismas, los tiempos aplicados fueron muy variables, desde relativamente largos, de 21 a 30 días, con el fin de encontrar modificaciones en algún parámetro fisiológico (Rickwood y col. 2006), hasta períodos muy cortos de 2 a 7 días, considerados suficientes para identificar inducción o represión de genes específicos y de procesos metabólicos (Denslow y col. 2004). El período considerado en este caso fue de 21 días, tiempo suficiente para poder evaluar no solo efectos a nivel molecular sino también a nivel fisiológico.

Hasta la fecha existen en la bibliografía muy pocos antecedentes que analicen muestras químicas complejas como lo son las estudiadas en esta investigación (Werner y col. 2010; Thorpe y col. 2009; Rickwood y col. 2008) y dentro de ellas una minoría ha realizado análisis de los niveles de ARNm de varios genes indicadores de disrupción como los realizados en el presente trabajo (Werner y col. 2010). Por el contrario, la mayoría de los estudios existentes al día de hoy se basan en conocer los efectos de determinados compuestos químicos en forma individual, como por ejemplo el EE₂, el agonista de estrógenos más ampliamente estudiado (Miles-Richardson y col. 1999; Seki y col. 2002; Miracle y col. 2006; Warner y col. 2012; Lerner y col. 2012, Hanson y col. 2012; Adedeji y col. 2012).

Luego de transcurridos los 21 días de exposición en el presente ensayo, ninguna de las dos muestras objetivos ni controles positivos de estrogenicidad, a los cuales se expusieron los *P. promelas*, produjeron efectos sobre la morfología o las características anatómicas de los peces. Estos resultados son comparables a los obtenidos en varios ensayos con *P. promelas* expuestos por el mismo período a muestras similares (Werner y col. 2010, Filby y Tyler 2007^B, Thorpe y col. 2007).

Los pesos de dichos ejemplares fueron de $1,7 \pm 0,3$ g para las hembras y de $2,1 \pm 0,4$ g para los machos, se estimaron los largos en $4,8 \pm 0,2$ cm en hembras y en $5,6 \pm 0,4$ cm en machos, características similares a las descriptas para dicha especie por Ankley y Johnson (2004).

Los KFs obtenidos tampoco mostraron diferencias, indicando con ello que el balance energético de los peces se mantuvo constante. Existen en la bibliografía antecedentes de cambios en el KF de *P. promelas*, pero en condiciones diferentes a este ensayo, como por ejemplo, incrementos de KF de adultos luego de exponerlos a efluentes de plantas de pulpa de

celulosa durante varios meses (Environmet Canada, 2003), de larvas frente a 1000 ng/l de E₂ (Liao, 2009), o de juveniles frente a 760 µg/l del fitoestrógeno Genisteina (Panter y col. 2002).

No se observaron tampoco modificaciones en los valores de pesos gonadales, ni en los IGS en los ensayos de exposición para ninguno de los sexos. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en varios trabajos anteriores, por ejemplo al exponer *P. promelas* a 15 ng/l de EE₂ (Thorpe y col. 2009), o a un efluente cloacal (Ankley y col. 1998) durante periodos de tiempo similares. Cabe aclarar que según la publicación de Nishihara y col. (2000) el EE₂ es alrededor de 200 veces más estrogénico que el E₂, y que dicha relación de actividad se mantiene del mismo orden a todos los niveles de concentración. Los valores de IGS encontrados en nuestros ensayos fueron entre 10 y 14 % para las hembras y entre 1 a 1,7 % para los machos, similares a los reportados en la bibliografía, los cuales rondan entre 8 y 14 % para hembras y entre 1 y 2 % para machos (Ankley y col. 1998).

Tabla 13. Efectos evaluados mediante RT-Q-PCR en los ARNm de VTG, ZP3, ESR1, ESR2, GHR e IGF-I. Las casillas de color rojo representan que existió un efecto estrogénico y las casillas celestes la presencia de un efecto opuesto al estrogénico.

	VTG		ZP3		ESR1		ESR2		GHR		IGF-I	
	HEMBRAS	MACHOS										
E2 (150 ng/ml)	Red	Red	White	White	White	White	White	White	White	White	Red	Red
E2 (450 ng/ml)	Red	Red	Red	Red	White	Red	White	White	White	White	Red	Red
Arroyo Fray Bentos	Blue	White	White	Red	Red	Red	White	White	White	Blue	White	Red
Efluente industrial	Blue	White	White	White	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

Controles positivos de estrogenicidad

Cuando los peces se expusieron a 150 ng/l de E₂ la puesta de huevos se vio incrementada significativamente luego del día 8, mientras que cuando se lo hizo a una concentración mayor (450 ng/l de E₂) no se observó modificación en la misma. Según estos resultados el efecto estrogénico parece producirse solo a bajas concentraciones, no teniendo respuestas a mayores niveles estrogénicos. Dicha observación tiene cierta similitud con los resultados obtenidos por Pawlowski y col. (2004), quienes luego de exponer *P. promelas* durante 21 días a EE₂, observaron un incremento en el número de huevos a bajas concentraciones (1 ng/l) y una disminución a mayores niveles (100 ng/l). En el presente caso la concentración 450 ng/l de E₂ es equivalente a una intermedia respecto a las aplicadas por Pawlowsky (según lo publicado por Nishihara y col. (2000) y antes mencionado) por lo que dicha concentración probablemente fue insuficiente para causar el mismo efecto que el observado por Pawlosky a 100 ng/l de EE₂.

En el presente trabajo, se determinó también la concentración de la proteína VTG por medio de ELISA específico en homogeneizados de hígados de peces de cada acuario. Luego de la exposición a ambas concentraciones de E₂ la VTG en machos se incrementó significativamente. Dicho incremento fue mayor a mayores concentraciones de E₂, a tal punto

que el nivel de VTG producida en machos llegó a superar luego de la exposición a 450 ng/l los niveles producidos por las hembras en condiciones normales, dando la pauta de que en machos existe una relación dosis respuesta entre la producción de VTG y la concentración de E_2 a la cual se exponen. A igual conclusión llegaron Rani y col. (2009) luego de exponer *Danio rerio* a diferentes concentraciones de E_2 y observar mediante ELISA que la producción de la proteína VTG en machos se incrementaba proporcionalmente con la dosis.

La pobre capacidad de los machos de eliminar la VTG del plasma y la acumulación de la misma son probablemente las responsables de generar un desequilibrio en sus organismos (Thorpe y col. 2007). La inducción de la proteína VTG en machos se asocia con la presencia de efectos adversos sobre la salud de los mismos y su supervivencia. Aunque también se han reportado consecuencias ambientales más amplias, como alteraciones en la reproducción, en la producción de huevos de las hembras y la viabilidad de la descendencia (Thorpe y col. 2007).

En ensayos similares, se observó por medio de ELISA la inducción de proteína VTG en machos *P. promelas* luego de la exposición a 120 ng/l (Van den Belt, 2004) y 29 ng/l de E_2 (Thorpe y col. 2007). Aunque no se utilizaron concentraciones tan bajas, en el presente ensayo se verificó que la maquinaria productora de VTG de machos responde a un nivel de 150 ng/l de E_2 y que este es un buen indicador de estrogenicidad en machos a partir de dicha concentración de E_2 o equivalente.

En las hembras expuestas a 150 ng/l de estradiol se observó disminución de la proteína VTG en hígado. Dicha disminución se opone a lo esperado y al incremento del número de huevos, pero coincide con lo descrito por Crago y col. (2011), quienes observaron que la expresión de VTG en hembras de *P. promelas* se relacionaba directamente con la producción de huevos durante los primeros 11 días de exposición a estradiol, perdiendo luego la proporcionalidad entre las mismas y comenzando a disminuir. Dicho autor propone como probable causa de ello el estrés que los peces sufren durante la exposición a niveles anormales de estrógenos,

A partir de los hígados de peces expuestos a E_2 y a ambas muestras objetivo se extrajo ARN total, se obtuvo ADN copia por retrotranscripción, y este fue utilizado como molde para reacciones de amplificación por Q-PCR con cebadores específicos que permitieran cuantificar en forma relativa los niveles de ARNm de ciertos genes de interés implicados en la regulación endócrina.

Uno de los ARNm estudiados fue el de VTG, el nivel de expresión de este sufrió un aumento significativo en ambos sexos luego de los ensayos de exposición a ambas concentraciones de estradiol. Dichos resultados concuerdan con lo esperado debido a que el estradiol induce en el hígado la síntesis de VTG y coinciden con los resultados de varios trabajos donde se aplicó RT-Q-PCR, como fueron los obtenidos por Biales y col. (2007) luego de exponer *P. promelas* a 10 ng/l de EE_2 durante 21 días, y por Lattier y col. (2002) exponiendo a 20 ng/L de EE_2 durante el mismo período de tiempo.

La expresión del ARNm de ZP3 también se vio incrementada significativamente en ambos sexos, pero solamente luego del tratamiento con 450 ng/l de E_2 . Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Aruke (2006) el cual luego de exponer *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris) a 10 ng/L de EE_2 observó mediante micro arreglos y RT-Q-PCR un incremento en el ARNm de ZP3 hepática.

Tanto para el nivel de expresión proteica de VTG como de los ARNm de VTG y de ZP3 se esperaba un incremento más significativo en machos que en hembras luego de la exposición a agentes estrogénicos. Esto se debe a que las hembras tienen en forma natural una mayor expresión de dichos ARNm y proteínas y a que probablemente dicha expresión sea mucho más regulada que en machos debido a su necesidad habitual de síntesis (Lattier, 2002). De todas formas esta condición se cumplió solo para VTG, ya que ZP3 incrementó más su expresión en hembras que en machos luego de exponerse a E_2 , sugiriendo con ello que la regulación de ambos genes es diferente.

Respecto a la respuesta de los receptores de estrógenos frente a estradiol no se obtuvieron cambios en la expresión de ARNm de ESR2 luego de la exposición a ambas concentraciones de E_2 , mientras que el nivel de ARNm de ESR1 se incrementó solo en machos luego de la exposición a 450 ng/l. Investigaciones anteriores muestran resultados similares, Filby y Tyler (2005) mediante un ensayo de exposición de 14 días a niveles similares de E_2 y la aplicación de las mismas técnicas moleculares en hígados de machos, detectaron un incremento en el ARNm de ESR1 y no observaron modificaciones en la expresión de ESR2. Años más adelante se volvió a describir en la misma especie que el nivel de ARNm de ESR2 no aumentaba por exposición a estrógenos (Chakraborty y col. 2011).

Según lo publicado en la bibliografía la inducción de la expresión de VTG es consecuencia de la interacción de estrógenos con sus receptores (ESR1) y la acción de estos sobre los ERE ubicados en los promotores de VTG. La mayor expresión de VTG pero no de ESR1 luego de los 21 días de exposición, sugiere que la expresión de ESR1 se puede haber incrementado solo transitoriamente a los pocos días de tratamiento (induciendo la síntesis de VTG) sin poder ser apreciados cambios al final del período. Resultados similares describieron Adedeji y col. (2012), los cuales expusieron *P. promelas* a 10 ng/l de un estrógeno artificial como el DES durante 10 días, obteniendo incremento de ARNm de ESR1 en hígado a la mitad del período y disminución al final del mismo.

Luego de la exposición a E_2 se observó disminución en la expresión de ARNm de GHR e IGF-I de machos. En condiciones normales GH actúa sobre las células hepáticas interaccionando con GHR e induciendo el incremento de su expresión. El aumento de GHR a su vez provoca que la expresión de IGF-I hepática también se incremente, relacionándose ambos incrementos con el crecimiento somático (Filby y Tyler, 2007^A). Por el contrario la presencia de sustancias estrogénicas endógenas o exógenas (como en el presente ensayo) disminuye la expresión de GHR, implicando también una disminución en IGF-I. El mecanismo exacto de cómo los estrógenos actúan sobre los GHR no es conocido aún, probablemente reduzcan la acción de GHR, regulando negativamente su expresión, suprimiendo las señales enviadas por GH, o ambas al mismo tiempo (Lerner y col. 2012).

Otros investigadores obtuvieron resultados similares. Filby y Tyler (2007)^A, luego de exponer 21 días *P. promelas* a 10 ng/l de EE_2 , observaron mediante RT-Q-PCR, disminución de los niveles de ARNm tanto de GHR como de IGF-I en machos. Similares resultados fueron obtenidos por Nelson en 2010, luego de realizar el mismo ensayo con 35 ng/l de E_2 durante 14 días de exposición.

Exposición a Arroyo Fray Bentos

En el anexo II se presentan los resultados obtenidos en otra investigación llevada a cabo en el LATU, en la cual se estudió la presencia de compuestos estrogénicos en el agua de Arroyo Fray Bentos durante el período en el cual fue extraída la muestra para el presente trabajo. Dentro de los compuestos estrogénicos que fueron detectados se encuentran; bajas concentraciones de 4-para-nonilfenol, Para-ter-octilfenol, sustancias presentes en detergentes y tensioactivos eliminadas en efluentes industriales y domésticos, ambos compuestos con efecto disruptor estrogénico descrito sobre GHR e IGF-I (Lerner y col. 2012), y otros como estrona, estradiol y estriol (E_1 , E_2 y E_3 respectivamente), eliminados en efluentes domésticos cloacales. Además de los compuestos mencionados, no se puede descartar la presencia de otros no investigados en dicha oportunidad. Todos ellos podrían ser la causa de los efectos disruptores, a su vez independientemente de sus concentraciones, los mismos pueden interactuar entre ellos potenciando y/o antagonizando sus efectos.

En el presente trabajo, luego de 12 días de exposición al agua del Arroyo Fray Bentos la cantidad de huevos puestos en los sustratos sufrió un incremento drástico respecto a los controles, llegando a un total de 4500 huevos al día 21, el doble de los totales obtenidos en los controles. Los gráficos de frecuencia acumulada en función de los días al exponer los peces al agua de arroyo y a 150 ng/l de E_2 poseen comportamientos similares, diferenciándose en que el incremento de puesta de huevos en acuarios con agua del Arroyo Fray Bentos comenzó a observarse en forma más tardía que en aquellos con E_2 , día 12 contra día 8 respectivamente, pero generando en el primer caso un incremento mayor en la frecuencia acumulada de puesta. Probablemente estos resultados se deban a la presencia de compuestos con acción estrogénica, pero diferentes al E_2 , los cuales generan un efecto mayor pero más tardío que este último.

Luego de exponer los peces *P. promelas* al agua de Arroyo Fray Bentos también se midió la concentración de proteína VTG por medio de ELISA específico y el nivel de ARNm de VTG por RT-Q-PCR. Se observó en hembras disminución de la expresión de la proteína y del ARNm de VTG. Ambos efectos concuerdan entre sí, sin embargo debido a los efluentes municipales vertidos al arroyo y el potencial estrogénico descrito para este tipo de efluentes (Jobling y col. 1998; Panter y col. 1998; Lattier y col. 2002), se esperaba en la presente muestra la presencia de efectos estrogénicos capaces de incrementar los niveles de proteína y ARNm de VTG en ambos sexos. La disminución de la producción de proteína VTG en hembras de *P. promelas* expuestas a una muestra similar fue descrita como un efecto producido por compuestos antiestrogénicos, presentes en efluentes con efecto estrogénico por Thorpe y col. 2007.

El incremento en la frecuencias de puesta y la menor expresión de proteína VTG sugiere la posibilidad de que se haya producido un mayor número de huevos con menor concentración de proteínas ovogénicas, lo cual sería perjudicial para la viabilidad de los huevos (Arukwe y Goksoyr, 2003), parámetro del cual no se tiene información disponible.

Por su parte, la expresión tanto de la proteína como del ARNm de VTG de machos no sufrieron modificaciones al final de los 21 días de exposición al Arroyo Fray Bentos, no coincidiendo tampoco con lo obtenido luego de la exposición a ambas concentraciones de E_2 , luego de las cuales la VTG se incrementó significativamente.

El ARNm de ZP3 fue otro de los ARNm estudiados, su expresión no se modificó en hembras, pero se vio aumentada en forma significativa en machos expuestos al agua del Arroyo Fray Bentos. El mantenimiento constante de la VTG y el incremento producido del ARNm de ZP3 en machos expuestos al Arroyo Fray Bentos, sugiere que la regulación de la expresión de ambos ARNm es diferente tal cual lo reportó Liu y col. (2006) y apoya nuevamente la hipótesis planteada antes de que en esta muestra están presentes compuestos estrogénicos diferentes al E₂ utilizado como control positivo, a los cuales es sensible la expresión de ARNm de ZP3 en machos pero no la del ARNm de VTG.

El nivel de ARNm de ESR1 luego de la exposición al agua de arroyo sufrió un incremento estadísticamente significativo en ambos sexos, mientras que el ARNm de ESR2 no tuvo ninguna modificación en ninguno de los sexos. Aunque para este último gen se observó una tendencia a la disminución en hembras, pero ésta no resultó estadísticamente significativa. Ambas respuestas coinciden con lo esperado luego de un efecto estrogénico. Según se describe en la bibliografía los niveles de ARNm de los genes ESR1 y ESR2 tienen respuestas opuestas frente a los estrógenos (Zhang y col. 2008). Los mismos inducen el incremento de la expresión de sus receptores tipo 1, pero no los de tipo 2 (Filby y Tyler, 2005). Estos últimos se encuentran más relacionados con el receptor de andrógenos (Naderi y Hughes, 2008), e incrementan su expresión por acción de andrógenos o antiestrógenos. En general el nivel de ESR2 no se modifica o disminuye frente a un estrógeno, tal cual fue la tendencia observada en las hembras en este caso, y los resultados obtenidos por Blüthgen y col. (2012) mediante RT-Q-PCR luego de inyectar *Danio rerio* con 8,4 µg/k/día de una sustancia estrogénica como el BPA. En el este trabajo se incluyó la evaluación de los cambios de niveles de ARNm de ambos receptores con el fin de caracterizar mejor las respuestas tanto a compuestos estrogénicos como androgénicos potencialmente presentes en nuestras muestras.

Según la bibliografía ESR1 juega un papel principal en la regulación transcripcional de la VTG, mientras que ESR2 probablemente no tiene función en dicho proceso (Filby y Tyler, 2005). En soporte de ello, la expresión de ESR1 se incrementa progresivamente con el desarrollo sexual de las hembras y con la exposición a fuentes estrogénicas, no siendo así para ESR2 (Filby y Tyler, 2005).

En el presente ensayo, a pesar de obtener una respuesta positiva en la expresión de ESR1 no se observó incremento en VTG. Probablemente ello sea debido a que la inducción del ESR1 no fue suficiente para incrementar el nivel de VTG o a que la muestra presentaba algún compuesto que interfería con la acción de ESR1 sobre el promotor de VTG no permitiendo la inducción de su expresión.

Otros de los ARNm analizados fueron de GHR e IGF-I. El eje GH-IGF-I junto a las hormonas tiroideas y corticosteroides juega un papel crucial en la regulación de múltiples funciones fisiológicas, crecimiento, diferenciación, metabolismo, reproducción, respuesta inmune, osmo e ionoregulación. GH induce el incremento de GHR e IGF-I en las células hepáticas, y este se relaciona en forma proporcionalmente positiva con la tasa de crecimiento y en forma inversa con la concentración de estrógenos (Filby y Tyler, 2007^A). La producción de IGF-I hepática depende de la unión de GH a sus receptores en dicho órgano blanco.

Las sustancias estrogénicas pueden disminuir la expresión de GHR regulando en forma endógena el crecimiento y la osmoregulación, y con ello la resistencia a la salinidad, durante la maduración o la migración de adultos. Sin embargo, cuando los estrógenos son exógenos, también pueden ejercer el mismo efecto reduciendo la expresión de GHR y alterando el eje GH-IGF-I. (Lerner y col. 2012).

Los niveles de ARNm de GHR e IGF-I en hígados de peces expuestos al agua del Arroyo Fray Bentos no sufrieron cambios significativos en hembras, mientras que en machos se apreció un aumento significativo en el ARNm de GHR y una disminución de IGF-I de 9 veces respecto al control. Ambos resultados de machos se contrarrestan entre sí, dado que según lo mencionado antes, se esperaba que el nivel de expresión de GHR e IGF-I tuviera una relación directa entre ellos. Dicha respuesta intrincada, es indicadora de que existen otros factores que regulan la expresión de IGF-I además de GHR y puede deberse a la complejidad de la muestra y la presencia de diversos compuestos, los cuales pueden actuar en diferentes puntos del sistema endócrino causando efectos opuestos.

Los cambios en los niveles de expresión de los diferentes genes estudiados en los peces expuestos a estradiol y a agua de Arroyo Fray Bentos nos dan la pauta de que el agua de Arroyo Fray Bentos no presenta un perfil claro sobre los efectos disruptores provocados. Los presentes resultados apuntan a que algunos de los efectos de dicha muestra tienen similitudes con los causados por compuestos estrogénicos, produciendo cambios en la puesta de huevos similares a los producidos por 150 ng/l de E₂, modificando la expresión de ARNm de ESR1 y ZP3 tal cual sucedió luego de la exposición a 450 ng/l de E₂, disminuyendo la expresión de ARNm de IGF-I e induciendo una tendencia a la disminución de ARNm de ESR2 en hembras. También debemos considerar que produjo efectos opuestos a los de un disruptor estrogénico como fueron la disminución de VTG en hembras y el incremento de GHR en machos, posiblemente ambos resultados sean causa de la mezcla compleja de compuestos presentes en la muestra con la cual se trabajó.

Se debe considerar que el nivel y el tipo de contaminación presentes en el agua del Arroyo Fray Bentos puede ser muy variable, dependiente de las precipitaciones y de vertidos puntuales de efluentes municipales u otras fuentes. También cabe recordar que el tipo de muestreo realizado en el presente trabajo fue puntual, por tanto los resultados obtenidos corresponden a una ventana de información en cierto punto del espacio y del tiempo para el agua de dicho arroyo.

Exposición a Efluente industrial de planta de celulosa

Luego de 21 días de exposición al efluente industrial, la frecuencia de puesta de huevos en acuarios de exposición disminuyó con respecto a acuarios control. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en otros ensayos similares, en los cuales se expusieron *P. promelas* durante 10 y 21 días a efluentes de tratamiento secundario de plantas de celulosa puros (Kovacs y col., 2005 y 2011 respectivamente).

Concuerdan a su vez con lo obtenido por Pawlosky en 2004 el cual observó disminución en la puesta de huevos a altas concentraciones estrogénicas, pero se oponen a los observados en el presente ensayo luego de la exposición a 150 ng/l de E₂ en los cuales la puesta de huevos se incrementó. A partir de estos resultados se podrían realizar dos planteos, que la muestra posee actividad androgénica debido al efecto opuesto al producido por el estradiol; o una alta estrogenicidad concordando con los resultados obtenidos por Pawlowski.

El decrecimiento en la producción de huevos en peces expuestos a efluentes de planta de celulosa también se puede correlacionar con los bajos niveles de DBO de la muestra (ver Anexo II), ya que los valores de DBO en efluentes se han utilizado como predictores de los efectos sobre la reproducción de peces, siendo DBO menores de 20mg/l considerados negativos para la reproducción (Kovacs y col. 2011; Costigan y col. 2012).

En cuanto a los niveles de expresión de VTG no se observó modificación en los niveles de proteína en ningún sexo, ni ARNm en machos expuestos a dicho efluente, sin embargo en hembras se obtuvo una disminución de más de 10 veces en dicho ARNm luego del período de exposición. Dicha disminución en hembras también se opone a los efectos esperados luego de una exposición a estrógenos y a su vez puede conectarse con el efecto de disminución de puesta de huevos. Los presentes resultados son similares a los obtenidos por Denslow y col. (2004), quienes, bajo las mismas condiciones, tipo de muestra y metodología, detectaron disminución de ARNm de VTG en hígado de hembras *P. promelas*.

Según los resultados obtenidos podemos afirmar que la proteína y el ARNm de VTG de hembras no respondieron de la misma forma frente a dicho efluente, posiblemente la respuesta de disminución de la proteína sea posterior en el tiempo a la del ARNm. Para determinar este efecto debería realizarse un ensayo de exposición durante mayor tiempo verificando los cambios en los niveles de ambos.

La variación de VTG en hembras y el número de huevos reflejan que existen alteraciones en el tiempo de maduración de los ovocitos y disrupción en el balance de esteroides sexuales. La baja de VTG en hembras afecta la producción de número de huevos, pero según lo publicado por Thorpe y col. (2007) no parece afectar la viabilidad de los embriones, parámetro del cual no se tienen datos en el presente trabajo. En base a ello se podría afirmar que en las hembras se altera el tiempo de maduración de los huevos compensando la baja producción de VTG y proveyendo del nivel mínimo de nutrientes manteniendo la sobrevivencia de los embriones (se incrementa el tiempo de maduración produciendo menor cantidad de huevos).

De todas formas la relación existente entre la cantidad de huevos producidos y la concentración de proteína VTG y su ARNm no ha sido completamente comprendida. Según el

trabajo de Thorpe en 2009, parece existir una discordancia entre la producción de proteína y la de huevos. Se debe considerar que la regulación endócrina de la gametogénesis y de la ovulación es mucho más compleja e intrincada que la de la expresión de VTG. Como se señaló antes, los estrógenos actúan sobre tres tipos de receptores suprimiendo o activando una gran cantidad de puntos del eje HPG a través de los cuales regulan la gametogénesis y la ovulación, mientras que solamente actúan sobre el ESR1 presente en hígado para regular la síntesis de VTG (Katsu y col. 2007).

Por otra parte los niveles de ARNm de ESR1 en hígados de peces hembras expuestas al efluente industrial disminuyeron significativamente, oponiéndose también dicha respuesta a lo esperado luego de un efecto estrogénico. La disminución de ESR1 en hembras puede deberse a la presencia de un efecto antiestrogénico generado por una sustancia capaz de unirse a los receptores de estrógeno no permitiendo que estos actúen e incrementen su expresión, o también puede ser consecuencia de una sustancia androgénica no aromatizable que provoque respuestas endócrinas opuestas a los estrógenos.

En contraste con la disminución del ARNm de ESR1 se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm de ESR2 en ambos sexos. Dicha observación sigue en concordancia con los resultados anteriores para esta muestra, dado que también es una consecuencia de un efecto androgénico o antiestrogénico.

Como ya fue señalado anteriormente, se ha descrito que los niveles de ARNm de los genes ESR1 y ESR2 tienen respuestas opuestas (Zhang y col. 2008). ESR2 se encuentra más relacionado con el receptor de andrógenos (Naderi y Hughes, 2008), respondiendo y aumentando su expresión en las mismas condiciones que este último, siendo utilizado en muchos casos como bioindicador de androgenicidad junto al receptor de andrógenos (Werner y col. 2010). Las funciones de ESR2 no se conocen bien hasta el día de hoy (Filby y Tyler, 2005), la regulación al alza de su expresión en testículo, en el período de diferenciación testicular implica que los subtipos ESR2 pueden desempeñar un papel principal en el desarrollo gonadal masculino y la espermatogénesis en los peces, pudiendo ser ello la causa de su respuesta positiva frente a andrógenos (Chakraborty y col. 2011).

Nuestros resultados concuerdan con los alcanzados por Werner y col. (2010), quienes observaron por medio de RT-Q-PCR un incremento en la expresión de ARNm de ESR2 en hígados de machos *P. promelas* expuestos a un efluente con tratamiento secundario de una industria de celulosa.

Luego del período de exposición al efluente industrial se produjo también un incremento en el nivel de ARNm de GHR e IGF-I en ambos sexos, siendo mayor el incremento en hembras. En concordancia con lo obtenido para esta muestra el incremento de ambos ARNm también coincide con un efecto androgénico o antiestrogénico.

Los andrógenos o antiestrógenos inducen el incremento de GH con el fin de estimular el crecimiento somático y esta a su vez incide positivamente sobre la síntesis de sus propios receptores en el hígado incrementando en consecuencia la síntesis de ARNm de IGF-I (Filby y Tyler, 2007^A).

Los efectos obtenidos en el presente trabajo luego de la exposición a esta muestra indican la presencia de compuestos que actúan como EDC interfiriendo en el desarrollo normal de los peces y se comportan en forma opuesta a los estrógenos. Por ejemplo, disminuyendo

VTG y ESR1, los cuales son genes de respuesta positiva frente a estrógenos y aumentando GHR, IGF-I y ESR2 los cuales responden de forma negativa a las sustancias estrogénicas.

Los presentes resultados sugieren que el efluente industrial posee un efecto androgénico o antiestrogénico. La presencia de andrógenos y/o antiestrógenos es difícil de diferenciar, ambos pueden actuar por vías diferentes, con diferentes modos de acción y/o mecanismos moleculares, pero teniendo como resultado la capacidad de crear los mismos fenotipos (Filby y Tyler, 2007^B).

En el anexo II se presentan los resultados obtenidos al analizar los compuestos estrogénicos presentes en este efluente. Entre otros compuestos disruptores se encuentran: Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y 4-para-nonilfenol, el primero de ellos antiandrogénico y el segundo estrogénico según Satoh, 2008. De todas formas más allá de la presencia de estas sustancias no podemos descartar que la muestra posea también compuestos androgénicos o antiestrogénicos con actividad disruptora más poderosa que los estrógenos presentes, los cuales no hayan sido determinados en dicha investigación.

Tabla 14. Comparación de resultados en cambio de los niveles de la proteína y el ARNm de VTG en hígado de *P. promelas* expuestos a E₂, Arroyo Fray Bentos y Efluente industrial. Las casillas de color rojo representan que existió un incremento de VTG y las casillas celestes que se produjo un descenso de la misma.

	Hembras		Machos	
	Proteína VTG	ARNm VTG	Proteína VTG	ARNm VTG
E ₂ (150ng/l)				
E ₂ (450 ng/l)				
Arroyo Fray Bentos				
Efluente industrial				

Comparación de la determinación de proteína y ARNm de VTG

La detección de proteína VTG y su ARNm por medio de ELISA y RT-Q-PCR en hembras no tuvo resultados concordantes luego de la exposición a E₂ (Tabla 14). Estos resultados sugirieron que el estudio de los niveles de ARNm puede ser mejor marcador de disrupción en hembras.

Sin embargo, en machos se observó tanto un incremento en los niveles de ARNm como de proteína VTG para los peces expuestos a estradiol. Se puede afirmar que, tanto la determinación de cambios a nivel de la expresión proteica como de ARNm de VTG son buenos indicadores de estrogenicidad en machos y que ambas son excelentes metodologías para su determinación.

Los peces machos tienen la maquinaria necesaria para la síntesis de VTG, pero deben presentar mecanismos de controles diferentes y menos estrictos que los presentes en hembras. Lo que puede explicar, como se mencionó antes, que en machos un aumento de

estradiol determine un aumento proporcional en los niveles de expresión de esta proteína, haciendo que este punto final sea un excelente indicador de estrogenicidad en machos.

Evaluación de diferentes genes por medio de RT-Q-PCR

En cuanto a la evaluación de los niveles de ARNm estudiados por medio de RT-Q-PCR, los de VTG de ambos sexos y los de GHR e IGF-I de machos fueron los mejores indicadores a la hora de exponer *P. promelas* a E₂, debido a que se obtuvieron cambios significativos en el nivel de expresión de estos genes a ambas concentraciones de E₂. Los niveles de ARNm de ZP3 y ESR1 solo respondieron a la mayor de las concentraciones usadas de E₂, por lo cual se pueden plantear como indicadores menos sensibles que los demás frente a E₂.

Por otro lado los ARNm de ESR2, IGF-I y GHR en ambos sexos, y los de VTG y ESR1 en hembras respondieron al efluente industrial con cambios significativos y de forma opuesta a lo esperado para un efecto estrogénico, por lo cual pueden ser propuestos como buenos bioindicadores de compuestos androgénicos o antiestrogénicos. De todas formas merecerían seguir siendo estudiados mediante la realización de ensayos de exposición a concentraciones conocidas de andrógenos y antiestrógenos para verificar los resultados.

Detección de actividad estrogénica mediante YES (Yeast Estrogen Screen)

La técnica YES se aplicó con el fin de observar efectos estrogénicos de las muestras ensayadas sobre un organismo diferente a los peces, como *Saccharomyces cerevisiae* modificado con receptor de estrógeno humano. Ninguna de las muestras ensayadas presentó actividad estrógena por encima del límite de detección. En el caso del efluente industrial los presentes resultados concuerdan con los efectos no estrogénicos observados para los *P. promelas*, no siendo así para la muestra del Arroyo Fray Bentos en la cual apreciamos efectos estrogénicos sobre algunos de los ARNm analizados.

Comparación de los diferentes métodos de evaluación de disrupción.

Nuestros resultados dejan en claro que los métodos fisiológicos tales como; medida de peso, largo, peso gonadal, cálculo de KF e IGS no fueron sensibles en estas condiciones. Por lo tanto no son adecuados para este tipo de muestras con bajas concentraciones de EDC o para los tiempos de exposición utilizados.

A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la sensibilidad del ensayo con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante no fue suficiente para poder detectar las sustancias presentes en las muestras ensayadas.

Por otra parte la evaluación de la frecuencia de puesta de huevos proporcionó un gran aporte de información, pero a su vez por sí sola no permitió sacar conclusiones.

La medida de la proteína VTG principalmente en machos fue un buen indicador de disrupción estrogénica. Pero, sin lugar a dudas la determinación de ARNm por medio de RT-Q-PCR fue el método más sensible y el que proporcionó mayor información. La sensibilidad y reproducibilidad que tiene el ensayo de RT-Q-PCR para detectar los cambios en los niveles de ARNm, y las variaciones que este sufre frente a cambios del ambiente hace que esta técnica se haya vuelto de uso común dentro de la Ecotoxicología y que permita realizar ensayos a corto plazo con buenos resultados, como por ejemplo el de Werner y col. (2010).

El estudio de las respuestas expresión génica de los organismos expuestos a ciertos compuestos conforma hoy una nueva tecnología denominada Toxicogenómica. La misma permite mejorar la comprensión sobre las bases biológicas de las respuestas a los agentes químicos y entender las interacciones entre los genes y el medio ambiente. La elucidación de los mecanismos de respuesta en los niveles de expresión de ARNm y proteínas permite conocer el rol y la acción de los tóxicos sobre la salud de los organismos. Estos métodos nos permiten obtener una información más global, mayor sensibilidad, menor costo y mayor relevancia medioambiental.

6. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que la exposición de *Pimephales promelas* al agua del Arroyo Fray Bentos, originó resultados similares a los obtenidos luego de la exposición a estradiol en cuanto a la puesta de huevos y a la expresión de genes como: ZP3, ESR1 e IGF-I. Sugiriéndose con ello que posee cierta actividad estrogénica.

Por el contrario el efluente industrial de planta de pulpa de celulosa provocó efectos opuestos a los del estradiol, en la producción de huevos y la expresión de genes como VTG, ESR1, ESR2, IGF-I y GHR. Estos resultados sugieren que dicho efluente posee compuestos androgénicos o antiestrogénicos.

En cuanto a la evaluación de los parámetros podemos afirmar que, la cuantificación proteica de VTG en machos y de los niveles de ARNm de VTG de ambos sexos, de GHR y de IGF-I de machos son buenos indicadores de estrogenicidad. Mientras que los niveles de ARNm de ESR2, IGF-I y GHR en ambos sexos, y los de VTG y ESR1 en hembras son posibles buenos indicadores de antiestrogenicidad o androgenidad.

Por último el ensayo con *Saccharomyces cerevisiae* resultó menos sensible para la detección de actividad estrogénica presente en las muestras objetivo que el análisis del nivel de ARNm de ciertos genes en *P. promelas*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adedeji, O., Durhan, E., Garcia-Reyero, N., Kahl, M., Jensen, K., LaLone, C., Makynen, A., Perkins, E., Tomas, E., Villeneuve, D., y Ankley, G. «Short-Term Study Investigating the Estrogenic Potency of Diethylstilbesterol in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)». *Environmental Science Technology*, 46 (2012): 7826-7835.
- Anckley, G., Jensen, K., Kahl, M., Marynen, E. «Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*)». *Environmental toxicology and chemistry*, 20, nº 6 (2001): 1276-1290.
- Anckley, G., y Johnson, R. «Small Fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals» *Ilar Journal*, 45, nº 4 (2004): 469-482.
- Anglade, I., Pakdel, F., Bailhache, T., Petit, F., Salbert, G., Jago, P., Valotaire, Y., y Kah, O. «Distribution of estrogen receptor immunoreactive cells in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)» *Journal Neurocytology*, 6 (1994): 573-583.
- Applied Biosystems. «Tri Reagent Solution Instruction.» RNA/DNA/protein Isolation Reagent. 2010.
- Argemi, F., Cianni, N. y Porta, A. «Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública» *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39, nº 3 (2005): 291-300.
- Arukwe, A., y Goksøyr. «Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption» *Comparative Hepatology*, 2 (2003): 1-21.
- Beato, M. «Gene regulation by steroid hormones.» *Cell*, 56 (1989): 335-344.
- Beckman, B. «Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes» *General and Comparative Endocrinology*, 170 (2011): 233-252.
- Beckman, B., Shimizu, M., Gadberry, B.A., y Cooper, K.A. «Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF-I and 41 kDa IGFBP» *General and Comparative Endocrinology*, 135 (2004): 334-344.
- Berois, N., Arezo, M., y Papa, N. «Gamete interactions in teleost fish: the egg envelope. Basic studies and perspectives as environmental biomonitor» *Biological Research*, 44 (2011): 119-124.
- Biales, A.D., Bencic D.D., Flick R.W., Lazorchak J y Lattier D.L. «Quantification and associated variability of induced vitellogenin gene transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*) by quantitative real-time polymerase chain reaction assay» *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (2007): 287-296.
- Biosense Laboratories. «Fathead Minnow Vitellogenin ELISA Kit Manual» Prod. Nº V01018401. 2010.
- Birkett, J. W. y Lester, J. N. «Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes» IWA Publishing and Lewis Publishers, 2003: 295.
- Blüthgen, N., Zucchi, S., Fent y C. «Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*)» *Toxicology. Applied Pharmacology*, 2012: doi:10.1016/j.taap.2012.06.008.
- Bortone, SA. y Davis, W. «Fish intersexuality as indicator of environmental stress» *Bioscience*, 44 (1994): 165-172.
- Campbell, C., Borglin, S., Green B., Grayson A., y Stringfellow W. «Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review» *Chemosphere*, 65 (2006): 1265-1280.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Serrano, R., Bromage, N. «Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass» *Recent Advances in Aquaculture*, 4 (1993): 43-54.
- Castro S., Espínola J., Miguez D. y Viana S. «Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales uruguayos» Montevideo: DINAMA, IMM, LATU, Fac de Ciencias, 2002.
- Chang, YS., Wang, Tsao, CC y Huang, FL. «Molecular cloning, structural analysis and expression of carp ZP3 Gene» *Molecular Reproduction Developmental*, 44, nº3 (1996): 295-304.
- Chang, YS., Hsu, CC., Tsso, C. y Huang, F. «Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP2 gene» *Molecular Reproduction Developmental*, 46 (1997): 258-267.

- Chakraborty, T., Katsuc, Y., Zhoua, L., y Miyagawac, S. «Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: An *in vitro*–*in vivo* correlation» *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 123 (2011): 115–121.
- Colborn, T., Clement, C. «Chemically-induced alternations in sexual and functional development: the wildlife/human connection» Princeton: Princeton Scientific Publ. Co., 1992.
- Costigan, S., Werner, J., Ouellet, J., Hill, J., Law D. «Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents» *Aquatic Toxicology*, 122 (2012): 44– 55.
- Crago, J., Corsi, S., Weber, D., Bannerman, R., Klaper, R. «Linking biomarkers to reproductive success of caged fathead minnows in streams with increasing urbanization» *Chemosphere*, 82 (2011): 1669–1674
- David C. Howell University of Vermont. Resampling Statistics: Randomization and the Bootstrap. <http://www.uvm.edu/~dhowell/StatPages/Resampling/Resampling.html>. Último acceso 15-11-12
- Denslow N., Kocerha J, Sepulveda MS, Gross T, Holm SE. «Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents» *Mutation Research*, 552 (2004):19–34.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y. «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences» *Aquaculture*, 208 (2002): 191–364.
- Ding, J., Lim EH, Lam TJ. «Cortisol-induced hepatic vitellogenin mRNA in *Oreochromis aureus* (Steindachner)» *General Comparative Endocrinology*, 96 (1994): 276–287.
- Environmet Canada. National assessment of pulp and paper environmental effects monitoring data: a report synopsis. National Water Reseach Institute Burlington: NWRI Scientific Assesment Roport Series 2, 2003.
- Environmental Protection Agency. «Standard operating procedure for Qualitative “Real time” PCR (QPCR) vitellogenin protocol using HS DyNamo™ SYBR Green kit.» 2006.
- EPA/600/S3-87/001. Guidelines for the culture of Fahead minnows, *Pimephales promelas* for use in toxicity test. Environmental Protection Agency, 1988.
- EPA-D-06-096, EPA. Fathead minnow Culture Method (*Pimephales promelas*). Environmental Protection Agency, 1996.
- EPA. Special report on environmental endocrine disruption: an effec assessment and analysis. Washington D.C.: U.S. Environmental Protection Agency , 1997.
- EPA [Environmental Protection Agency]. «A short-term test method for assessing the reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals using the fathead minnow (*Pimephales promelas*).» Editado por Duluth MN: Mid-Continent Ecology Division. EPA/600/R-01/067, 2002.
- EPA, Agency Environmental Protection. Standard operating procedure for Qualitative “Real time” PCR (QPCR) vitellogenin protocol using HS DyNamo™ SYBR Green kit.Vols. N° IRB-0.32. 2006.
- Filby, A. y Tyler, C. «Molecular Characterization of Estrogen Receptors 1, 2a, and 2b and Their Tissue and Ontogenic Expression Profiles in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)» *Biology of reproduction*, 73 (2005): 648–662.
- ^AFilby, A., y Tyler, C. «Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specic expression of their mRNA transcripts in fathead minow» *General and Comparative Endocrinology*, 150 (2007): 151–163.
- ^BFilby, A., y Tyler, C. «Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish» *Molecular Biology*, 8, nº 10 (2007): 1-13.
- Fuller, P.J. «The steroid receptor superfamily: mechanism of diversity» *FASEB Journal*, 5 (1991): 3092-3099.
- Gaido K., Leonard L., Lovell, S., Gould, J. y Babai, D. «Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay» *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143 (1997): 205–212.
- González, P. y Oyarzún, C. «Variabilidad de índices biológicos en Pinguipes chilensis Valenciennes 1833 (Perciformes, Pinguipedidae): ¿Están realmente correlacionados?» *Gayana*, 66, nº 2 (2002): 249-253.
- Grierson AC., y Neville JP. «Helicoidal architecture of fish eggshell» *Tissue Cell*, 13 (1981): 819-830.
- Hall, J., Couse, J., y Korach, K. «The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling» *Journal Biological Chemistry*, 276 (2001): 36869–36872.

- *Hanson, A., Kittilson, J., McCormick, S., y Sheridan, M.* «Effects of 17 β - Estradiol, 4-nonyphenol, and B-sitosterol on the growth hormone insulin-like growth factor system and seawater adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)» *Aquaculture*, 362 (2012): 241-247.
- *Harries, J., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, JP., y Tyler, CR.* «Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom» *Environmental Toxicology Chemistry*, 18 (1999): 932–937.
- *Hemmer, M., Bowman, C., Hemmer, B., Friedman, S., Marcovich, D., Kroll, K., y Denslow, N.* «Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol» *Aquatic Toxicology*, 58 (2002): 99–112.
- *Herrmann, M. (Corbett Research) y Pfaffl, M. (Technical University Munich).* REST 2005, Greater certainty in expression studies. <http://rest-2005.gene-quantification.info>. Último acceso 15-11-12.
- *Hyllner, SJ., Westerlund, L., Olsson, P. y Schopen, A.* «Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins» *Biological Reproduction*. 64 (2001): 805-811.
- *Ho Yoon, S., Itoh, Y., Kaneko, G., Nakaniwa, M., Ohta, M., Watabe, S.* «Molecular Characterization of Japanese Sillago Vitellogenin and Changes in Its Expression Levels on Exposure to 17 β -Estradiol and 4-tert-Octylphenol» *Marine Biotechnology*. 10 (2008): 19–30.
- *Inoue, K., Iwatani, H., Takei, Y.* «Growth hormone and insulin-like growth factor I of a euryhaline Wsh Cottus kazika: cDNA cloning and expression after seawater acclimation» *General and Comparative Endocrinology*, 131 (2003): 77-84.
- *IPCS.* «Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors.» World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. 2002. http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en (último acceso: 30 de 04 de 2012).
- *Istas.* 2011. <http://www.istas.net/ma/decops/> (último acceso: 18 de 06 de 2012).
- *Jensen, K., Korte, J., Kahl, M., Ankley, G.* «Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)» *Comparative Biochemistry Physiology* 128C (2001): 127-141.
- *Jensen, K., y Ankley, G.* «Ecotoxicology Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64 (2006): 101-105.
- *Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C., Brighty, G., y Sumpter, J.* «Widespread sexual disruption in wild fish» *Environmental Science Technology*, 32 (1998): 2498–2506.
- *Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., y Monbrison, D.* «The reproductive brain in fish» *Fish Physiology Biochemistry*, 11 (1993): 85-98.
- *Kaplan, S.A. y Cohen, P.* «The Somatomedin Hypothesis 2007: 50 Years Later». Vol. 92, de *Clinical Endocrinology Metabolism*, 1 (2007): 4529-4535..
- *Katzenellenbogen, B.* «Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways» *Biological Reproduction*, 54 (1996): 287-293.
- *Katsu, Y., Lange, A., Urushitani, H., Ichikawa, R., Paul, G., Cahill, L., Jobling, S., Tyler, C., Iguchi, T.* «Functional associations between two estrogen receptor environmental estrogen and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*)». *Environmental Science Technology*, 41 (2007): 3368-3374.
- *Kawauchi, H. y Sower, S.* «The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis» *General and Comparative Endocrinology*, 148 (2006): 3-14.
- *Keel, K., Tosar, JP. y Laíz, J.* «Desarrollo de superficies modificadas oro anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina» *Innotec* 5 (2010): 29-33.
- *Kime, J.* «The effects of pollution on reproduction in fish» *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5 (1995): 52-96.
- *Klaper, R., Rees, C., Drevnick, P., Weber, D., Sandheinrich, M. y Carvan, M.* «Gene Expression Changes Related to Endocrine Function and Decline in Reproduction in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) after Dietary Methylmercury Exposure» *Environmental Health Perspectives*. 114, nº 9 (2006): 1337-1343.
- *Kovacs, T., Martel, P., Ricci, M., Michaud, J., Voss, R.,* «Further insights into the potential of pulp and paper mill effluents to affect fish reproduction». *Journal Toxicology Environmental Health Part A*, 68 (2005): 1621-1641

- Kovacs, T., Martel, P., O'Connor, B., Parrott, J., McMaster, M., Van Der Kraak, G., MacLatchy, D., Van Den Heuvel, M., Hewitt, L. «Kraf mill effluent survey: progress toward best management practices for reducing effects on fish production» *Environmental toxicology and chemistry*, 2011: doi: 10.1002/etc.526. Epub 2011 Apr 6.
- Kunz, K. y Fent, P. «Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) — An analysis with nonlinear isobolograms» *Toxicology and Applied Pharmacology* 234 (2009): 77–88.
- Laiz-Carrión, R., Del Mar Segura-Noguera, M., Del Pilar, M., Del Río, M. y Mancera, J.M. «Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad» *General and Comparative Endocrinology* 132 (2003): 454-464.
- Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Ythomas, P. «Characterization of putative ligands for fish gonadal androgen receptor in a pulp mill effluent» *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, nº 2 (2006): 419-427.
- Lattier, D., Reddy, T., Gordon, D., Lazorchak, J., Smith, M., Williams, D., Wiechman, B., Flick, R., Miracle, A., Toth, G. «17 α -ethinylestradiol-induced vitellogenin gene transcription quantified in livers of adult males, larvae, and gills of fathead minnow (*Pimephales promelas*)» *Environmental Toxicology Chemistry*, 21 (2002): 2385–2393.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., y Porte, C. «First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River» *Toxicology Applied Pharmacological*, 196 (2004): 247–257.
- Le Guellec, K., Lawless, K., Valotaire, Y., Kress, M., Tenniswood, M. «Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*)» *General Comparative Endocrinology*, 71 (1998): 359–371.
- Le Menn, F., Davali, B., Pelissero, C., Ndiaye, P., Bon, E., Perazzolo, L. y Rodríguez, J. «A new approach to fish vitellogenesis» In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen, Norway 2000: 281-284, 1999.
- Leino, L., Jensen, K., Ankley, G. «Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*)» *Environmental Toxicology Pharmacology*, 19 (2005): 85-98.
- Lerner, D., Sheridan, M., McCormick, S. «Estrogenic compounds decrease growth hormone receptor abundance and alter osmoregulation in Atlantic Salmon». *General and comparative endocrinology*, 179 (2012) 196-204.
- Liao, T., Guo, Q. y Cheng J. «Comparative responses in rare minnow exposed to 17 β -estradiol during different life stages.» *Fish Physiological Biochemistry*, 35 (2009): 341–349.
- Liu, X., Wang, H., y Gong, Z. «Tandem-Repeated Zebrafish zp3 Genes Possess Oocyte-Specific Promoters and Are Insensitive to Estrogen Induction» *Biology of reproduction*, 74, (2006): 1016–1025.
- Liu, Y., Wanyuan, W. Sheng, D., y Weiping, A. «Hepatic and extrahepatic expression of estrogen-responsive genes in male adult zebrafish (*Danio rerio*) as biomarkers of short-term exposure to 17 β -estradiol». *Environmental Monitoring Assessment*, 146 (2008): 105-111.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak J. «Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation». *Aquatic Toxicology*, 95 (2009): 320–329
- Lubzens E., Young G., Bobe J., Cerdà J. «Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed» *General and Comparative Endocrinology*, 165 (2010): 367–389.
- Manual de PCR. «Introduction to quantitative PCR». *Methods and applications guide*. IN70200B. 2011. Invitrogen. Stratagene.
- Manual de YES. «Yeast β Galactosidasa assay kit.» Thermo Scientific. Shanghai, YES.
- Matthews, J., Clemons, J., y Zacharewski, T. «Reciprocal mutagenesis between human α (L349, M528) and rainbow trout (M317, I496) estrogen receptor residues demonstrated their importance in ligand binding and gene expression at different temperatures.» *Molecular Cellular Endocrinology*, 183 (2001): 127–139.
- Matthiessen, P. y Johnson, I. «Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union» *Environmental Pollution* 146 (2007): 9-18.
- Mellanen, P., Soimasuo, M., Holmbom, B., Oikari, A., Santti, R. «Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus L.-s.l.*) exposed to effluents from pulp mills» *Ecotoxicology Environmental*, 43 (1999): 133–137.

- *Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O.* «Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions» *Biology Reproduction*, 66 (2002): 1881–1892.
- *Miles-Richardson, S., Kramer, V., Fitzgerald, S., Yamini, B., Giesy, J.* «Effects of waterborne exposure of 17beta- estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*)» *Aquatic Toxicology*, 47 (1999): 129-145.
- *Miracle A., Ankley G., Lattier D.* «Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens» *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 (2006): 337–342.
- *Modig, C., Westerlund, L., Olsson, P.* «Oocyte zona pellucida proteins». En *Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E.* (eds) «The fish oocyte. From basic studies to biotechnological applications». Springer. Pag. 113–139
- *Mold, D., Kim I., Tsai, C., Lee D., Chang, C. y Huang, R.* «Cluster of genes encoding the major egg envelope protein of zebrafish» *Molecular Reproduction Develop.* 58 (2001): 4–14
- *Monsálvez Macaya, E.* «Evidencia de compuestos con actividad estrogénica presentes en un efluente de celulosa Kraft, mediante el uso de una cepa de levadura modificada». Concepción: Centro de Ciencias Ambientales EULA-CHILE, 2007.
- *Morris, C., Thomas Jones, R., Cryer, J., Woodhead, S. y Kille, P.* «Identificación de la secuencia de ADNc de ZP3 de *Pimephales promelas* expuestas a dietilestilbestrol». (2000) Sumisión.
- *Mosher.* «Use of contraception and use of family planning services in the United States» *Advance Data from Vital and Health Statistics*, 350 (2004).
- *Muñoz Cueto, J.* «Control hormonal de la reproducción de peces». Cadiz, España: Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, 2005.
- *Naderi, A., Hughes, D.* «A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer». *Neoplasia*, 10 (2008):542–548.
- *Nagahama, Y.* «Endocrine regulation of gametogenesis in fish.» *Internal Journal of Developmental Biology*, 38 (1994): 217–229.
- *Nagahama, Y.* «Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish» *Proceedings Fishes Bergen, Noruega*, (2000) 211-222.
- *Nagahama Y., Yamashita, M.* «Regulation oocyte maturation in fish.» *Develop. Growth Differ*, 50 (2008): 195-219.
- *Nakamura I., Kusakabe M., y Young G.* «Differential suppressive effects of low physiological doses of estradiol 17 beta in vivo on levels of RNAm encoding esteroidogenic acute regulatory protein and three steroidogenic enzymes in previtellogenic ovarian follicles of rainbow trout» *General and comparative Endocrinology*, 163 (2009): 318-323.
- *Naturaleza de Aragón.* 06 de 06 de 2012. www.naturalezadearagon.com/fauna/teleosteos.php.
- *Navarro, I., Leibush, B., Moon, T.W., Plisetskaya, E.M., Banos, N., Mendez, M.* «Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and glucagon: the evolution of their receptors» *Comparative Biochemistry Physiological*, 122 (1999): 137–153.
- *Nelson, J.* «Fishes of the World» Tercer edición. John Wiley & Sons Inc. New York. 1994.
- *Nelson, N.* «Screening of endocrine disrupting compound using estrogen receptor transcriptional activation in vitro bioassay» Thesis of master Science. Simon Fraser University, 2007.
- *Nelson, N., y Der Kraak, G.* «Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IFG) system in zebrafish (*Danio rerio*) ovary» *General and comparative endocrinology*, 168 (2010): 111-120.
- *Nilsen, B., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S., Brion, F., Porcher, J., Goksoyr, A.* «Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening» *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004): 621–633.
- *Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyana, F., Saiti, K., Imawa, M., Takatori, S., y Utsimu, H.* «Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay». *Journal of Health and Science*, 46, nº 4 (2000): 282-298.
- *OECD.* Revised draft OECD guideline for the testing of. The fish Screening Assay for Endocrine Active Substances. December 2008.
- *Olea Serrano, N., Zuluaga Gómez, A.* «Exposición infantil a disruptores endocrinos.» *Anales Españoles de Pediatría*, 54, nº 1, 2001.

- *Oppen-Berntsen, D.* «Oogenesis and hatching in teleostean fishes with special reference to eggshell proteins» Dr. Scient Thesis, University of Bergen. University of Bergen, 1990.
- *Oppen-Berntsen, D., Gram-Jensen, E., and Walther, B.* «Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to 17 β -oestradiol» *Journal of Endocrinology*, 135 (1992): 293-302.
- *Oppen-Berntsen, D., Arukwe, A., Yadetie, F., Lorens, J., y Male, R.* «Salmon eggshell protein expression: A marker for environmental estrogens» *Mar Biotechnology*, 1 (1999): 252-260.
- *Panter, G., Thompson, R., Sumpter, J.* «Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone» *Aquatic Toxicology*, 42 (1998): 243–253.
- *Panter, G., Hutchinson, T., Lange, R., Lye, C., Sumpter, J., Zerulla, M., Tyler, C.* «Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting anti-estrogenic substances». *Environmental Toxicology Chemical*, 21 (2002): 319–326.
- *Parrott, J., y Blunt, B.* «Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males» *Environmental Toxicology*, 20 (2005): 131–141.
- *Paterson, C.* «The caudal skeleton in Lower Liassic pholidophoroid fishes» *Bull Br. Mus. Nat. Hist. (Geology)* 16 (1968): 203-239.
- *Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J., Tyler, C. y Braunbeck, T.* *Aquatic Toxicology*, 68 (2004): 277–291.
- Pierce biotechnology - thermo scientific. «Yeast -galactosidase Microplate Plate Assay Protocol (non-stopped).» INSTRUCTIONS: Yeast -Galactosidase Assay Kit 75768. 2010.
- *Pinto, P., Teodosio, H., Galay-burgos, M., Power, D., Sweeney, G., Canario, A.* «Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization» *Molecular Reproduction and Development*, 73 (2006): 318–329.
- *Power, R., Conneely, O., y O'Malley, B.* «New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily» *TIBS*, 13 (1992): 318-323.
- *Rand-Weaver, M. y Kawauchi, H.* «Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview» *Molecular biology frontiers*, 39-56. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993.
- *Rani, K., Sehgal, N., Goswami, S., Prakash, O.* «Relative potencies of natural estrogens on vitellogenin and choriogenin levels in the Indian freshwater spotted snakehead, *Channa punctata*: *in vivo and in vitro* studies» *Fish Physiology Biochemical*, DOI 10.1007/s10695-009-9332-8, 2009. Publicación on line.
- *Rhee, J., Kang, H., Raisuddin, S., Hwang, D., Seo, J., Park, G., Lee, J.* «Endocrine disruptor modulate expression of hepatic choriogenin genes in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*» *Comparative biochemistry and Physiology*, 150 (2009): 170-178.
- *Rickwood, C., Dube, M., Hewitt, L., Kovacs, T., MacLatchy, D.* «Use of paired fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproductive test» Part 2: Source identification of biological effects at a bleached kraft pulp mill. *Environmental Toxicology Chemical*, 25 (2006):1847–1856.
- *Rickwood, C., Dube, M., Weber, L., Lux, S., Janz, D.* «Assessing effects of a mining and municipal sewage effluent mixture on fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproduction using a novel field-base trophic transfer artificial stream» *Aquatic Toxicology*, 86 (2008): 262-286.
- *Rinchar, J., Kestemont, P., Kühn, E.R., y Fostier, A.* «Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (*Teleostei, Cyprinidae*).» *Genomical Comparative Endocrinology*, 92 (1993): 168-178.
- *Roda, A., Mirasoli, M., Michelini, E., Magliulo, M., Simoni, P., Guardigli, M., Curini, R., Sergi, M. y Marino, A.* «Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban waste water treatment plants» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (2006): 742–752.
- *Routledge E., Sumpter J.* «Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen» *Environmental Toxicology and Chemistry* 5, nº 3 (1996): 241–248.
- *Routledge E., Sheahan D., Desbroq C., Brighty G., Waldock M. y Sumpter J.* «Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. In vivo responses in fish and roach» *Environmental Science Technology*, 32 (1998): 1559-1565.

- Saera Vila, A. Duplicación, organización genómica y regulación transcripcional de los receptores de la hormona de crecimiento de peces. Valencia: Universidad de Valencia, Departamento de Biología y patología, 2010.
- Salbert, G., Atteke, C., Bonnac, G., y Jego, P. «Differential regulation of the estrogen receptor mRNA by estradiol in the trout hypothalamus and pituitary» *Molecular Cellular Endocrinology*, 96 (1993): 177-182.
- Satoh, K., Nagai, F., Aoki, N. «Several environmental Pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor alpha» *Journal of health Science*, 47, nº 5 (2001): 495-501.
- Schneider, W. «Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family» *International Review of Cytology*, 137 (1996): 166:103.
- Scott, A., Katsiadaki, I., Witthames, P., Hylland, K., Davies, I., McIntosh, A., y Thain, J. «Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea?» *Marine Environmental Research*, 61 (2006): 149-170.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. «Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*)» *Environmental Toxicology Chemical*, 21 (2002): 1692-1698.
- Soto, A., Justicia, H., Wray, J., y Sonnenschein, C. «P-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene» *Environmental Health Perspectives*, 92 (1991): 167–173.
- Soares A., Murto, M., Guieysse, B. y Mattiesson, B. «Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population» *Applied Microbiology Biotechnology*, 1 (2005): 1–10.
- Sohoni, P., Sumpter, J. «Several environmental oestrogens are also anti-androgens» *Journal Endocrinology*, 158 (1998.): 327–339.
- Soto, A., Lin, T., Justicia, H., Silvia, R., y Sonnenschein, C. «An 'in culture' bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN) » En Colborn, T y Clement, G. «Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection» *Advances in Modern Environmental Toxicology*, 21 (1992): 295–309.
- Sumpter, J., Jobling, S. «Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment» *Environmental Health Perspectives*, 103 (1995): 173–178.
- Swan, S., Brazil, C., Drobnis, E., Liu, F., Kruse, R., y Hatch, M. «Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males» *Environmental Health Perspectives*, 111, nº 4 (2003): 414-20.
- Thorpe, K., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R. «Associations between altered vitellogenin concentrations and adverse health effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*)» *Aquatic Toxicology*, 85 (2007): 176–183.
- Tyler, J., y Sumpter, C. «Oocyte growth and development in teleost.» *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6 (1996): 287-318.
- Tyler, C. y Van Aerle, R. «Development of Biological Test Methods and Future Prospects Androgen Active Chemicals» *Test Methods and Future Prospects*. 2002. http://www.comprendo-project.org/_files/Tyler.pdf (último acceso: 18 del 06 de 2012).
- UFAW. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Editado por <http://www.ufaw.org.uk/pubs>. Vol. 8. ISBN 9781405175234, 2010.
- Valdebenito, I., Paivaa, L., y Berlandb, M. «Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión» *Archivos Médicos Veterinarios*, 43 (2011): 11-25.
- Valotaire, Y., Le Roux, M., y Jego, P. «Estrogen receptor gene: structure and expression in rainbow trout» *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2 (1993): 373-390.
- Van Den Belt, L., Wester, P., Vercheyen, R., Witters, H. «Effects of ethinylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility» *Environmental Toxicology and Chemical*, 21 (2002): 767–775.
- Van Veld, P., Rutan, B., Sullivan, C., Johnston, L., Rice, C., Fisher, D., Yonkos, L. «A universal assay for vitellogenin in fish mucus and plasma» *Environmental Toxicology and Chemical*, 24 (2005): 3048–3052.
- Van den Eijnden, M., Lahaye, L., y Strous, G. «Disulfide bonds determine growth hormone receptor folding dimerisation and ligand binding» *Journal Cellular Science*, 119 (2006): 3078-3086.
- Verstraeten, J. «Occurrence of Endocrine-Disrupting and Other Wastewater Compounds during Water Treatment with Case Studies from Lincoln, Nebraska and Berlin, Germany» *Practical Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management*, 2003: 254-263.

- Vizziano, D., Somoza G. «Endocrinología de la Reproducción y Diferenciación del Sexo en Peces.» Montevideo: Facultad de Ciencias PEDECIBA, 10-21 de Noviembre de 2008.
- Xie, L., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., y Schlenk, D. «Evaluation of wetland and tertiary wastewater treatments for estrogenicity using in vivo and in vitro assays.» *Environmental Contamination and Toxicology*, 48 (2004): 81–86.
- Wahli, W. «Evolution and expression of vitellogenin genes» *Trends Genetic*, 4, nº 8 (1988): 227–232.
- Wallace, R., Selman K. «Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibian» *Journal of Electron Microscopy*, 16 (1990): 175-201.
- Wallis, M. «The molecular evolution of vertebrate growth hormones: A pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change» *Journal Molecular Evolution*, 43 (1996): 93-100.
- Wallis, M. «Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones» *Journal of Molecular Evolution*, 38 (1994): 619-627.
- Wang, H., y Gong, Z. «Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3». *Biochimistry Biophysiology Acta*. 1446 (1999): 156-160.
- Wang, H., Yan, T., Tan, J.T., Gong, Z.. «A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene» *Gene*, 256 (2000): 303-310.
- Warner, J., Rose, J., Karmaus C., Landgraf, R., Taffe, B. «Common classification schemes for PCB congeners and the gene expression of CYP17, CYP19, ESR1 and ESR2» *Science of the Total Environment*, 414 (2012): 81–89.
- Werner, J., Ouellet C., Young-Jun, C y Law, R. «Pulp and paper mill effluents induce distinct gene expression changes linked to androgenic and estrogenic responses en Fathead minnow (*Pimephales promelas*).» *Environmental toxicology and chemistry*, 29, nº 2 (2010): 430-439.
- Wolfand, I. «Active Ingredient in Oral Contraceptives (17beta-ethinylestradiol) Alters Male Competitive Courtship Behaviors and Secondary Sexual Characteristics in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*).» *Journal of the U.S. SJWP (Water Environment Federation)*, 2007.
- Wood, A., Duan, C. y Bern, H. «Insulin-like growth factor signaling in fish» En *International Review of Cytology*. (2005): 215-285.
- Zanuy, M. y Carrilo, P. «Reproducción de los teleósteos y su aplicación en la acuicultura» En: J. Espinoza de los Montoneros y U. Labarta. (eds). *Reproducción en Acuicultura*. Editorial CAICYT. Madrid, España. 1 (1987): 1-102.
- Zhang, X., Heckers, M., Woo Park, J., Tomptes, J., Jones, P., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Wu, R., Giesy, G. «Time depend transcriptional profiles of genes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in medaka (*Oycias latipes*) exposed to fradazole and 17 Trembolone». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, nº 12, (2008): 2504–2511.

ANEXO I

Medios para YES

-MEDIO GOLD

Para 600 mL:

- 60mL Dextrosa 20 %
- 60mL YNB 10X
- 110 mL gold concentrate Stock Solution
- 370 mL H₂O

Filtrar y conservar a 4°C

- PLACAS DE SELECCIÓN

- 10 mL YNB 10X
- 2 g de bactoagar
- 78 mL de agua
- Autoclavar
- Dejar enfriar hasta poder manejarlo sin dificultad
- Adicionar 1 mL de las soluciones de lisina e histidina.
- Adicionar 10 mL de dextrosa 20 %

Agitar y colocar 15-20 ml por placa de 100 mm

Almacenar a 4°C

Gold concentrate Stock Solution

REACTIVOS	Gramos/volumen(ml)	Temperatura almacenamiento	ml agregados al concentrado
Adenine Sulfate	0.3g/ 250 ml	RT	50
L-Histidine-HCl	0.24g/ 100 ml	4°C	25
L-Arginine-HCl	0.24g/ 100 ml	4°C	25
L-Methionine	0.24g/ 100 ml	4°C	25
L-Tyrosine	0.225g/ 250 ml	RT	100
L-Isoleucine	0.36g/ 100 ml	4°C	25
L-Lysine-HCl	0.36g/ 100 ml	4°C	25
L-Phenylalanine	0.75g/ 250 ml	RT	50
L-Glutamic Acid	1.5g/ 250 ml	RT	50
L-Aspartic Acid	1.0g/ 250 ml	RT	75
L-Valine	1.8g/ 100 ml	4°C	25
L-Threonine	2.4g/ 100 ml	4°C	25
L-Serine	4.5g/ 100 ml	4°C	25
L-Leucine	0.36g/100 ml	RT	25
L-Tryptophan	0.48g/ 100 ml	Filter 4°C	25
Uracil	0.24g/ 500 ml	RT	25
			600 ml

Autoclavar todas las soluciones excepto triptófano que debe ser filtrada.

Filtrar y conservar a 4°C.

ANEXO II

Caracterización fisicoquímica de las muestras

Los ensayos para la caracterización fisicoquímica de las muestras fueron realizados en su mayoría en el LATU y alguno de ellos enviados a laboratorios del exterior. Los métodos y normas utilizados fueron los siguientes:

- pH- PEC.PQAR101 basado en APHA 4500 H;
- Grasas y aceites- PEC.PQAR007 basado en APHA 5520 D;
- Cianuros- PEC.PQAR602 basado en EPA 335.4;
- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)- PEC.PQAR010 basado en APHA 5210 B;
- DQO- ISO 15705-2002 (E);
- Turbiedad: basado en ISO 7027;
- Oxígeno disuelto-APHA 4500 O G;
- Color- ISO 7887 modificado con ASTM D 1205;
- AOX- PEC.PQAR604 basado en ISO 9562:2004;
- Carbono orgánico total (como NPOC)- PEC.PQAR605 basado en norma ISO 8245:1999;
- TensioactivosAniónicos (MBAS): sustancias activas al azul de metileno- APHA 5540 C.
- Sulfuros- APHA 4500 S D
- Amonio- PEC.PQAR612 basado en APHA 4500 NH3 -D
- Fenoles- PEC.PQAR.603 QuickChemMethod 10-210-00-1-x basado en EPA 420.1 modificado
- Nitrógeno total- PEC.PQAR.606 basado en ISO 11905-2.
- Fósforo total Quikchem Method 31-115-01-3-D
- Toxicidad aguda Pimephales promelas- EPA -821-R-02-012. Test method 2000.0
- Toxicidad aguda (Daphnia magna)- "Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*". EPS 1/RM/14, EnvironmentalProtection Series, EnvironmentCanada, Ottawa, Ontario, Canada, 2a ed., diciembre 2000. Método estadístico: Binomial
- Toxicidad aguda (Vibrio fischeri)
- Conductividad PEC.PQAR112 basado en APHA 2510
- Taninos y ligninas
- Clorato - PEC.PQAR113 basado en EPA 300.1
- Peróxido

Todos los reactivos utilizados en los ensayos fueron de grado ppa y el agua de calidad ultrapura (resistividad >18MΩ), (equipo de purificación de agua – Milipore Simplicity 185).

	Efluente industrial	Arroyo Fray Bentos
Sulfuros (Como S) (mg/l) (LD: 0,1 mg/l)	ND	--
Amonio (como N) (mg/l) (LD: 0,01 mg/l)	30 µg/l	ND
Grasas y aceites (mg/l) (LD: 5 mg/l)	ND	ND
AOX (como Cl) (µg/l) (LD: 10 mg/l)	1,94	<17 µg/l
Fenoles (como C5H6OH) (LD: 1 µg/l)	3,77	--
Tensioactivosaniónicos (como LAS) (LD: 14µg/L)	53,9 µg/l	ND
cDBO ₅ (como O ₂) (mg/l)	18,0	23
DQO (como O ₂) (mg/l)	194	<14
Nitrógeno total (como N) (mg/l)	1,14	--
Fósforo total (como P) (mg/l)	1,12	0,5
Toxicidad aguda Pimephales promelas CL50, 96 hs	>100% (No tóxico)	>100% No tóxico
Toxicidad aguda (Daphnia magna) CL50, 96 hs	>100% (No tóxico)	>100% (No tóxico)
Toxicidad aguda (Vibrio fischeri)	>100% (No tóxico)	S/D
pH	7,77	7,44
Turbiedad (NTU)	--	11
Color (unidadPt-Co)	375	43
Cianuro (como Cn) (µg/l) (LD: 4 µg/l)	ND	<5
Carbono orgánico total (como C) (mg/l)	--	10,4
Oxígeno disuelto (como O ₂) (mg/l)	--	7,41
Conductividad (ms/cm)	364,6	--
Taninos y ligninas (como taninos) (mg/l)	4,13	--
Cloratos (como ClO ₃) (mg/l)	75,6	--
Peróxidos (como H ₂ O ₂) (mg/l)	11,8	--
Di-n-octilftalato (DNOP) (µg/l)	<100	< 1
Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) (µg/l)	28	2.7
4-para-nonilfenol (µg/l)	44	8.3
Para-tert-octilfenol(µg/l)	0.19	12
Estrona (E ₁)	3,5 pg/l	2.2ng/l
Estradiol (E ₂)	1.2 pg/l	0.6ng/l
Estriol (E ₃)	ND	1 (ng/l)
Etinil estradiol (EE ₂) (ng/l)	---	< 0.2
E1-3S (ng/l)	---	0.5
Bisfenol A (BPA) (ng/l)	---	< 1

ND: No detectable