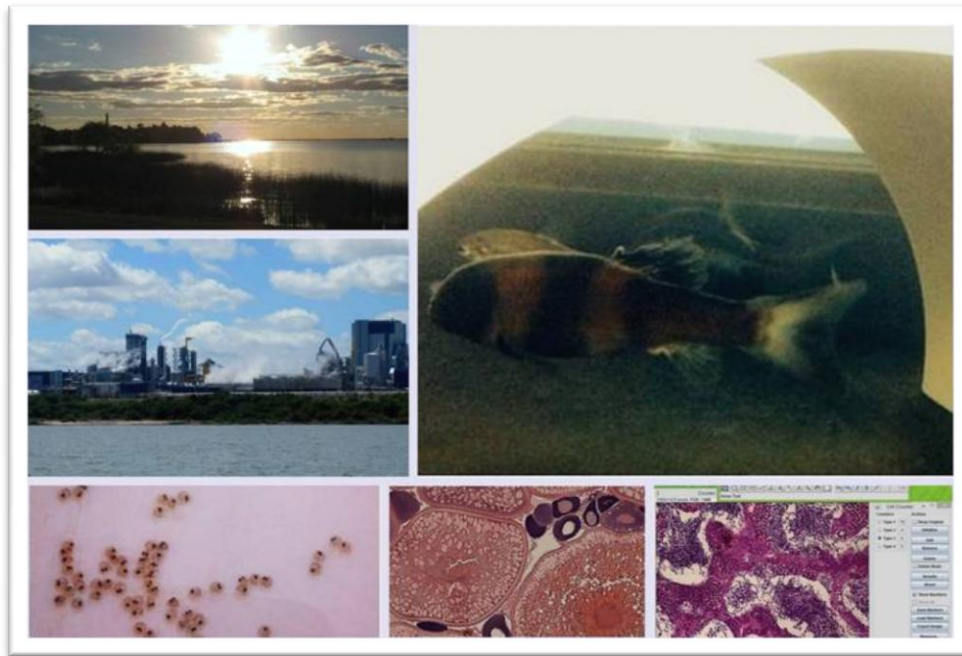


Evaluación de los efectos de efluentes industriales y urbanos sobre aspectos de la reproducción en el pez

Pimephales promelas.

Lic. Agustín Carnikian Fernández



Tesis para obtener el título de Magister en Ciencias Biológicas opción Zoología.

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas – PEDECIBA

Orientador

Dra. Denise Vizziano-Cantonnet

Laboratorio de Fisiología y Ecología de la Reproducción en peces

Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay

*"Sou também como a água:
Nenhuma barreira poderá represar-me
e impedir que me torne um grande oceano;
se barrarem a minha passagem
colocando grandes pedras no meu leito,
converter-me-ei em torrente, cachoeira, e
saltarei impetuosamente;
se me fecharem todas as saídas
eu me infiltrarei no subsolo
permanecerei oculto por algum tempo,
mas não tardarei em reaparecer;
em breve estarei jorrando
através de fontes cristalinas,
para saciar deliciosamente a sede dos transeuntes;
se me impedirem também de penetrar no subsolo,
eu me transformarei em vapor,
formarei nuvens e cobrirei o céu;
e, chegando a hora,
atrairei furacão, provocarei relâmpagos e trovões,
desabarei torrencialmente,
inundarei e romperei quaisquer diques e
serei finalmente um grande oceano."*

Masaharu Taniguchi

AGRADECIMIENTOS

Son infinitas las gracias que tengo que dar, ha pasado mucho tiempo desde el inicio de esta maestría en donde hubo muy buenos momentos.

Primeramente agradecer a los que financiaron la realización de esta investigación, al Laboratorio Tecnológico del Uruguay y el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología en Peces de la Facultad de Ciencias en donde se desarrolló todo el trabajo de maestría.

Continúo con mis agradecimientos hacia mi tutora, la Dra. Denise Vizziano-Cantonnet quien supo guiarme, valoro su tiempo y dedicación y sus aportes de conocimiento e ideas durante todo el trayecto de la maestría.

También a la Ph.D. Diana Miguez impulsora original de la idea de esta maestría, muchas gracias por el tiempo dedicado, por compartir su conocimiento y su entusiasmo.

A los miembros del tribunal por su tiempo y dedicación en la lectura de esta maestría.

A Karen Keel que formó parte de este grupo de investigación en donde compartimos muy buenos momentos de trabajo experimental e intercambio de ideas

A Marlene y Guislana por su apoyo invaluable con la histología.

A todos mis compañeros de trabajo del departamento de Aguas y Productos Químicos del LATU que me ayudaron muchísimo y me

impulsaron a seguir trabajando. Ellos son: Patricia, Karina, Marcelo, Ricardo, Ignacio, Victoria, María José, Rosario, Laura, Leticia, María Eugenia, Tania, Santiago y la Ing. Cecilia. Extiendo mis gracias a todos aquellos ex-compañeros de trabajo que estuvieron en "Aguas" y principalmente a aquellos que me ayudaron en el desarrollo de las experimentales: Anabel Martínez, Diego Charquero, Agustina Aizpún, Shirley Cabrera y Marcelo Bado.

A Julio Berbejillo, Maite Letamendía, Santiago di Landro y Anabel Martínez, grandes compañeros del FREP. A Anabel especialmente por todas las horas compartidas en LATU y en FREP, siempre dispuesta a ayudar y transmitir sus conocimientos.

A Gustavo Saona compañero y amigo de la ecotoxicología.

A mis ex – compañeros de trabajo y amigos del Colegio San José de la Providencia, que siempre me motivaron para seguir adelante. Especialmente a Uriel, Niko, Nico, Javier, Andy, Juana, Raúl, Laura, Ana y Félix.

A mis grandes amigos de toda la vida para que nos sigamos viendo siempre y cada vez seamos más.

Para lo último quiero decirles gracias a: Natty, los Ramos y afines y a todos los Carnikian Fernández y afines. Con el apoyo de todos ustedes y cada uno, con el aporte de todos ustedes y cada uno y con el cariño y el amor de todos ustedes y cada uno es que pude llevar adelante todo.

Quiero agradecer especialmente a Natty. Por haber estado siempre, por haberme bancado en los mejores y peores momentos y porque siempre

quisiste lo mejor para mí. Sin vos haber hecho todo esto hubiera sido inimaginable. Gracias por todo!

CONTENIDOS

RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
<i>Pimephales promelas</i>	14
Reproducción en peces.....	17
Eje Hipotálamo – Hipófisis – Gónada (HPG).....	19
Gónadas.....	22
Ovario.....	23
Fases de la maduración del ovario.....	27
Tejidos somáticos de soporte.....	35
Testículos.....	38
Espermatogénesis.....	38
Tejidos somáticos de testículos.....	43
Esteroidogénesis gonadal.....	45
Efectos de perturbadores endócrinos sobre <i>Pimephales promelas</i>	48
Hipótesis de trabajo.....	55
Objetivo general.....	55
Objetivos específicos.....	56
MATERIALES & MÉTODOS.....	57
Desarrollo de ensayos de toxicidad crónica.....	57
Diseño experimental.....	57
Obtención de ejemplares	59
Cultivo de ejemplares	60
Selección de muestras.....	60
Colecta del material biológico y obtención de datos.....	61
Estudios histológicos cualitativos y cuantitativos.....	62
Estudios morfológicos y puesta de óvulos.....	65
Análisis de datos.....	67
RESULTADOS.....	68
Bioensayos.....	68
Características morfológicas.....	69
Talla	69
Peso.....	71
Índice gonadosomático.....	73
Tubérculos Nupciales.....	75
Puesta de óvulos.....	76
Resultados histológicos cualitativos.....	79
Análisis histológicos cuantitativos.....	84
Experimento con el efluente urbano.....	84
Experimento con el efluente industrial.....	87
Experimento de tratamiento con estradiol 17- β a 150 ng l ⁻¹	90
Experimental de tratamiento con estradiol 17- β a 450 ng l ⁻¹	93
DISCUSIÓN.....	97
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	116
ANEXO I	131
ANEXO II.....	132

FIGURAS

1.	Ejemplares de <i>Pimephales promelas</i> post-experimentación.....	15
2.	Dimorfismo sexual en <i>Pimephales promelas</i>	16
3.	Representación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en peces.....	21
4.	Ovario de <i>Pimephales promelas</i>	24
5.	Ovario de <i>Pimephales promelas</i>	24
6.	Folículo ovárico.....	25
7.	Ovogonia de <i>Pimephales promelas</i>	28
8.	Ovocito de <i>Pimephales promelas</i> en estadio de cromatina nucleolar	29
9.	Ovocito de <i>Pimephales promelas</i> en estadio perinucleolar.....	29
10.	Ovocito de <i>Pimephales promelas</i> en estadio de alvéolo cortical.....	30
11.	Ovocitos de <i>Pimephales promelas</i> en vitelogénesis temprana y tardía.....	31
12.	Regulación hormonal de la maduración ovocitaria.....	32
13.	Ovocito de <i>Pimephales promelas</i> en estadio maduro.....	32
14.	Folículo post-ovulatorio de <i>Pimephales promelas</i>	34
15.	Ovocito pre-ovulatorio en atresia temprana de <i>Pimephales promelas</i>	35
16.	Interacción de las células de la teca y granulosa en esteroidogénesis.....	37
17.	Túbulo espermatogénico tipo cístico.....	39
18.	Testículo irrestricto de teleósteos.....	40
19.	Espermatocisto de <i>Pimephales promelas</i>	41
20.	Tipos celulares testiculares de <i>Pimephales promelas</i>	42
21.	Células de Sertoli de <i>Pimephales promelas</i>	43
22.	Células de Leydig de <i>Pimephales promelas</i>	45
23.	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en hembras.....	47
24.	Esquema de diseño experimental.....	59
25.	Localización de lugar de muestreo y planta de producción de celulosa.....	61
26.	Clasificación de estadios gonadales en el ovario de <i>Pimephales promelas</i>	63
27.	Clasificación de estadios gonadales en el testículo de <i>Pimephales promelas</i>	64
28.	Tubérculos nupciales en <i>Pimephales promelas</i>	66
29.	Ejemplares de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición con dimorfismo sexual.....	69
30.	Longitud total de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	71
31.	Peso de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	73
32.	IGS de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	74
33.	Tubérculos nupciales de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	76
34.	Puesta de óvulos de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	78
35.	Histología de testículo de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	79
36.	Estadios de desarrollo testicular de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	80
37.	Histología de ovario de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición	82
38.	Estadios de desarrollo ovárico de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	83
39.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente urbano.....	85
40.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente urbano.....	86
41.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente industrial.....	88
42.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente industrial.....	89
43.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a E2 17-β 150 ng l ⁻¹ ...91	
44.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestos a E2 17-β 150 ng l ⁻¹ ...92	
45.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a E2 17-β 450 ng l ⁻¹ ...94	

46. Histología cuantitativa de hembras de *P. promelas* expuestas a E2 17-β 450 ng l⁻¹ 95

TABLAS

1.	Efectos en <i>Pimephales promelas</i> expuestos a efluentes urbanos e industriales.....	51
2.	Estadios gonadales en ovarios y testículos de <i>Pimephales promelas</i>	62 y 63
3.	Talla de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	70
4.	Peso de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	72
5.	IGS de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	74
6.	Tubérculos nupciales de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	75
7.	Óvulos puestos de <i>Pimephales promelas</i> post-exposición.....	77
8.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente urbano.....	84
9.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestas un efluente urbano.....	86
10.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a un efluente industrial.....	87
11.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestas a un efluente industrial.....	89
12.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a E2 17-β 150 ng l ⁻¹ ...	90
13.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestas a E2 17-β 150 ng l ⁻¹ ...	93
14.	Histología cuantitativa de machos de <i>P. promelas</i> expuestos a E2 17-β 450 ng l ⁻¹ ...	93
15.	Histología cuantitativa de hembras de <i>P. promelas</i> expuestas a E2 17-β 450 ng l ⁻¹ ...	95
16.	Efectos observados en <i>Pimephales promelas</i> expuestos a un efluente urbano, un efluente industrial y las dosis de E2 17-β 150 ng l ⁻¹ y 450 ng l ⁻¹	96

RESUMEN

En esta tesis se evaluaron los efectos del agua del arroyo Fray Bentos que recibe la descarga de efluentes de Fray Bentos (efluente urbano) y del efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa de la misma ciudad, utilizando como modelo de estudio toxicológico a la especie de pez *Pimephales promelas*. Asumiendo que este tipo de efluentes pueden ser estrogénicos o androgénicos y por lo tanto actuar como perturbadores endócrinos afectando al sistema reproductivo, la hipótesis de trabajo fue considerar que dichos efluentes tenían actividad estrogénica. Se analizaron los efectos de la exposición de los efluentes mediante el estudio de la histología gonadal, a niveles cualitativos y cuantitativos. También se evaluó el posible efecto sobre el índice gónado - somático (IGS), los tubérculos nupciales y la puesta de óvulos, características que pueden ser afectadas por los perturbadores endócrinos y para conocer si los efluentes no afectan el normal desarrollo de los peces se estudió su talla y peso en organismos control y tratados.

La exposición durante 21 días de los peces al estradiol en dos dosis (150 y 450 ng l⁻¹), y a los efluentes urbanos e industrial no produjeron alteraciones cualitativas a nivel gonadal como degeneración celular o el desarrollo de testis-ova u ova-testis. Solamente la dosis más

baja de estradiol (150 ng l^{-1}) tuvo efecto en alguna de las variables analizadas. El estradiol no afectó la talla, el peso total, el IGS, el número de tubérculos nupciales, ni indujo cambios en la histología gonadal. Sin embargo, dicha dosis indujo una disminución significativa ($p < 0.05$) del 42% en el número de espermatozoides y un aumento significativo ($p < 0.05$) del 50% en los óvulos liberados. Esta fue nuestra referencia de estrogenicidad en las condiciones experimentales utilizadas. El único efecto significativo observado en el efluente urbano fue una disminución en la talla de los machos, el resto de los elementos estudiados no presentó una variación cualitativa o cuantitativa. El número de óvulos liberados totales aumentó a partir del día 13, pero la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Este aumento del número total de óvulos emitidos al final del experimento es un dato que sugiere un posible efecto estrogénico leve del efluente urbano.

Por su parte el efluente industrial no afectó las variables estudiadas salvo el número de óvulos liberados que disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) a la mitad, lo que sugiere una actividad androgénica que afecta a un parámetro reproductivo fundamental como lo es el número de óvulos emitidos. Este resultado podría tener un efecto a nivel poblacional de comprobarse efectos similares en estudios en especies de peces nativas.

INTRODUCCION

Muchos cuerpos de agua reciben cantidades significativas de productos químicos naturales y sintéticos (de fuentes puntuales y difusas) que actúan como perturbadores endócrinos (EDCs) y que constituyen una amenaza para la salud reproductiva de las poblaciones de peces (Hutchinson et al. 2006) debido a que el sistema reproductivo de los peces es sensible a sus efectos (Gregory et al. 2007).

Las fuentes comunes de EDCs incluyen efluentes urbanos (Nichols 1999, Todorov et al. 2002, Filby 2007), industriales (Parrot 2005, Mc Master 2006, Hewitt 2008) y el uso de agroquímicos (Tillit et al. 2010).

La Organización Mundial para la Salud (OMS) en su programa internacional de seguridad química (IPCS, 2002) define a los perturbadores endócrinos (EDCs) como "una sustancia o mezcla de éstas que posee propiedades que podrían conllevar a la perturbación endócrina en un organismo intacto, en su progenie, o en sus (sub) poblaciones" (Heindel et al. 2012).

Cualquier alteración de las señales endócrinas o en el bloqueo de sus funciones puede resultar en alteraciones en las funciones de este sistema (Gregory et al. 2007).

Comúnmente hay dos vías por las cuales un compuesto químico puede alterar la acción de las hormonas: una vía en la cual el compuesto químico interacciona con el complejo proteico hormona-receptor y otra vía en la el compuesto químico ejerce su acción sobre una proteína que controla o regula el envío de la hormona al lugar y tiempo correcto (Heindel et al. 2012).

Los perturbadores endócrinos tienen el potencial de modular o interrumpir la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas endógenas en el organismo afectando la homeostasis, el desarrollo, la reproducción y el comportamiento de los organismos (Segner et al. 2003).

Algunos EDCs pueden imitar a las hormonas sexuales en su accionar y producir la alteración de dichas hormonas llevando a cambios o fallas en la reproducción (Bernanke 2008). Sin embargo, los efectos de la exposición a EDCs pueden llegar a ser difíciles de cuantificar y evaluar porque el sistema endócrino de los vertebrados es complejo (Denslow & Sepúlveda 2007).

Una de las formas de detección de efectos inducidos por un perturbador endocrino potencial a nivel biológico es el uso de diferentes modelos animales para comprobar si se dan alteraciones en las funciones en los mismos como la reproducción, el crecimiento o el

comportamiento.

Los "Bioensayos" son experimentos diseñados para utilizar el organismo correcto, la variable a medir en un medio y tiempo deseado (Taylor & Scroggins 2013). Permiten determinar la toxicidad de una sustancia o un material mediante la medición de los efectos que producen en organismos vivos (Taylor & Scroggins 2013). Con el incremento de la experiencia en bioensayos y en el cultivo de peces las técnicas se han vuelto cada vez más sofisticadas (Ankley et al 2001).

En Uruguay se ha instalado una industria de producción de pulpa de celulosa en las cercanías a la ciudad de Fray Bentos y la presencia de compuestos químicos capaces de comportarse como EDCs en el efluente que es vertido al río Uruguay (Miguez 2013) requiere de la evaluación ecotoxicológica del mismo.

El Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) impulsa el desarrollo sustentable del país (www.latu.org.uy) y realiza desde el año 1998 bioensayos de toxicidad aguda y crónica en agua dulce con el microcrustáceo *Daphnia magna* y desde el año 2007 con el pez *Pimephales promelas*. Esta especie de pez es un modelo de estudio de toxicología validado previamente en América del Norte (Ankley et al. 2001, Wolf et al. 2004, Leino et al. 2005, USEPA 2006) para evaluar el

posible impacto de los compuestos químicos, efluentes industriales y urbanos sobre una parte de la biota.

Antecedentes de exposición en Uruguay de *P. promelas* fueron realizados por Keel (2012) como parte de este mismo proyecto de investigación sobre marcadores moleculares de la reproducción en el hígado. A su vez, Saona et al. (2015) compararon la respuesta aguda de distintos efluentes industriales sobre las larvas de la especie autóctona de pez *Cnesterodon decemmaculatus* con larvas de *P. promelas*.

***Pimephales promelas* "Fathead minnow"**

Pimephales promelas Rafinesque, 1820 (Teleostei:Cipriniformes) es una especie presente en E-E.U.U. a través del medio-oeste, en la cuenca superior del río Missisipi, al oeste hasta el estado de Utah, al norte hasta Canadá y en el este hasta el estado de Maine (Page & Burr 2011).

Debido a su extensa distribución y su fácil cultivo en laboratorio se la ha utilizado ampliamente en test de toxicidad aguda, crónica y ensayos de ciclo de vida en América del Norte y Europa (Dietrich & Krieger 2009).

P. promelas es un pez pequeño de coloración amarronada en la región dorsal y plateada en la ventral (Fig. 1). Los adultos miden entre 3,5 y 7,5 cm y alcanzan la madurez sexual a los 4 - 5 meses post-eclosión (Jensen 2001; Dietrich y Krieger 2009).

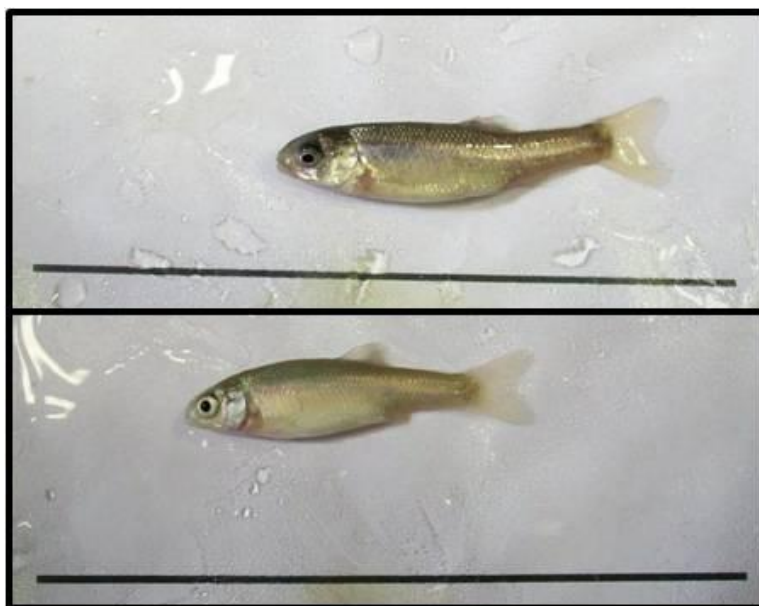


Figura 1. Ejemplar macho (imagen superior) y hembra (imagen inferior) de *P. promelas* después de la exposición a un ensayo de toxicidad crónica de 21 días de duración (Barra = 10 cm.).

Posee dimorfismo sexual bien marcado en la etapa de cortejo, en el cual las hembras desarrollan el ovipositor y los machos presentan una coloración característica de 1 franja lateral vertical oscura y 2 plateadas (Fig 2). También los machos poseen tubérculos nupciales en el hocico y en este periodo presentan el desarrollo de tejido esponjoso a manera de cresta conocido como "cresta dorsal" o "Dorsal Pad" en la región dorsal desde el espacio interorbital hasta la base de la aleta dorsal (Fig. 2).

Su estrategia reproductiva corresponde a la de un desovante fraccionado (la puesta de óvulos de a 50 - 100 huevos cada 3 - 5 días) y la gametogénesis en ambos sexos ocurre asincrónicamente (Ankley et al. 2001).

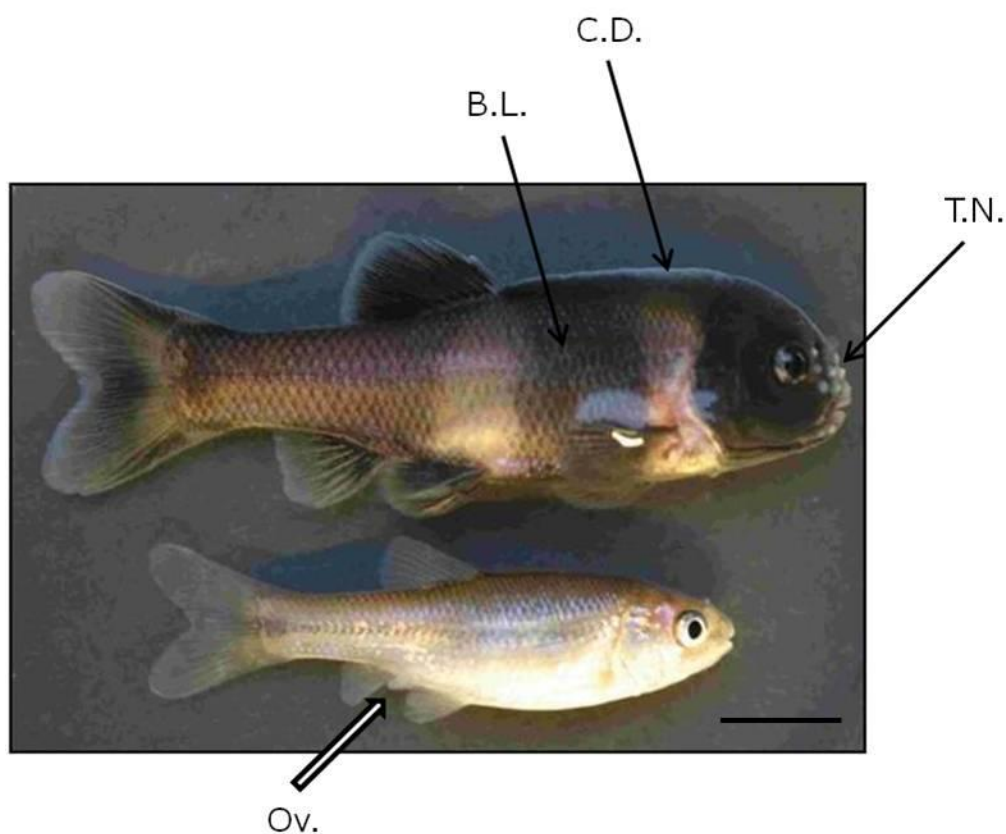


Figura 2. Dimorfismo sexual en *P. promelas*. Arriba un ejemplar macho y abajo hembra (Tomado de <http://aquaponicsnation.com>) (B.L.: banda lateral; C.D.: cresta dorsal; T.N.: tubérculos nupciales; Ov.: ovipositor. Barra = 1cm.).

Reproducción en peces

Los peces teleósteos han sido ampliamente estudiados desde inicios del siglo XX, desde el punto de vista morfológico, reproductivo y endocrinológico (Fostier et al. 1983, Nagahama 1983, 1994, 2008, Peter 1983) especialmente teniendo en cuenta el eje hipotálamo-hipófisis-gónada tanto con objetivos básicos como aplicados a la acuicultura.

Con el surgimiento de problemas de contaminación ambiental y la detección de productos químicos capaces de comportarse como perturbadores endócrinos vertidos en el medio ambiente, la información generada en peces resultó muy importante para evaluar a través de los mismos los posibles efectos de efluentes urbanos e industriales sobre una parte de la biota. Es por ello que autores como Segner et al. (2003) y Ankley et al. (2001) han recomendado el uso de estos vertebrados para el desarrollo de test de estudios sobre disrupción endócrina.

El Sistema endócrino es, en conjunto con el sistema nervioso, el encargado del mantenimiento de la homeostasis y del control del ambiente interno. Funciona a través de la liberación de moléculas que regulan a los órganos mediante su unión primaria a los receptores celulares de dichos órganos. El sistema endócrino incluye a todos los

órganos que funcionan exclusivamente como glándulas endócrinas así como también a aquellos que secretan moléculas en conjunto con otras funciones (Raven & Jhonson 2001). Este sistema se comunica a través de mensajeros químicos llamados hormonas (Hickman et al. 2001).

Las gónadas son glándulas exócrinas y endócrinas y están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada que asegura en peces una actividad cíclica que permite la reproducción y por lo tanto la sobrevivencia de una especie.

La actividad reproductiva es estacional o cíclica porque se ha acoplado desde el punto de vista ecológico con los factores ambientales que permitan la sobrevivencia de los embriones y larvas y sea por tanto exitosa. El proceso de la reproducción sexual está controlado por hormonas y regulado por factores ambientales como la ingesta de alimento, cambios en el fotoperíodo, patrones de lluvias, temperatura, estímulos sociales (Hickman & Roberts 2001). El sistema reproductor de es sensible a los efectos de los contaminantes ambientales (Gregory et al. 2007).

El sistema nervioso central posee un rol fundamental en el control de la reproducción bajo dos aspectos principales: integra las señales externas (luz, temperatura, nutrientes, factores sociales) e internas (hormonales) y transmite las señales a los efectores endócrinos a través de una acción moduladora sobre la actividad de la hipófisis.

Eje Hipotálamo – Hipófisis – Gónada (HPG)

Cada individuo cuenta con un sistema que reciba las informaciones procedentes del exterior así como del interior del organismo, integrándolas y regulándolas. Estas complejas funciones se llevan a cabo a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónada (Kah et al. 1993). Los estímulos ambientales son captados por el SNC y este responde liberando neurohormonas (Muñoz Cueto 2005).

Las neurohormonas relacionadas con el sistema gonadal en la hipófisis se conocen como hormonas liberadoras de gonadotropinas o por su sigla en inglés GnRH (gonadotropin releasing hormone). El GnRH producido por el hipotálamo es un decapeptido que en peces teleósteos accede a la hipófisis anterior por inervación directa, y su interacción con receptores específicos situados en las membranas de las células gonadótropas, los cuales, acoplados a sistemas de segundos mensajeros estimulan la síntesis y secreción de gonadotrofinas (Peter et al. 1991).

Las gonadotrofinas son hormonas de naturaleza glico-proteica y dirigen el desarrollo gametogénico y la secreción de esteroides gonadales (Nagahama 1994).

En peces la gonadotrofina GTH I corresponde a la hormona

folículo estimulante (FSH) de tetrápodos y GTH II a la hormona luteinizante (LH) (Querat et al. 2000). La acción de éstas en las gónadas está mediada por la unión de las mismas a receptores de membrana de ciertas células gonadales e implica la activación de la ruta de síntesis y secreción de diferentes esteroides sexuales (Swanson 1991). Los esteroides sexuales actúan sobre el hígado, la gónada, la hipófisis y el cerebro en un circuito de retroalimentación.

El eje HPG es un sistema dinámico con retroregulaciones positivas y negativas que permiten un óptimo control del proceso reproductivo (Dietrich & Krieger 2009) (Fig. 3). Una de las definiciones más utilizadas de disruptores endocrinos desde una perspectiva regulatoria los considera como: "agentes que causan alteraciones en la reproducción o el desarrollo a través de efectos directos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG) o hipotálamo-hipófisis-tiroide (HPT) (Ankley et al. 2009).

Es por ello que una alteración en cualquier parte del eje HPG puede afectar el desarrollo final de la gónada y en especial la producción de gametos viables que es el punto clave que permitirá una reproducción exitosa.

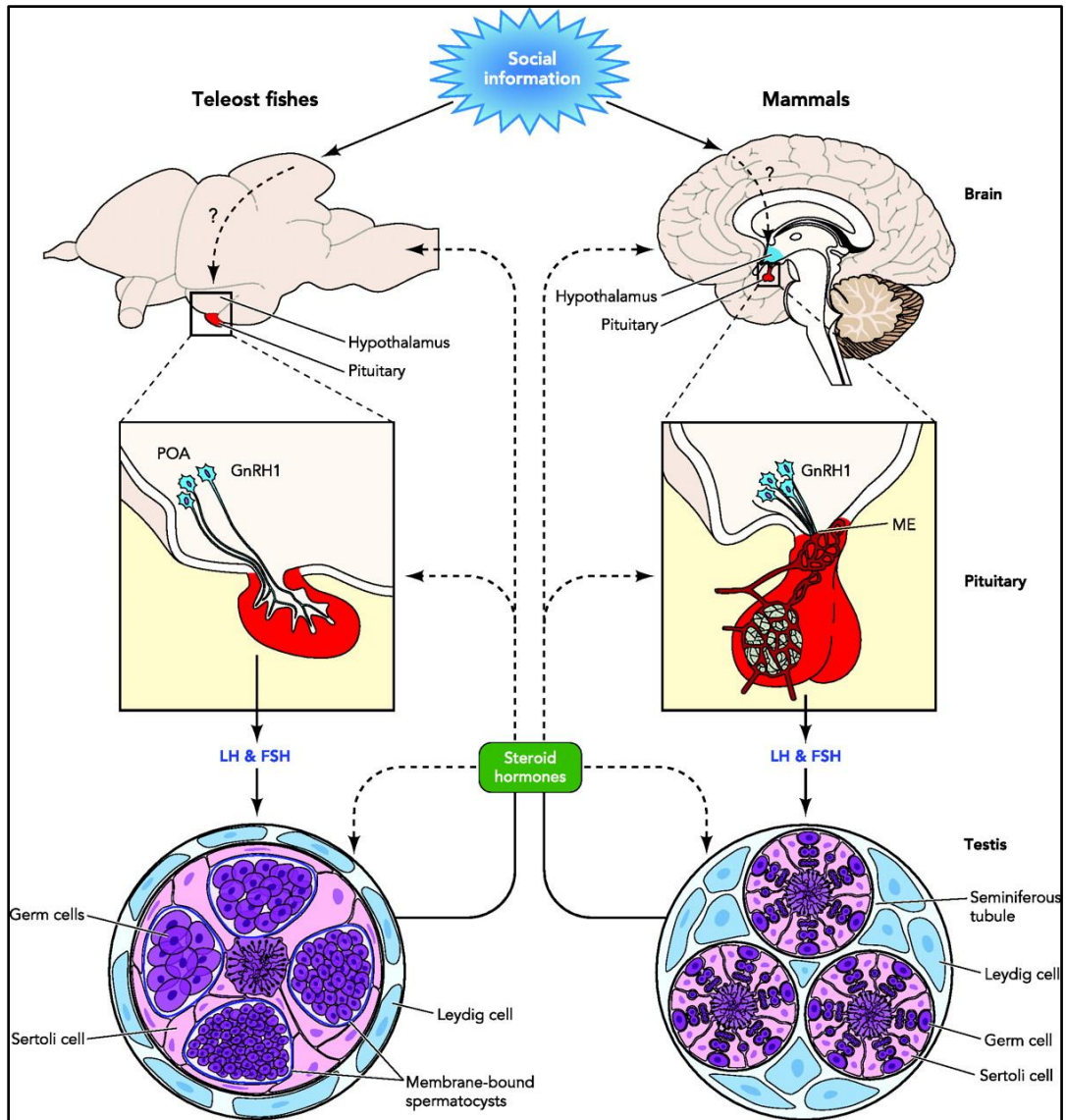


Figura 3. Representación esquemática del Eje Hipotálamo - Hipófisis - Gónada (HPG) en peces teleósteos y en mamíferos. En los teleósteos las neuronas hipotalámicas alcanzan directamente a la hipófisis/pituitaria (tomado de <http://physiologyonline.physiology.org/content/26/6/412>).

Gónadas

Considerando la complejidad del proceso de generación de gametos o gametogénesis y la capacidad de los disruptores endócrinos de afectar dicho proceso es necesario que las etapas que comprenden el desarrollo de la gametogénesis en especies de peces modelo estén bien caracterizadas a nivel histológico.

La comparación de efectos observables a nivel gonadal a través de la histología (ej: ova-testis; retraso en la espermatogénesis) y la posible relación entre dicho efecto y el agente disruptor depende fuertemente de los estudios de la biología reproductiva de la especie de pez en consideración.

Para *P. promelas* los estudios de la biología reproductiva son numerosos (Yonkos et al. 2000, Jensen et al. 2001, Ankley et al. 2001, USEPA 2006, Watanabe et al. 2007, Dietrich & Krieger 2009), habiéndose desarrollado normas y protocolos de los efectos de EDCs sobre la gónada de esta especie de pez (USEPA 2002, OECD 2009).

Dado a que el interés es demostrar la presencia de alteraciones morfológicas en ovarios y testículos de *P. promelas*, así como también en algunos de sus parámetros reproductivos se desarrolla en la próxima sección una introducción sobre la morfología gonadal del modelo de estudio en base a trabajos previos realizados por diversos autores.

Ovario

El sistema reproductor femenino de los peces teleósteos es altamente variable (Dietrich & Krieger 2009). En *P. promelas* el ovario es un órgano formado por lóbulos elongados orientados longitudinalmente dentro de la cavidad abdominal que contienen ovocitos en varios estadios de madurez (Yonkos et al. 2000) (Fig 4). Los ovarios están rodeados por la túnica albugínea constituída por tejido conjuntivo fibroso, en continuidad con el mesovario (Fig. 5). La túnica albugínea se pliega dentro de las lamelas ovígeras, las cuales están orientadas perpendicularmente al eje mayor de cada lóbulo del ovario. Las paredes de las lamelas ovígeras están compuestas de epitelio germinal y folicular sostenidas por el tejido conjuntivo estromal.

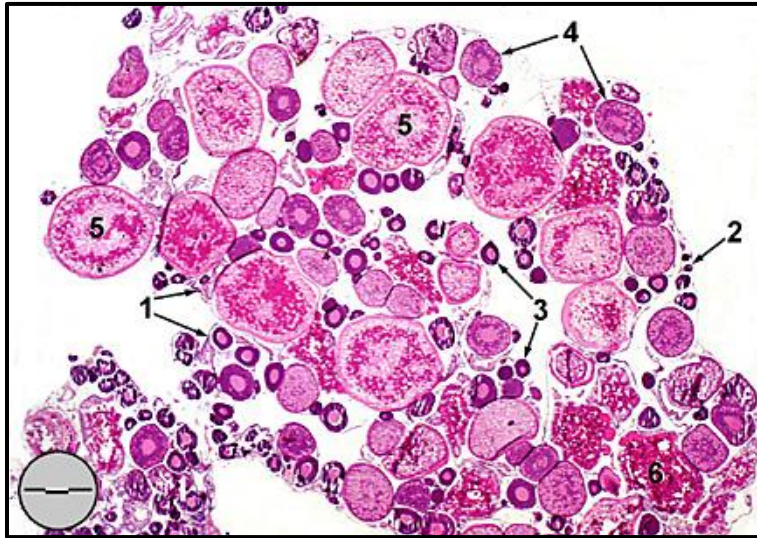


Figura 4. Ovario de *P. promelas*. 1. Tejido conjuntivo de la túnica albugínea; 2. Ovocito en estadio II; 3. ovocito en estadio III; 4. Ovocito en estadio IV; 5. Ovocito en estadio V; 6. Ovocito atrésico (Tomado de Yonkos et al. 2000. Barra = 412 μm . <http://aquaticpath.php.ufl.edu/fhm/female.html>).



Figura 5. Ovario de *P. promelas*. 1. tejido conjuntivo de la túnica albugínea; 2. ovocito en estadio III; 3. ovocito en estadio IV; 4. ovocito en estadio tardío V; 5. ovocito en estadio V temprano; 6. ovocito atrésico; 7. vaso sanguíneo (Tomado de Yonkos et al. 2000. Barra = 186 μm . <http://aquaticpath.php.ufl.edu/fhm/female.html>).

Los folículos ováricos (Fig. 6) se originan a partir del epitelio germinal y están formados por los ovocitos y las células somáticas que lo rodean. Las células somáticas son las células de la granulosa y de la teca y constituyen la envoltura folicular; éstas presentan un desarrollo sincrónico paralelo al de las células de la línea germinal. Los ovocitos están cubiertos por la envoltura vitelina, corion o zona radiata la cual es una envoltura acelular que rodea al ovocito y se deposita entre la membrana celular ovocitaria y las células de la granulosa, paralelamente a la vitelogénesis.

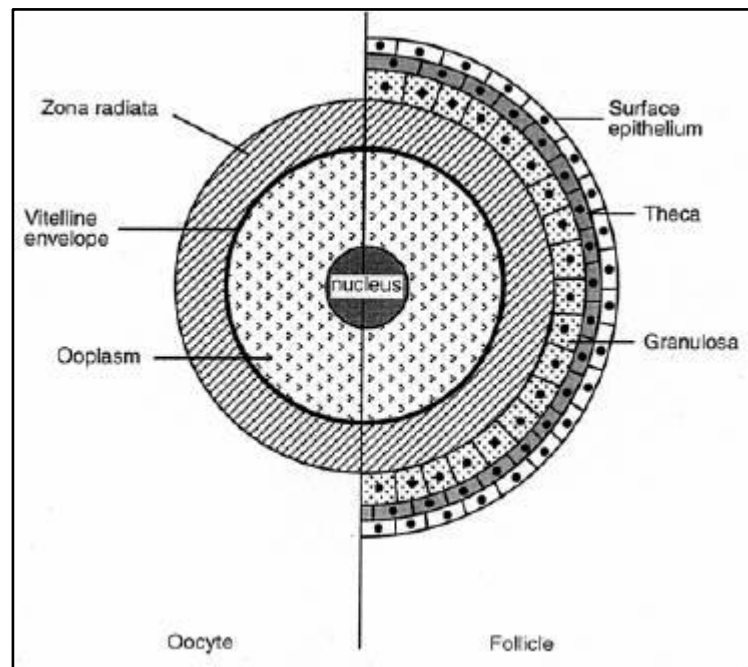


Figura 6. Folículo ovárico. Este término se utiliza cuando el ovocito se encuentra rodeado de las capas de células de la teca y células de la granulosa (tomado de USEPA 2006).

Muchos teleósteos son reproductivamente cíclicos por tanto el ovario varía en apariencia durante el desarrollo del ciclo reproductivo. Se reconocen tres tipos de ovarios según sus estrategias de desove: sincrónicos, de grupo sincrónico y asincrónico. En los sincrónicos todos los ovocitos se desarrollan y ovulan al mismo tiempo, en los de grupo sincrónico se reconocen por lo menos dos grupos de ovocitos presentes para un mismo momento del ciclo y en los asincrónicos ovocitos en todos los estadios de desarrollo están presentes en una etapa determinada (Dietrich & Krieger 2009).

Pimephales promelas posee un ovario de tipo asincrónico (Fig. 4 y 5) sin embargo, para esta especie se reconoce una variante (Dietrich & Krieger 2009). *P. promelas* se define como desovante fraccionado cada dos a tres días. La frecuencia de tamaños de los ovocitos es continua excepto en ovarios maduros, en donde hay una clara separación entre los ovocitos maduros y en vitelogénesis (Dietrich & Krieger 2009).

Fases de la maduración del ovario

Después de la formación de las células primordiales (PGCs) y su posterior transformación en ovogonias la ovogénesis puede ser descrita en 4 pasos principales de acuerdo a Dietrich & Krieger (2009):

- Transformación de las ovogonias en ovocitos (inicio de la meiosis)
- Crecimiento de los ovocitos, el ovocito acumula reservas nutricionales necesarias para el desarrollo del embrión y también ARN y completa la diferenciación de sus envolturas celulares y no celulares. El ovocito queda detenido en la primera profase meiótica (Lubsenz et al. 2010).
- Maduración. Reanudación de la meiosis, rompimiento de la envoltura del núcleo o vesícula germinal (GVBD), como consecuencia del reinicio de la meiosis detenida en profase y liberación del primer corpúsculo polar al final de la primera división.
- Ovulación. Expulsión del ovocito, detenido en metafase II, de su folículo hacia la cavidad ovárica o abdominal según la especie (Lubsenz et al. 2010).

Ovogonias - Después de la diferenciación gonadal o en la vida adulta, al inicio de cada ciclo reproductivo, una fracción de ovogonias (Fig. 7) presentes en los ovarios sufren divisiones mitóticas transformándose en ovocitos lo cual da inicio a la meiosis.

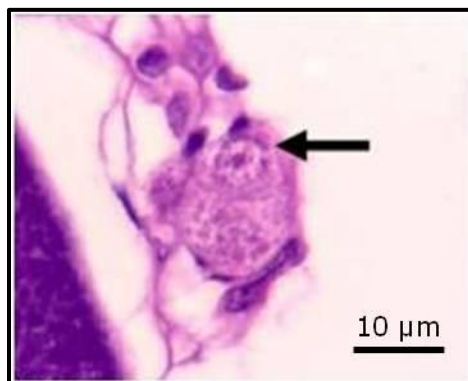


Figura 7. Ovogonia de *P. promelas*. El núcleo de una sola ovogonia es señalado por la flecha (tomado y modificado de USEPA 2006.)

Estadío cromatina nucleolar - los ovocitos surgen del epitelio del ovario. En este estadio, en el cual se ha iniciado la meiosis, esta división se detiene en el diploteno de la primera profase y se establece el folículo inicial o pre-folículo. Las células del pre-folículo (presuntivamente células de la granulosa) y su membrana asociada rodean cada ovocito formando un complejo o un folículo primordial (Fig. 8).



Figura 8. Ovocito en estadio de cromatina nucleolar en el epitelio germinal. (tomado y modificado de USEPA 2006.)

Estadio perinucleolar – concomitante al crecimiento del ovocito, el núcleo o vesícula germinal, aumenta de tamaño y múltiples nucléolos comienzan a observarse en general en la periferia del núcleo (Fig. 9). El citoplasma se tiñe uniformemente a pesar de que en fase avanzada de este estadio comienzan a visualizarse vacuolas en el citoplasma caracterizando el comienzo de la próxima fase.

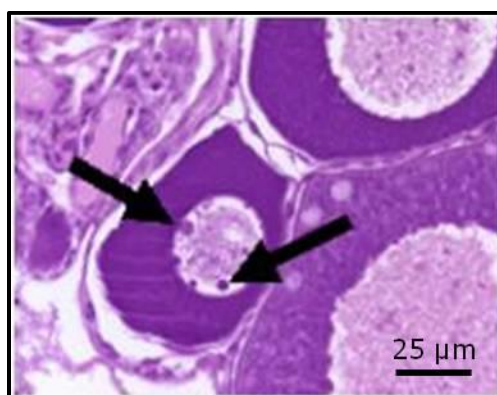


Figura 9. Ovocito de *P. promelas* en estadio perinucleolar. Las flechas indican el surgimiento de nucléolos en la periferia de la vesícula germinal (tomado y modificado de USEPA 2006.)

Alvéolos corticales - Formación de las vesículas o alvéolos corticales en el citoplasma. En las observaciones de cortes histológicos de ovarios coloreados con hematoxilina y eosina (H&E) estas formaciones parecen vacías debido al alto contenido de polisialoglicoproteínas que son sintetizadas por el ovocito durante la mitad y hacia el final del crecimiento previtelogénico. Las vesículas incrementan en número y tamaño y forman columnas en la periferia del ovocito dando origen a los alvéolos corticales (Fig. 10). El término vesícula de vitelo (del inglés "yolk vesicle") es considerado equivocado por Selman et al. (1987) y Bromage & Cumaranatunga (1988); y Selman & Wallace (1989) proponen su reemplazo por el de 'alvéolos corticales' (Dietrich & Krieger 2009).

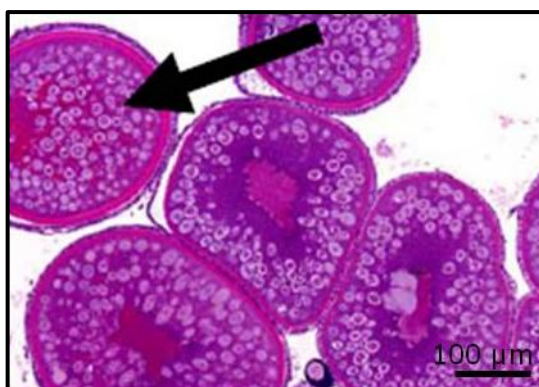


Figura 10. Ovocitos de *P. promelas* en estadio de alvéolo cortical. El citoplasma de los ovocitos se comienza a llenar de vesículas que se denominan alvéolos corticales. Con flecha negra se señala un ovocito entrando en la fase de vitelogénesis temprana (tomado y modificado de USEPA 2006).

Vitelogénesis - La aparición de proteínas de vitelinas formando “gránulos de vitelo”, es característica del estado de vitelogénesis y para *P. promelas* se reconocen los estadios de vitelogénesis temprana y tardía (Fig. 11A y 11B). Los gránulos son muy pequeños al inicio, mantienen su estructura conforme el desarrollo del ovocito formando una “masa” o “fluido” de vitelo. La fusión de los gránulos de vitelo comienza en su formación inicial y continúa hasta la maduración final. El crecimiento del ovocito implica la captación y acumulación de la proteína vitelogenina que llega a la superficie del folículo a través de la circulación sanguínea proveniente del hígado y atraviesa la envoltura folicular y la membrana plasmática del ovocito.

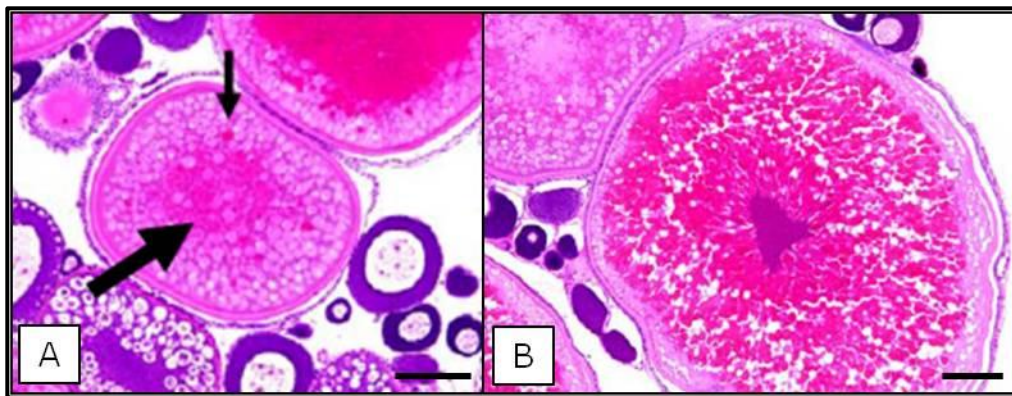


Figura 11. Ovocitos en vitelogénesis de *P. promelas*. Vitelogénesis temprana en A) donde se comienzan a visualizar las vesículas de vitelo en el ovocito. En flecha larga rosados y en flecha corta rojos. Vitelogénesis tardía en b) los gránulos de vitelo llenan el citoplasma y el núcleo tiene una localización central. Barra = 100 μm . (tomado y modificado de USEPA 2006).

Maduración – La maduración del ovocito en peces es regulada por tres mediadores: LH, hormona inductora de la maduración (MIH), y el factor promotor de la maduración (MPF) (Fig. 12) (Nagahama & Yamashita 2008).

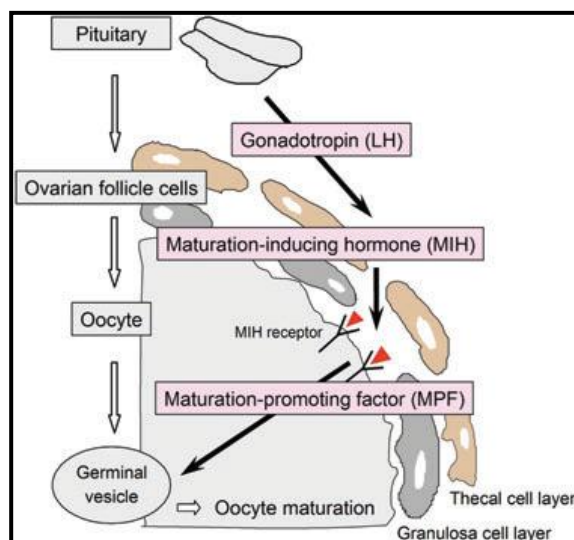


Figura 12. Diagrama esquemático de la regulación hormonal de la maduración en ovocitos en peces. La gonadotropina (hormona luteinizante, LH) liberada desde la pituitaria estimula la producción de la hormona inductora de la maduración (MIH) (17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 17,20 β -DP en muchos peces) por las células foliculares de la teca y granulosa. La señal del MIH induce la formación del factor promotor de la maduración (MPF) induciendo el rompimiento de la vesícula germinal y la maduración ovocitaria (tomado de Nagahama y Yamashita 2008).

El inicio de la maduración está indicado por la migración del núcleo o vesícula germinal hacia el polo animal y la disolución de su envoltura (Fig. 13). En esta etapa continúa y se completa la primera división meiótica, se inicia la segunda división la cual progresa hasta metafase II. A esta altura los ovocitos están prontos para ser liberados y

fecundados.

La fecundación además de la unión de los gametos, induce la liberación del contenido de los alvéolos corticales en el espacio perivitelino, promueve la hidratación, en las especies que poseen este fenómeno, y el endurecimiento de la membrana vitelina o corión así como el reinicio y la culminación de la segunda división meiótica y la expulsión del segundo cuerpo polar (Dietrich & Krieger 2009).

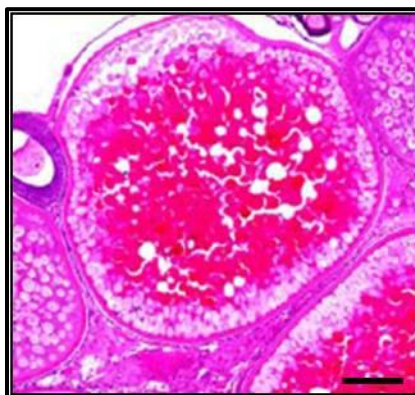


Figura 13. Ovocito en estadio maduro en el ovario de *P. promelas*. El crecimiento de los gránulos de vitelo alcanza su máximo y la migración del núcleo hacia la periferia comenzó. Barra = 100 μ m. (tomado y modificado de USEPA 2006).

Folículos post-ovulatorios - Los ovocitos en metafase II son liberados de sus folículos hacia la cavidad del ovario y las células foliculares quedan en el ovario en forma de estructuras foliadas denominadas folículos post-ovulatorios (FPO). Generalmente, una capa altamente vascularizada de células de la teca caracteriza a los FPO (Fig. 14).

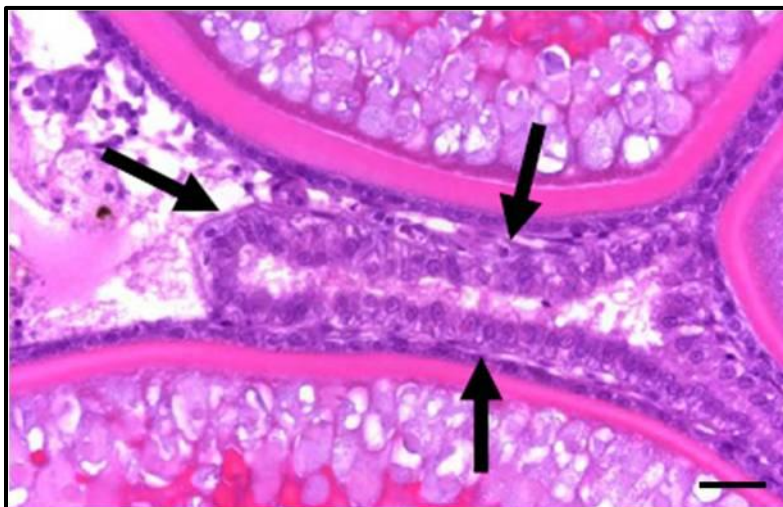


Figura 14. Folículo post-ovulatorio (FPO) en *P. promelas*. Las flechas indican la ubicación del FPO rodeado de 3 ovocitos. Barra = 25 μ m (tomado y modificado de USEPA 2006).

Folículos atrésicos - Es común la presencia de éstos en el ovario (Fig. 15). Además de ser un fenómeno fisiológico de la ovogénesis, el estrés y otros factores ambientales como: mala nutrición, factores físicos, sobrepoblación, xenobióticos, pueden aumentar la cantidad de folículos atrésicos (Dietrich & Krieger 2009). Este mecanismo es un procesos altamente regulado que se considera esencial para el mantenimiento de la homeostasis del ovario (Lubsenz et al. 2010).

El proceso de atresia y la resorción de los folículos ováricos en peces se caracterizan por cambios morfológicos en el ovocito y las células foliculares. Las últimas comienzan a fagocitar con vacuolas digestivas que incorporan y digieren el vitelo del ovocito así como también otros componentes del mismo (Lubsenz et al. 2010). En aquellas especies con ovarios asincrónicos pero con claro patrón de

desove como *P. promelas* la atresia es un proceso de limpieza (Dietrich & Krieger 2009).

La exposición a estrógenos o similares, inhibidores de la enzima aromatasa o compuestos de xenobióticos han inducido aumentos de atresia folicular principalmente en aquellos folículos en vitelogénesis (Dietrich & Krieger 2009).

Este es uno de los procesos que tienen gran interés para la identificación de posibles efectos negativos de los efluentes a estudiar sobre el desarrollo ovocitario y la gametogénesis.

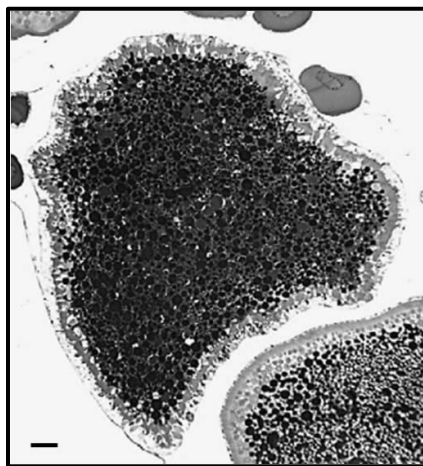


Figura 15. Ovocito pre-ovulatorio en estado de atresia temprana en el ovario de *P. promelas*. Se observa la degradación en proceso de la zona radiata. Barra = 120 μm (Tomado y modificado de Leino et al. 2005)

Tejidos somáticos de soporte

La estructura básica del folículo ovárico (Fig. 6) se establece cuando las células pre-foliculares (futuras células de granulosa) y de su

membrana basal envuelven al ovocito completamente en el estadio de cromatina nucleolar. Las células de la granulosa forman una monocapa, rodeando al ovocito y contactan con él por uniones comunicantes (en inglés: "gap junctions"). A su vez, las células de la granulosa contactan por fuera con las células de la teca, otra capa heterogénea que forma al folículo y las separa de ambas capas una membrana acelular. El ovocito cuando es ovulado está desprovisto de las células de la granulosa y de la teca (Nagahama 1983).

Las células de la granulosa y de la teca producen y convierten los esteroides en los ovarios de los peces (Fostier et al. 1983). En general, las células de la teca son el lugar de la síntesis de los precursores y las de la granulosa el lugar de la conversión de los precursores en sus productos finales (Nagahama 1994).

Células de la teca

Las células de la teca son el lugar de mayor producción de testosterona y 17 α -hidroxi-progesterona en los ovarios (Nagahama 1983) (Fig. 16).

Células de la granulosa

Son el mayor lugar de producción de estradiol (E₂) y MIH. Posee también actividad de 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), presencia de 17 α -hidroxiprogesterona y progesterona. La actividad de la aromatasa (conversión de testosterona en E₂) aumenta en la vitelogénesis. A su vez, la unión de LH y FSH a sus receptores induce la producción de MIH.

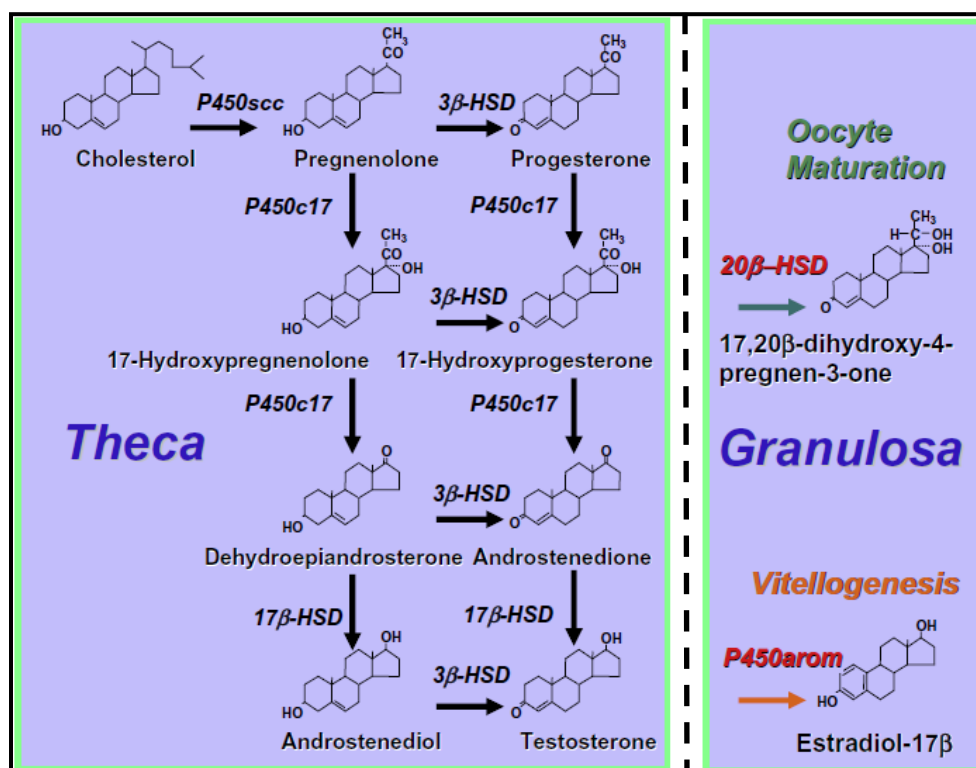


Figura 16. Interacción de las capas de células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico en la producción de estradiol-17 β y 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona en un folículo en maduración de salmónidos. Enzimas: P450_{scc}, P450 enzima de clivaje de la cadena lateral; P450_{c17}, 17-hidroxilasa/C17-C20-liasa; 3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD, 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa; 20 β -HSD, 20 β -hidroxisteroide deshidrogenasa; P450_{arom}, P450 aromatasa (Tomado de Lubsenz et al. 2010).

Testículos

Los testículos son estructuras pares, bilaterales, alargadas, aplanadas y blanquecinas adyacentes a la vejiga natatoria y se extienden por casi toda la cavidad peritoneal. Se fusionan completamente hacia la región caudal y el mesorquio, pliegue peritoneal formador por tejido conjuntivo, lo rodea y sostiene en la cavidad (Billard 1986).

Están constituidos por una porción intersticial y una lobular o tubular. La intersticial se localiza entre los túbulos testiculares y posee células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. En la porción intratubular se localizan las células de la línea germinal y las células somáticas o de Sertoli que constituyen el epitelio germinal (Billard 1986, Grier & Lo Nostro 1999).

Espermatogénesis

El compartimento tubular está delimitado por la membrana basal y células mioides peritubulares y contiene al epitelio germinal. El epitelio germinal posee dos tipos de células: las células somáticas de Sertoli y las de la línea germinal en diferentes estadios de desarrollo (Fig. 17) (Schulz et al. 2010).

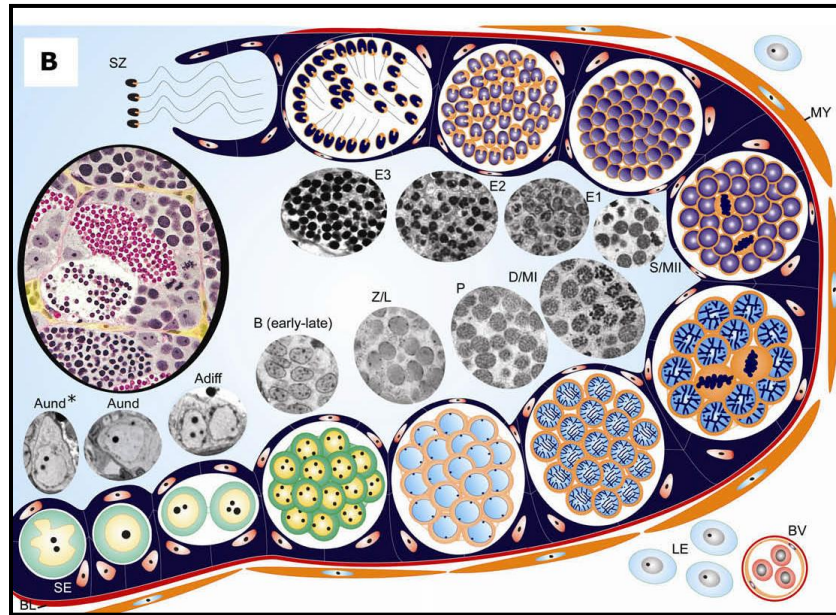


Figura 17. Segmento de un túbulo espermatogénico tipo cístico. El epitelio germinal contiene células de Sertoli (SE) y germinales delineados por la lamina basal (BL) y las células mioideas peritubulares (MY). Células intersticiales de Leydig (LE) y vasos sanguíneos (BV) (Tomado de Schulz et al. 2010).

La distribución de las espermatogonias dentro de los túbulos permite clasificar a los testículos en: restricto o irrestricto (Fig. 18). En los del tipo restricto hay una progresión de los estadios de maduración de las células germinales hacia los ductos eferentes y las espermatogonias están restringidas en la región distal del túbulo, mientras que en los de tipo irrestricto las espermatogonias están distribuidas al azar por todo el lóbulo (Fig. 18) (Grier 1980).

Dentro del túbulo el epitelio está organizado en cistos (Billard 1986; Grier 1993). Las células germinales dentro de los espermatocistos (Fig. 19) se dividen y maduran. Los espermatocistos crecen y la elongación lobular se logra por la continua división de las

Sertoli y de las células germinales en el lumen testicular. Considerando la asociación entre una espermatogonia y una célula de Sertoli formando el espermatocisto el progreso de la espermatogénesis mediante divisiones mitóticas y meióticas producirá células más pequeñas y haploides (Dietrich & Krieger 2009). Estos terminan en la periferia del testículo y liberan su contenido al espermiducto principal (Fig. 17).

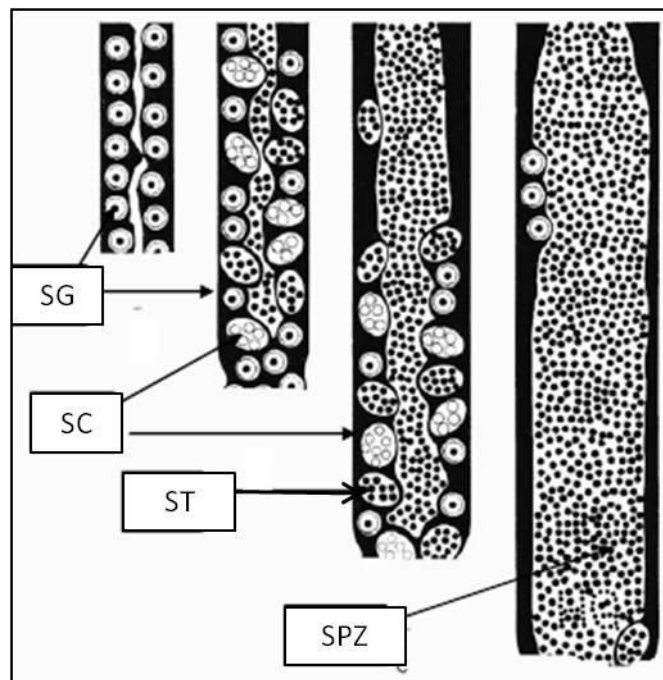


Figura 18. Esquema de testículo irrestricto de teleosteo. La distribución de las espermatogonias (sg) es a lo largo del lóbulo. Los cistos que contienen células germinales maduras están ubicados sobre la luz del túbulo. Durante la espermiación el lumen del cisto y del túbulo se continúan. SC: espermatocitos; ST: espermatidas; SPZ: espermatozoides (Tomado de Grier 1993).

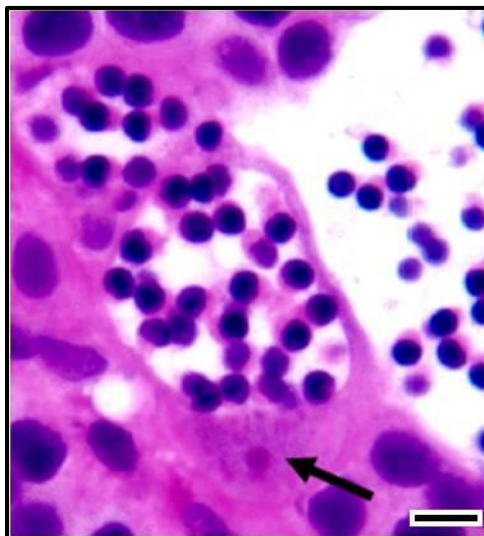


Figura 19. Espermatocisto de *P. promelas*. La unidad funcional del testículo. Un grupo de espermatidas están rodeadas por los "brazos citoplasmáticos" de una única célula de Sertoli (flecha). Barra = 5 μ m. (tomado y modificado de USEPA 2006).

Las células germinales avanzan en seis distintos estados citológicos durante la espermatogénesis: espermatogonia A, espermatogonia B, espermatocito 1º, espermatocito 2º, espermatidas y espermatozoides (Figura 20)(Billard 1986). La espermatogonia primaria o A es rodeada individualmente por la célula de Sertoli. Continúa con sucesivas divisiones mitóticas y produce un "cluster" o grupo de espermatogonias secundarias o B encapsuladas dentro del espermatocisto. Los estadios subsecuentes de división mitótica ocurren dentro del espermatocisto. La espermatogonia B es más chica que la A, con núcleo alargado y basófilo y poco citoplasma. Los espermatocitos primarios son más pequeños que la espermatogonia B, están en meiosis I y avanzan durante la meiosis produciendo espermatocitos secundarios.

Todavía están contenidos dentro del espermatocisto, sufren una segunda división meiótica de la cual surgen las espermatidas que tienen núcleo intensamente basófilo y escaso citoplasma. La maduración de las espermatidas incluye cambios de forma y compactación nuclear, desarrollo flagelar, pérdida de volumen citoplasmático y fagocitosis de cuerpos residuales previos a la liberación en el lumen lobular como espermatozoides, proceso conocido como espermiación (Billard 1986, Schulz et al. 2010).

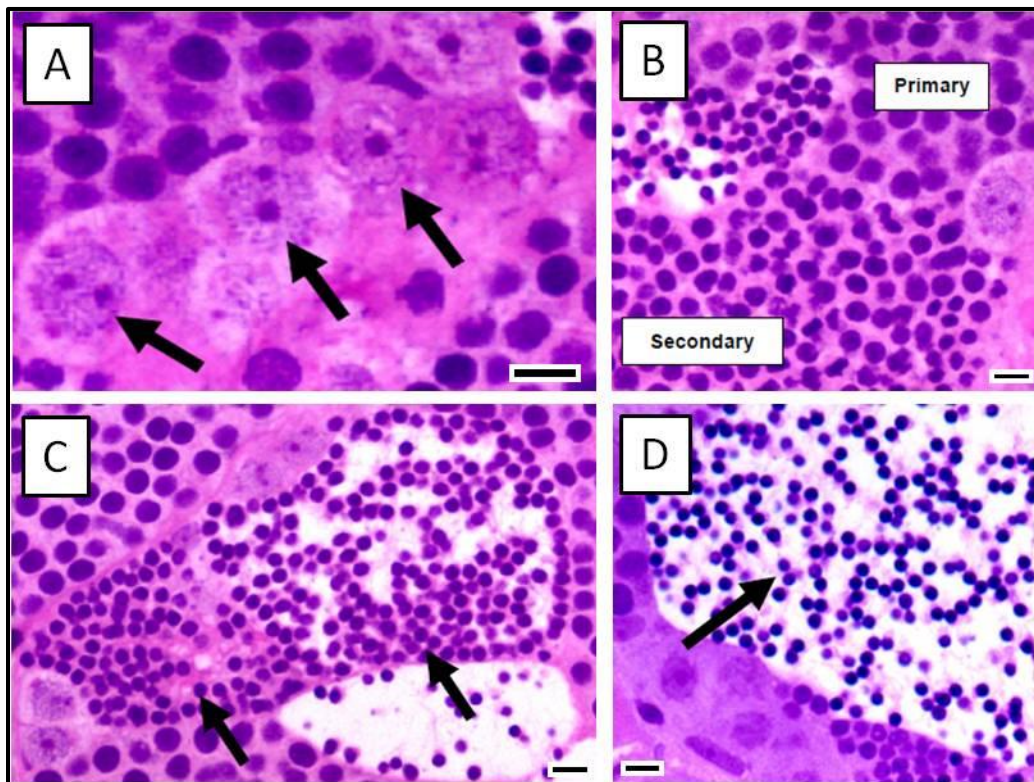


Figura 20. Espermatogonias (a), Espermatocitos primarios y secundarios (b), espermatidas (c) y espermatozoides (d) de *P. promelas*. Barra = 5 μm . (tomado y modificado de USEPA 2006).

Tejidos somáticos de testículos

Células de Sertoli

Las células de Sertoli en teleósteos envuelven a los espermatocistos que están localizados dentro de los túbulos (Billard 1986) (Fig. 21).

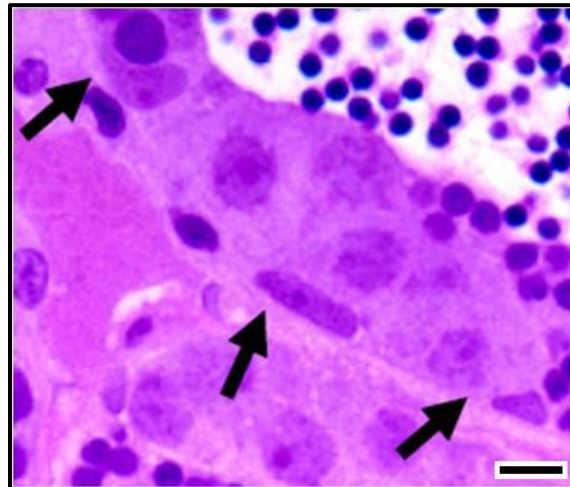


Figura 21. Células de Sertoli de *P. promelas*. Estas células tienden a tener núcleo elongado o triangular (flechas negras). Están presentes en bajo número y pueden parecerse a espermatogonias cuando están hipertrofiadas. Barra = 5 μ m. (tomado de USEPA 2006).

Entre el proceso de formación del espermatocisto y el de maduración de los espermatozoides, la morfología y función de las células de Sertoli parece no alterarse sin embargo en la espermiación la célula se rompe y degenera. Debido a la estrecha relación entre las células de Sertoli y la espermatogénesis, en fases iniciales de la misma

hay un aumento en el número de este tipo de células y una vez que los espermatocitos prosiguen en la meiosis el número de células de Sertoli se mantiene constante (Schulz et al. 2010).

Las funciones de las células de Sertoli son: mantener la viabilidad de las células germinales, su desarrollo y fisiología. A su vez secretan fluidos que generan el lumen tubular y fagocitan células germinales en apoptosis, cuerpos residuales desechados por las espermatidas durante la espermiogénesis y esperma residual (Schulz et al. 2010). Son las células en las cuales se asienta la barrera hematotesticular.

Células de Leydig

Las células de Leydig están distribuidas en grupos o aisladas en los intersticios entre los lóbulos de los testículos de los peces teleósteos (Billard 1986) (Fig. 22). Son células largas y poligonales, caracterizadas por un retículo endoplasmático liso. Son células esteroideogénicas que poseen la enzima 3β -HSD involucrada en la síntesis de hormonas esteroideas (Nagahama 1983).

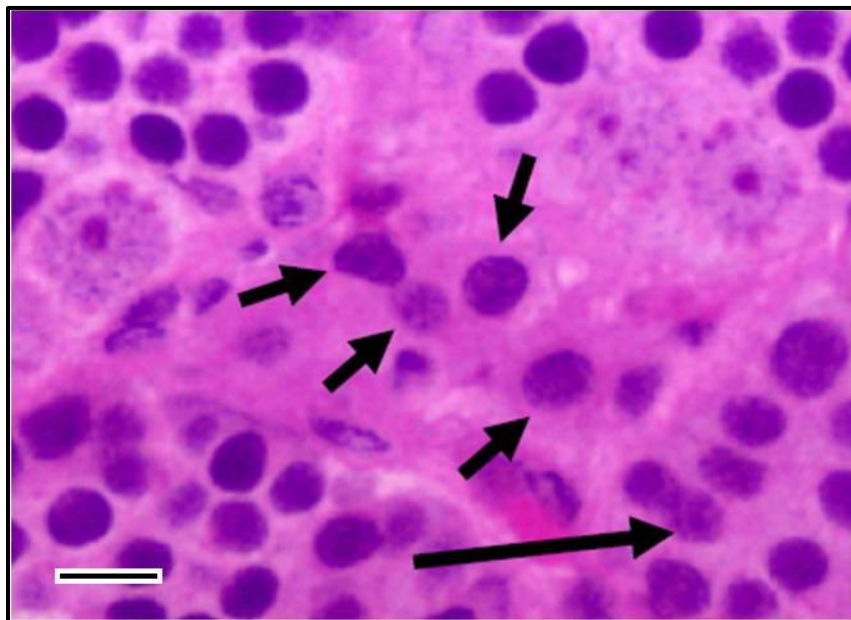


Figura 22. Células de Leydig de *P. promelas*. Las células intersticiales de Leydig se presentan solas o formando pequeños agregados (flechas). Presentan núcleo denso redondeado u ovalado. Barra = 5 μ m (tomado de USEPA 2006).

Esteroidogénesis gonadal

El ovario y el testículo de teleósteos producen tres tipos de esteroides que son importantes para la reproducción (Fostier et al 1983)

1. Estrógenos o esteroides C_{18} : 17- β estradiol (E_2) y Estrona
2. Andrógenos o esteroides C_{19} : testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT), andrógenos 11-oxigenados.
3. Progestágenos, o esteroides C_{21} : pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona (17 α HP) actúan como pasos en la vía de síntesis mientras que la,

17 α ,20 β -dihidroxiprogesterona (17 α 20 β DHP), 17 α ,20 β -21 trihidroxiprogesterona (17 α 20 β 21THP) tienen actividad biológica.

Las gonadotropinas son las hormonas primarias en la regulación de la gametogénesis actuando a través de las hormonas esteroideas gonadales sexuales (Fostier 1983, Nagahama 1994, Van der Kraak 2009). El colesterol es el precursor común de las hormonas esteroideas gonadales y la síntesis de las mismas en el ovario se da en las células de la teca y en las de la granulosa (Nagahama 1983) (Fig 16). Las primeras sintetizan y secretan T en vitelogénesis y 17 α HP en la maduración y las células de la granulosa son abastecidas de T y 17 α HP siendo luego transformados en E₂ y 1720 β DHP respectivamente (Nagahama 1983).

Las hormonas esteroideas regulan mediante retroalimentación positiva o negativa al eje HPG, incidiendo sobre la síntesis y secreción de GnRHs, LH y FSH. En el ovario las hormonas esteroideas inciden sobre la ovogénesis, la maduración ovocitaria y la ovulación; en el hígado el E₂ estimula la síntesis de vitelogenina y de proteínas constitutivas de la zona radiata del ovocito; y en el hipotálamo controlan la secreción de gonadotrofinas actuando directamente sobre la hipófisis (Fig. 23) (Van der Kraak 2009).

Los EDCs son agentes que causan alteraciones en la reproducción a través de efectos directos sobre el eje HPG (Ankley et al. 2009). Es

por ello que una alteración del eje HPG puede afectar el desarrollo final de la gónada y en especial la producción de gametos viables que es el punto clave que permitirá una reproducción exitosa.

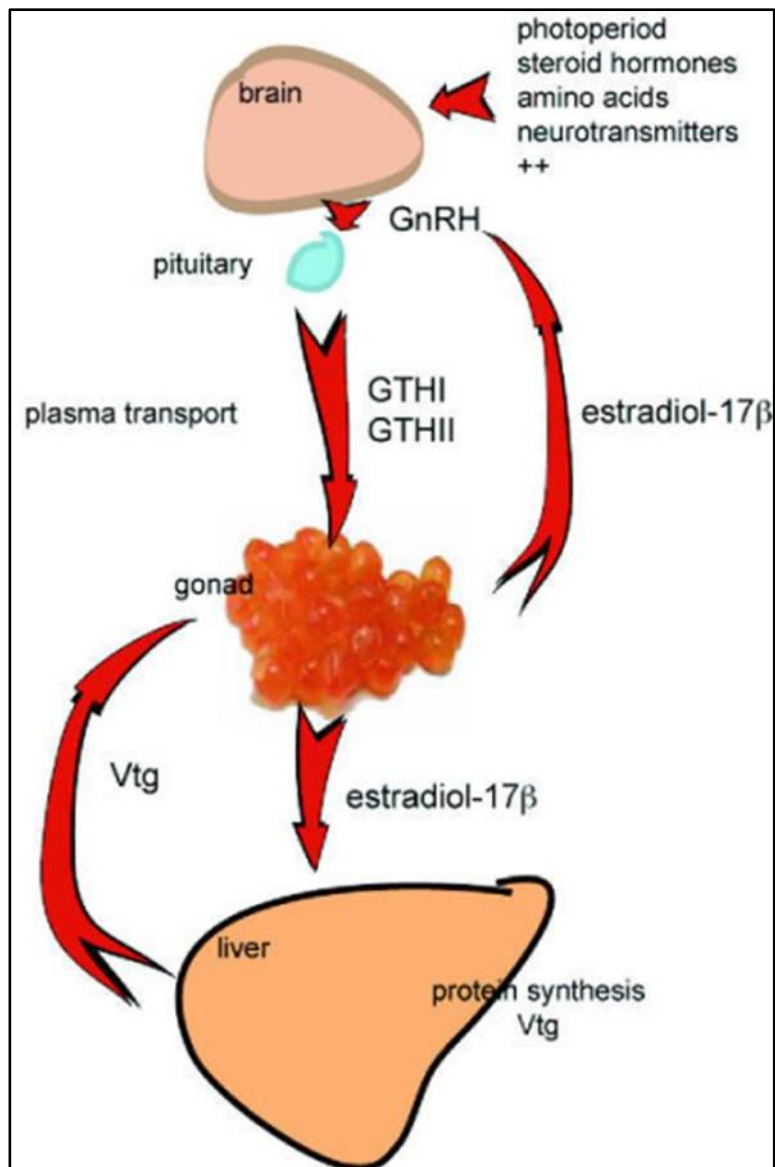


Figura 23. Representación del eje HPG femenino en peces teleósteos (tomado y modificado de Arukwe y Goksoyr 2003).

Efecto de perturbadores endócrinos sobre *Pimephales promelas*

En *Pimephales promelas* se han documentado diversas anomalías en la estructura de la gónada masculina y femenina frente a la exposición a distintos compuestos químicos (Miles-Richardson et al. 1999, 1999, Ankley et al. 2001, 2002, Jensen et al. 2004, Villeneuve et al. 2008, Mihaich et al. 2013). Alteraciones histomorfológicas testiculares como hiperplasia e hipertrofia de las células de Sertoli; pérdida y desarrollo de sincitios de células de la línea germinal y la presencia de espermatozoides deformes fueron observadas cuando se los expuso de manera crónica a 17β -estradiol (Miles Richardson et al. 1999; Wolf et al. 2004) y a 4-nonilfenol y nonilfenol etoxilado (Miles Richardson et al. 1999). Otros efectos que se han reportado en *P. promelas* frente a la exposición a sustancias masculinizantes como la 17β -tenbolona o a inhibidores de la aromatasa como el procloraz y fadrozole son la inhibición de los niveles circulantes de estrógenos y andrógenos. Se han reportado también una serie de químicos contaminantes que poseen efecto de agonistas y antagonistas de los receptores a los andrógenos (AR) en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Ankley et al 2009).

Como consecuencia del efecto de efluentes urbanos se han constatado alteraciones en las gónadas de *P. promelas* a nivel de la producción espermática; sobre el índice gonadosomático y también sobre las características sexuales secundarias (Vajda et al. 2011) que sugieren efectos estrogénicos. Este tipo de efluentes también tuvo impacto en la producción y puesta de óvulos (Thorpe et al. 2009) como se muestran en la Tabla 1.

El agua del arroyo Fray Bentos es receptora de los efluentes de la red cloacal que posee los residuos generados por pequeñas industrias, actividad comercial y doméstica de la ciudad de Fray Bentos y posee compuestos estrogénicos como nonilfenol y estradiol, estrona (Miguez 2013). Esta matriz compleja posee compuestos químicos como tensioactivos componentes de los detergentes, estrógenos provenientes del uso de pastillas anticonceptivas y residuos plásticos utilizados en envases, nylon, etc. que se comportan como perturbadores endocrinos debido a su capacidad estrogénica. Es por ello que se hipotetizó que el efluente urbano de Fray Bentos tiene un potencial efecto estrogénico.

Los efluentes provenientes de las plantas de producción de pulpa de celulosa son matrices complejas que pueden alterar procesos biológicos como la reproducción en peces por su carácter estrogénico androgénico o antiestrogénico. La reducción en la puesta de óvulos y el

aumento del índice gonadosomático se asocia con el carácter androgénico de este tipo de matriz. En la Tabla 1 se muestran los efectos observados por Parrott et al. (2004), Rickwood & Dubé (2007), Kovacs et al. (2013) y Wayne (2014) cuando expusieron a *Pimephales promelas* a efluentes de industrias de producción de pulpa de celulosa.

Tabla 1. Efectos reproductivos resultantes de la exposición de *Pimephales promelas* a efluentes urbanos y a los generados por la industria de producción de pulpa de celulosa.

Matriz	Efectos	Duración	Referencia
Efluente Urbano	No hubo	3 semanas	Nichols et al. 1999
	Reducción en la puesta de óvulos	3 semanas	Thorpe et al. 2009
	Reducción en la producción de esperma. Atenuación de caracteres sexuales secundarios en machos.	4 semanas	Vajda et al. 2011
	Reducción de tamaño. Atenuación de caracteres sexuales secundarios en machos.	<i>In situ</i>	Tetreault et al. 2012
Pulpa de Celulosa	Aumento de crecimiento en hembras. Caracteres sexuales secundarios en sexos opuestos.	140 dpe	Parrott et al. 2004
	Reducción en la puesta de óvulos. Aumento de IGS en machos.	3 semanas	Rickwood & Dubé 2007
	Reducción en la puesta de óvulos	5 días	Kovacs et el. 2013
	Reducción en la puesta de óvulos.	5 días	Waye et el. 2014

En el presente trabajo se propuso analizar los potenciales efectos de la industria de producción de pulpa de celulosa localizada sobre el margen oriental del río Uruguay en la ciudad de Fray Bentos así como también con el agua superficial del arroyo Fray Bentos que recibe la descarga de los efluentes urbanos de dicha ciudad y que vierte sus aguas a este gran río de nuestro país.

Debido a que los efluentes urbanos e industriales puede contener sustancias químicas que pueden comportarse como perturbadores endócrinos se eligió realizar bioensayos usando al pez *Pimephales promelas* que es un modelo de estudio de toxicología validado previamente en América del Norte (Ankley et al. 2001, Wolf et al. 2004, Leino et al. 2005, Ankley & Villeneuve 2006, USEPA 2002, 2006) para evaluar el posible impacto de estas matrices sobre una parte de la biota.

Este tipo de efluentes pueden tener efectos sobre el sistema endócrino y como una de las funciones que puede ser afectada es la reproducción, se decidió estudiar si los efluentes producían alteraciones histológicas en las gónadas que pudieran afectar la reproducción de *Pimephales promelas*. El modelo de pez elegido se han desarrollado los protocolos de cultivo y producción (USEPA 1988) con fines de soporte y promoción de los programas regulatorios ambientales y de investigación. A su vez esta especie es recomendada por la USEPA (2002), y OECD (2007) para evaluar los efectos de EDCs a diversos

niveles de organización biológica.

La histopatología es extremadamente útil como biomarcador en ecotoxicología en peces porque puede establecer vínculos moleculares/celulares con respuestas patológicas de niveles de órganos y de organismos (Chiang & Au 2013). El análisis histopatológico ha sido empleado para la evaluación de efectos mediados por EDCs en peces (Van der Ven et al. 2003; Wolf et al. 2004; Dietrich y Krieger 2009) debido a su sensibilidad para evidenciar efectos en la salud de los mismos (Reddy & Rawat 2013).

La evaluación del estadio de desarrollo gonadal y proporción relativa de las células germinales en maduración son foco de la mayoría de los estudios de biología reproductiva en peces (Dietrich & Krieger, 2009). Dicha evaluación y su análisis histopatológico provee información de la homogeneidad de poblaciones de peces en relación al desarrollo de células de la línea germinal facilitando la determinación del impacto de un agente químico externo que afecte dicho desarrollo (Dietrich & Krieger, 2009). El uso de software para el análisis de imágenes microscópicas y el desarrollo de protocolos para la obtención de las mismas mejora la determinación y cuantificación de anomalías inducidas por EDCs (Wolf et al. 2004, Dietrich & Krieger 2009).

Considerando los efectos que los efluentes urbanos y los de la producción de pulpa de celulosa pueden tener sobre los cuerpos hídricos receptores y su biota (Parrott et al. 2004, Rickwood & Dubé 2007, Thorpe et al. 2009, Vajda et al. 2011, Kovacs et al. 2013 y Waye et al. 2014) y el gran desarrollo de bioensayos con organismos acuáticos, el uso de *Pimephales promelas* en bioensayos crónicos permitirá evidenciar el carácter estrogénico de estos efluentes sobre este pez. A su vez, se realizaron bioensayos de control positivo de estrogenicidad con el 17 β -estradiol en dosis de 150 y 450 ng l⁻¹ para comparar las respuestas obtenidas. Dosis de 2750 ng l⁻¹ de 17 β -estradiol utilizadas por Miles-Richardson et al. (1998) mostraron la capacidad de generar efectos adversos histológicos en las gónadas. Dosis similares a las escogidas para esta tesis de 17 β -estradiol han mostrado diversos efectos sobre las gónadas y otros parámetros reproductivos (Panther et al. 1998, 2000; Halm et al. 2002, Hindman et al. 2010, Damman et al. 2011).

Hipótesis de trabajo

Los efluentes urbanos vertidos en el arroyo Fray Bentos y los efluentes industriales resultantes de la producción de pulpa de celulosa vertidos al río Uruguay tienen la potencialidad de alterar la reproducción de peces adultos de la especie *Pimephales promelas*. Se plantea que estos efluentes tienen un posible efecto estrogénico sobre *P. promelas* con las consiguientes alteraciones que se podrán detectar a nivel histológico de las gónadas y mediante el análisis de los parámetros reproductivos básicos.

Objetivo general

Estudiar los efectos *in vivo* de un efluente urbano, un efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa y del estrógeno 17β -estradiol sobre el pez *Pimephales promelas*. Caracterizar los posibles efectos mediante histopatología cualitativa y cuantitativa por medio de la utilización del análisis de imágenes celulares a nivel gonadal.

Objetivos específicos

- Comprobar o descartar los efectos histopatológicos en las gónadas en ambos sexos derivados de la exposición crónica de 21 días a aguas de un efluente urbano, un efluente de una planta de producción de pulpa de celulosa y a la concentración del estrógeno estradiol-17 β (E2) a 150 y 450 ng l⁻¹.
- Verificar o descartar posibles efectos histopatológicos en las gónadas en ambos sexos mediante la cuantificación de los mismos con análisis de imágenes celulares
- Constatar o descartar efectos derivados de la exposición crónica a nivel de la talla del pez, el peso, el índice gónado – somático, los tubérculos nupciales y la puesta de óvulos.

MATERIALES & METODOS

Desarrollo de ensayos de toxicidad crónica

Diseño experimental

Se realizaron bioensayos semi - estáticos de toxicidad crónica en peces de la especie *Pimephales promelas* con un efluente urbano (EU) de la ciudad de Fray bentos, Río Negro y un efluente industrial (EI) de una planta de producción de pulpa de celulosa de la misma ciudad para la cual se poseen antecedentes de toxicidad aguda (Anexo II). Se realizaron dos ensayos como controles positivos con el estrógeno natural 17 β -estradiol (E2) (material certificado, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania) en dos concentraciones diferentes de 150 ng l⁻¹ y 450 ng l⁻¹ que se denominarán E2-150 y E2-450. El 17 β -estradiol se adicionó mediante el agregado de una solución acuosa de E2 al agua reconstituida, lo cual asegura que no se usen solventes que causen toxicidad (Arukwe & Goksoyr 2003) (Figura 24).

Los bioensayos se extendieron durante 21 días y se realizaron en el departamento de aguas y productos químicos (PQAR) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Cada acuario experimental contó con dos machos y cuatro hembras y dos sustratos de oviposición. El

experimento se realizó en lotes control ($n = 3$) y lotes tratados con las matrices puras a analizar ($n = 3$). En total se utilizaron 36 peces por cada bioensayo (Fig. 24). El diseño experimental se basó en lo propuesto por Ankley et al. (2001) y EPA (2006)(Figura 24).

Se seleccionaron peces de similar tamaño intra sexos y se los colocó en los acuarios de diez litros con volumen final de 8 litros. La alimentación de los peces fue igual a la etapa de cría, *Artemia sp.* en la mañana y escamas para peces tropicales Tetra[®] al mediodía y en la tarde. Se renovó el 90% del agua cada 48 h y diariamente se limpió el fondo del acuario para mantener las condiciones óptimas de calidad del agua. Durante este período se evaluaron la mortalidad y salud de los peces (movimientos letárgicos y/o erráticos, presencia de heridas). En el caso de que en el período de aclimatación los peces desarrollaran enfermedades los mismos fueron descartados y no se utilizaron para el desarrollo del bioensayo. Los acuarios experimentales fueron oxigenados por burbujeo para evitar que la concentración de oxígeno disuelto estuviese por debajo del 50% del nivel de saturación. El ajuste de pH se realizó con HCl 1N PPA y NaOH 1N PPA. Todos los días durante la realización de los ensayos se obtuvieron por conteo los datos de ovoposición y del estado de salud de los organismos (Figura 24).

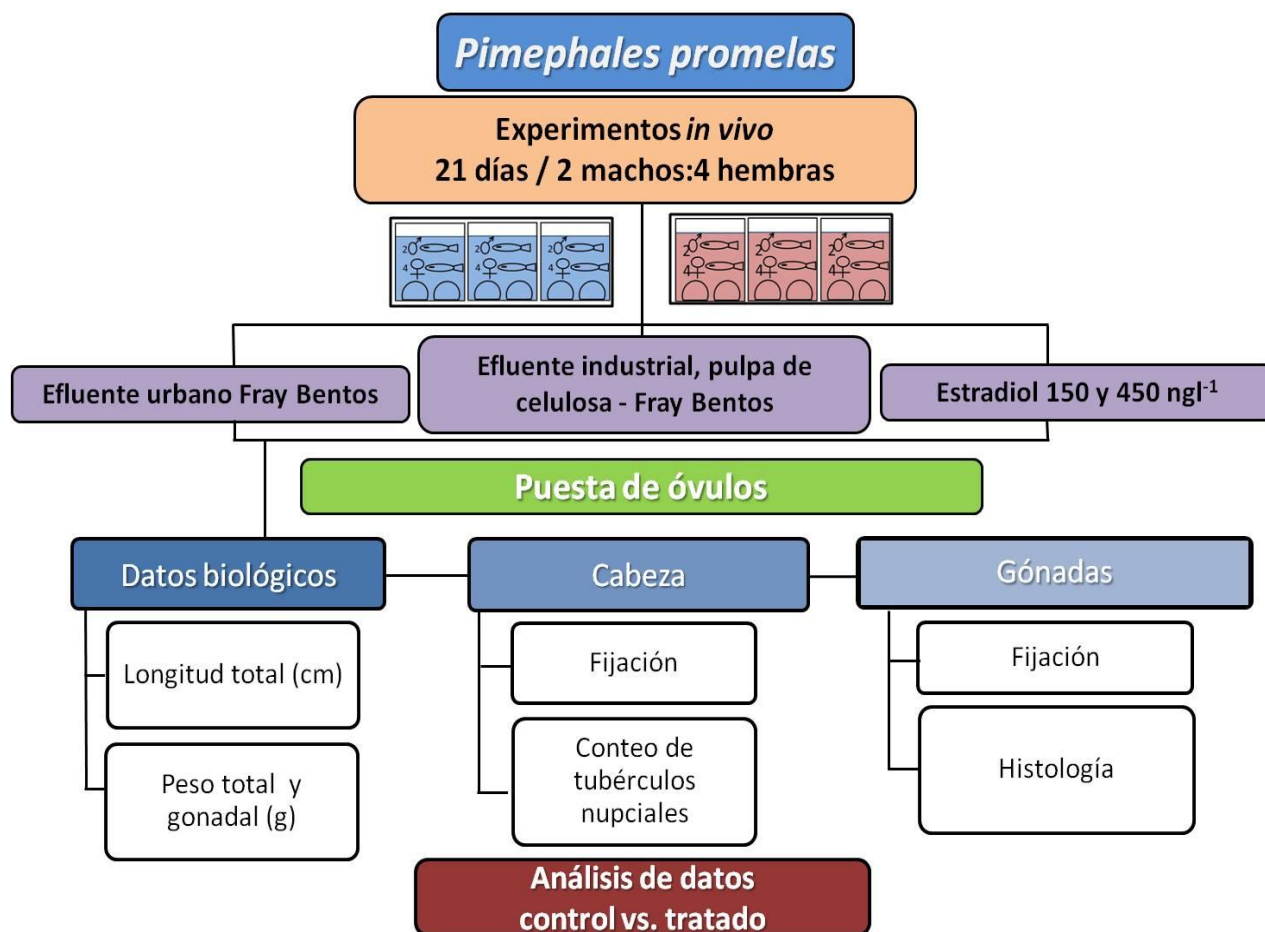


Figura 24. Esquema de diseño experimental utilizado en la realización de los bioensayos crónicos con el pez *Pimephales promelas* para evaluar la toxicidad de un efluente urbano, un efluente industrial de una industria de producción de pulpa de celulosa y el estrógeno natural 17 β -estradiol (E2) en 2 concentraciones diferentes 150 ng l⁻¹ y otro 450 ng l⁻¹.

Obtención de ejemplares

Los ejemplares de peces utilizados en los bioensayos fueron adultos (>6 meses) y estuvieron previamente aclimatados a las condiciones de los acuarios experimentales por una semana (volumen de agua de 8 L, T°C = 25 \pm 2, pH = 7,0 - 8,0, fotoperíodo controlado

16D:8N y calidad de agua según protocolo U.S.E.P.A. (1988) (ver cultivo de organismos).

Cultivo de los ejemplares

Los ejemplares de *P. promelas* que se utilizaron fueron criados en PQAR del LATU. En PQAR se cría esta especie de peces desde el año 2007 de acuerdo al protocolo de cultivo de peces y calidad de agua reconstituida (AR) de U.S.E.P.A. (1988).

Selección de muestras

La muestra del efluente urbano fue colectada en marzo de 2010 y se tomó agua superficial del arroyo Fray Bentos (33° 07' 16" S, 58° 19' 02" W) que recibe la descarga de los residuos urbanos de la ciudad de Fray Bentos, Río Negro (Fig. 25).

El efluente industrial fue proporcionado en junio de 2010 por técnicos del LATU y corresponde al efluente final de la planta de producción de pulpa de celulosa o descarga al río. Esta industria está localizada en la ribera del Río Uruguay, a 4 kilómetros al este de la ciudad de Fray Bentos (Fig. 25). Su capacidad de producción es de 1,2 millones de toneladas de celulosa blanqueada de fibra corta de eucalipto (www.upm.com/uy).



Figura 25. Localización del arroyo Fray Bentos (triángulo) y de la planta de producción de pulpa de celulosa (estrella) en la ciudad de Fray Bentos, Río Negro – Uruguay.

Colecta del material biológico y obtención de datos

Una vez finalizado el bioensayo se sacrificaron los peces por incisión cervical siguiendo la guía normalizada de cuidados de laboratorio de la UFAW (*Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* en <http://www.ufaw.org.uk/pubs>) y las regulaciones de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA). Se obtuvieron los parámetros biológicos y reproductivos como: longitud total (cm), peso total (g), peso gonadal (g). Se guardaron en formol al 10% las cabezas para su posterior conteo de tubérculos nupciales. Se extrajeron las gónadas y se las guardó en el fijador Bouin para posterior análisis de histología clásica (Figura 24). Los conteos de puestas de óvulos en los sustratos de oviposición se realizaron todos los días durante el transcurso de la experiencia (Figura 24).

Estudios histológicos cualitativos y cuantitativos

Las gónadas fijadas fueron procesadas para inclusión en parafina, posterior sección en micrótomos (3 μ m) y tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) basado en el protocolo de USEPA (2006) (Anexo I). En las gónadas procesadas se clasificaron los grados de madurez de acuerdo a USEPA (2006) y Dietrich & Krieger (2009) (Tabla 2a y 2b, Fig. 26 y 27).

Tabla 2a. Estadios gonadales de ovarios de *P. promelas* (tomado de USEPA 2006).

Estadio	Características
0. Sin desarrollar	Folículos perinucleolares pre-vitelogénicos exclusivamente. No hay alvéolos corticales.
1. Desarrollo temprano	Más del 90% de los folículos son pre-vitelogénicos, predomina el estado de folículos perinucleolares hacia alveolos corticales.
2. Desarrollo medio	Por lo menos la mitad de los folículos está en vitelogénesis temprana y media.
3. Desarrollo tardío	La mayoría de los folículos en desarrollo está en vitelogénesis tardía.
4. Desarrollo tardío/Hidratación	Mayoría de los folículos en desarrollo está en vitelogénesis tardía, folículos son más grandes que en estadio 3.
5. Post-Ovulatorio	Folículos vacíos predominantemente, remanentes de las capas de la teca y granulosa.

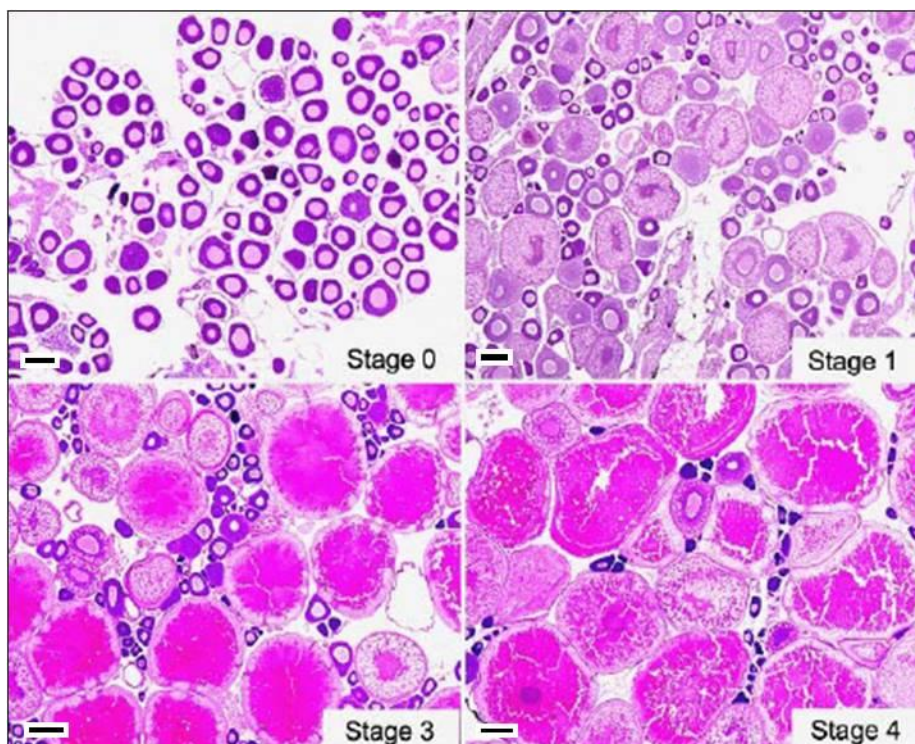


Figura 26. Ejemplo del sistema de clasificación de estadios gonadales en el ovario de *P. promelas*. Barra = 100 µm. (Tomado de USEPA 2006).

Tabla 2b. Estadios gonadales de testículos de *P. promelas*. (tomado de USEPA 2006).

Estadio	Características
0. Sin desarrollar.	Solo fases inmaduras. Espermatogonias y espermatidas. No hay espermatozoides.
1. Espermatogénesis temprana.	Predominan fases inmaduras. Se ven espermatozoides.
2. Espermatogénesis media.	Espermatocitos, espermatidas, y espermatozoides están presentes en proporciones similares. El epitelio germinal es más fino que en estadio 1 pero más grueso que en el estadio 3.
3. Espermatogénesis tardía.	Se observan todos los estadios sin embargo, predominan los espermatozoides maduros y el epitelio germinal es más fino que en el estadio 2.
4. Vacío	Pérdida de tejido conjuntivo con algo de esperma remanente.

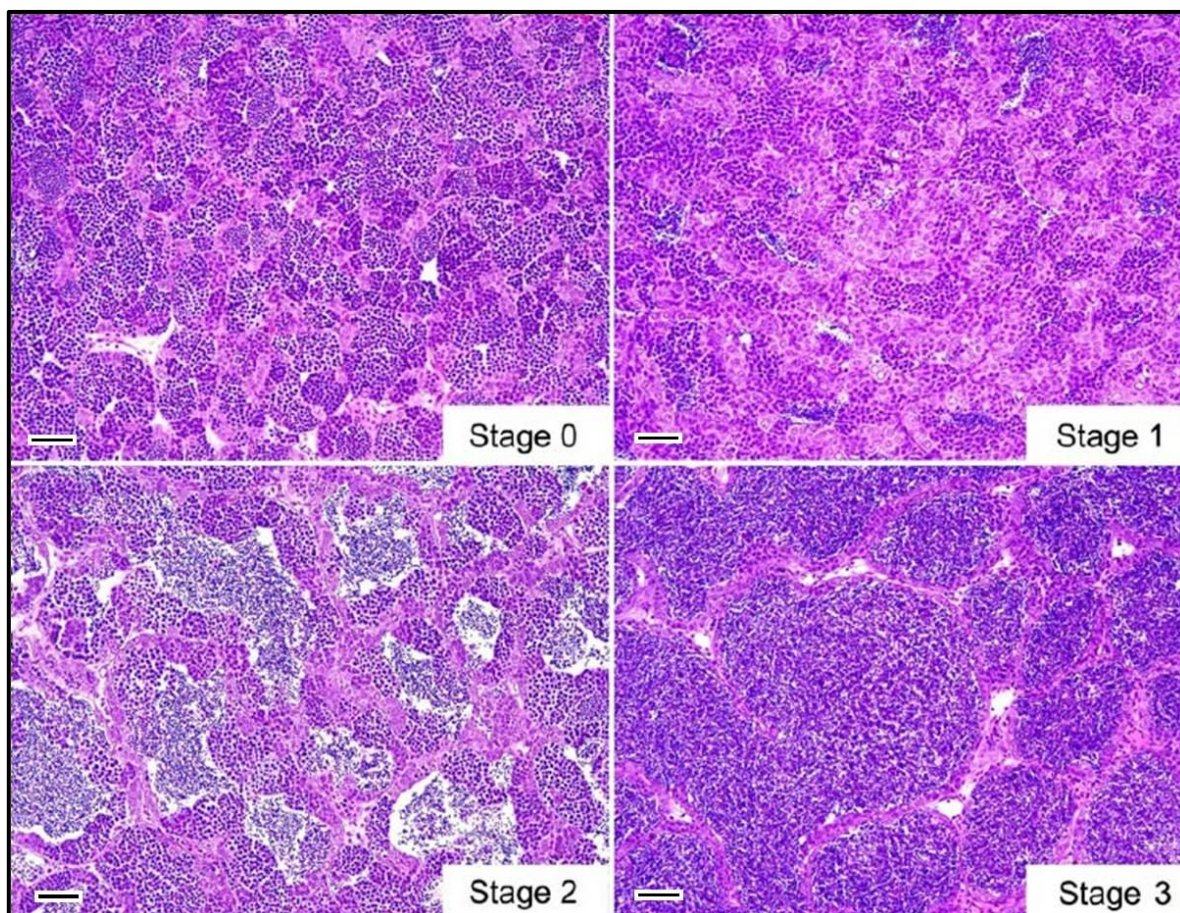


Figura 27. Ejemplo del sistema de clasificación de estadios gonadales en el testículo de *P. promelas*. Barra = 25 μm . (Tomado de USEPA 2006).

La identificación y clasificación de anomalías gonadales histológicas y el grado de severidad de las mismas se realizó según EPA (2006), OECD (2009) y Dietrich & Krieger (2009).

Para la cuantificación de los tipos celulares se siguió la metodología de Wolf et al. (2004) y se utilizó el programa de análisis de imágenes Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) para conteo de las poblaciones celulares.

En hembras se trazó una línea por debajo del preparado histológico con un marcador permanente para evitar solapamiento en la toma de imágenes y se utilizaron 3 imágenes obtenidas a 4x por individuo para realizar los análisis y conteo de los tipos celulares.

En machos se realizó una grilla de 22 x 29 mm por debajo del preparado histológico con un marcador permanente y se seleccionaron 5 imágenes por individuo para conteo posterior obtenidos a 40x. Una vez obtenidas las imágenes se realizó una grilla virtual con más de 400 puntos de intersección. Todos los puntos de intersección de cada imagen fueron clasificados según el tipo celular y se contabilizó en planilla electrónica. Aquellos puntos que no tuvieron tipo celulares asociados fueron descartados y no se consideraron en el análisis de los datos.

Estudios morfológicos y de puesta de óvulos

Se tomaron los datos de: talla (cm) y peso (g) de cada ejemplar, peso gonadal (g), puesta de óvulos y presencia y número de tubérculos nupciales (TN)(Fig. 24). Los TN están localizados en la cabeza de los machos sexualmente activos de *P. promelas* (Fig. 28) y están usualmente distribuidos bilateralmente con un patrón simétrico. Las hembras y los machos juveniles no desarrollan TN. Se ha descrito un rango normal de 18 – 28 TN aunque pueden llegar a contarse 30 en

casos inusuales (Ankley et al. 2001). La adjudicación de una puntuación a los TN es la siguiente: 0 – ausencia; 1 – presencia; 2 – presencia y alargados; 3 – presencia y pronunciados. Usando este sistema de puntuación se generan resultados generalmente menores a 50 puntos en machos normales de control (Ankley et al. 2001; OECD 2009).

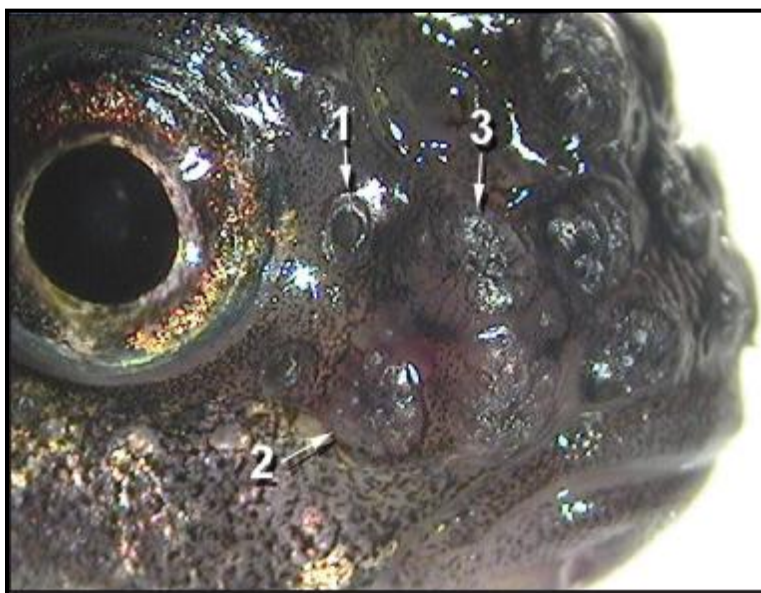


Figura 28. Macho de *P. promelas* en donde se visualizan los tubérculos nupciales en la parte anterior de la cabeza. Los números 1, 2 y 3 muestran la puntuación asignada al TN señalado (tomado de OECD 2009).

Se calculó la suma acumulada de la puesta de óvulos durante la exposición y también el índice gónado-somático IGS.

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de la gónada (g)}}{\text{Peso total (g)}} \times 100$$

Se agrupó para cada análisis en grupo control y grupo objetivo y se los comparó.

Análisis de datos

Los análisis cuantitativos histológicos y los de longitud, peso, IGS, y los tubérculos nupciales fueron analizados para cumplir con los supuestos de estadística paramétrica de distribución normal y homogeneidad de varianza. Para ello se utilizó el test de Shapiro-Wilks para comprobar si la distribución de los datos era normal y el test de Levene se utilizó para comprobar la homogeneidad de varianza de los datos. En caso de que se cumplieran los supuestos anteriores se utilizó el test de Student para comparar el grupo control frente al grupo objetivo. En el caso de que no se cumplieran los supuestos de distribución normal u homogeneidad de varianza de la estadística paramétrica se utilizó estadística no paramétrica. Se usó el test de Mann-Whitney para comparar el grupo control frente al grupo objetivo (Fig. 24)

El análisis de la suma acumulada día a día de la puesta de óvulos se hizo con el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov que permite la comparación de este tipo de datos del grupo control frente al grupo objetivo (Sokal & Rohlf 1996).

Para todos los casos se utilizó un $\alpha = 0,05$.

Para el análisis de datos y realización de gráficos se utilizaron hojas de cálculo de Excel, del programa Past y de Gnumeric.

RESULTADOS

Bioensayos

No se presentaron alteraciones morfológicas externas, síntomas de enfermedad o muerte en ninguno de los organismos expuestos, tanto de grupos control como grupos objetivo.

Los niveles de estrés de los peces fueron los usuales cuando se los mantiene en cautiverio en buenas condiciones. Se considera que el estrés fue muy leve ya que no se observaron alteraciones del comportamiento, enfermedades o alteraciones morfológicas externas. Al final del período de experimentación se corroboró la salud externa de los organismos y se los fotografió (Fig. 29).



Figura 29. Ejemplares de *P. promelas* (A: macho; B: hembra) después de la exposición a un bioensayo crónico de 21 días de duración.

Características morfológicas

Talla

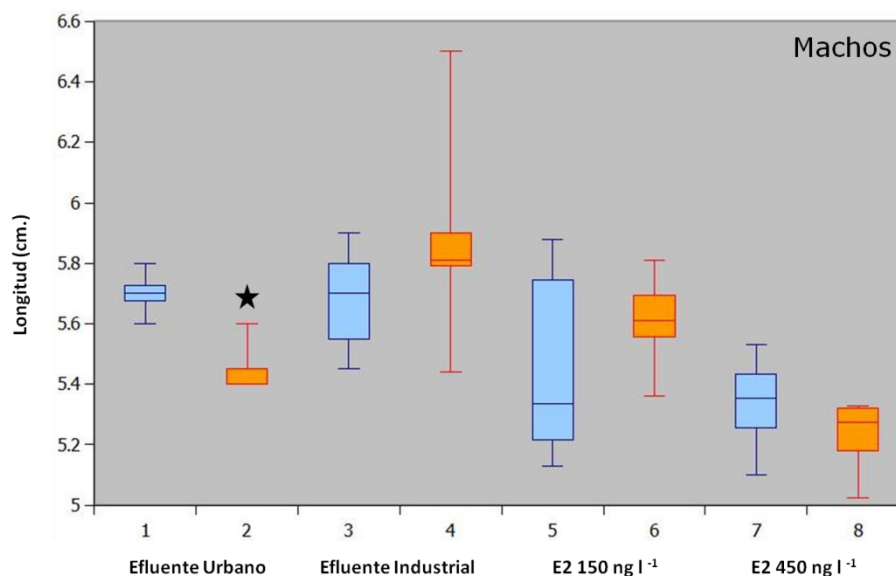
En la Tabla 3 se muestran los valores de talla promedio (cm) obtenidos con su desvío estándar para machos y hembras de cada experimento. En la Figura 30 se observan las representaciones en Boxplot de las tallas a machos y hembras (naranja) respecto a su grupo control (celeste).

Los resultados estadísticos mostraron que el efluente urbano indujo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la talla promedio de los

machos tratados respecto del control ($p=0,0082<0,05$)(Tabla 3, Fig. 30). Sin embargo, el efluente urbano no afectó la talla promedio de las hembras tratadas respecto del control ($p=0,13>0,05$). Los demás tratamientos no afectaron significativamente ($p<0.05$) la talla promedio de machos y hembras tratados (Tabla 3).

Tabla 3. Talla promedio (cm), desvío estándar y p valor de machos y hembras de *P. promelas* de grupos control y expuestos (objetivo) durante 21 días a un efluente urbano; a un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l^{-1} . S = test de Student; MW = test de Mann-Whitney.

Talla (cm)								
Experimento	Machos				Hembras			
	Control	Objetivo	Test	p valor	Control	Objetivo	Test	p valor
E. Urbano	5,70±0,08	5,45±0,10	S	0,0082*	4,84±0,24	4,97±0,22	S	0,13
E. Industrial	5,69±0,16	5,85±0,29	MW	0,53	4,75±0,32	4,83±0,28	MW	0,17
E2 150 ng l^{-1}	5,46±0,34	5,61±0,15	MW	0,38	4,69±0,29	4,72±0,32	S	0,79
E2 450 ng l^{-1}	5,34±0,18	5,23±0,14	S	0,38	4,53±0,27	4,60±0,30	S	0,62



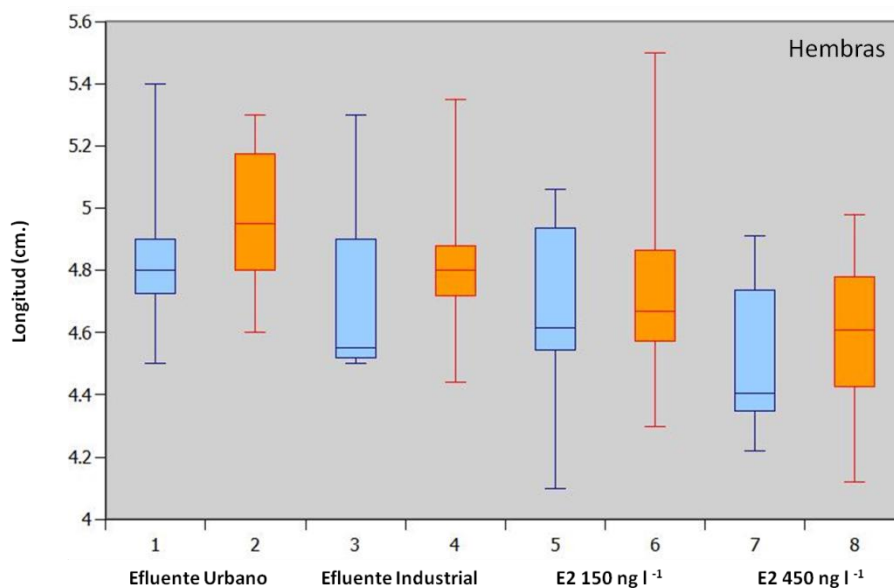


Figura 30. Representaciones Boxplot de la talla en cm de los machos y hembras de *P. promelas* usados como control (celeste) y expuestos durante 21 días a un efluente urbano; a un efluente industrial y a estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l^{-1} (naranja). La estrella muestra donde hubo diferencias significativas ($p < 0,05$).

Peso

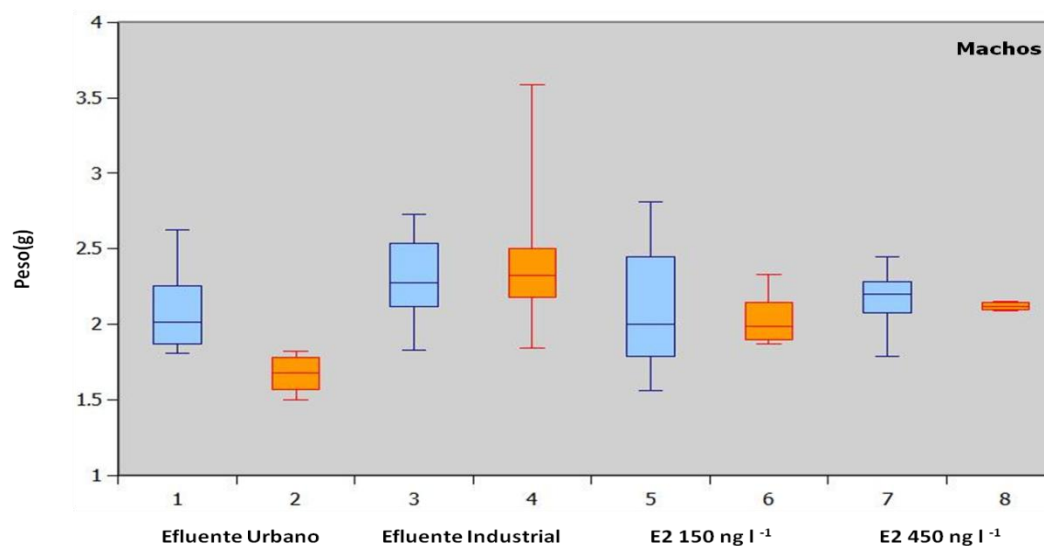
En la Tabla 4 se muestran los valores del peso promedio (g) obtenidos con su desvío estándar para machos y hembras de cada experimento. En la Figura 31 se observan las representaciones en Boxplot del peso de machos y hembras (naranja) respecto a su grupo control (celeste).

Ninguno de los efluentes estudiados afectó significativamente ($p < 0,05$) el peso de los machos y hembras usados en el ensayo respecto del control (Tabla 4).

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 4. Peso promedio (g) y desvío estándar de machos y hembras de *P. promelas* control y expuestos (objetivo) durante 21 días a un efluente urbano, un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹. S = test de Student; MW = test de Mann-Whitney.

Peso (g)								
Experimento	Machos				Hembras			
	Control	Objetivo	Test	p valor	Control	Objetivo	Test	p valor
E. Urbano	2,11±0,36	1,67±0,15	S	0,066	1,13±0,19	1,17±0,13	S	0,51
E. Industrial	2,30±0,29	2,44±0,49	MW	0,60	1,27±0,22	1,35±0,22	S	0,44
E2 150 ng l⁻¹	2,11±0,49	2,04±0,19	MW	0,94	1,17±0,22	1,16±0,14	S	0,83
E2 450 ng l⁻¹	2,16±0,27	2,12±0,03	S	0,80	1,14±0,18	1,12±0,14	S	0,86



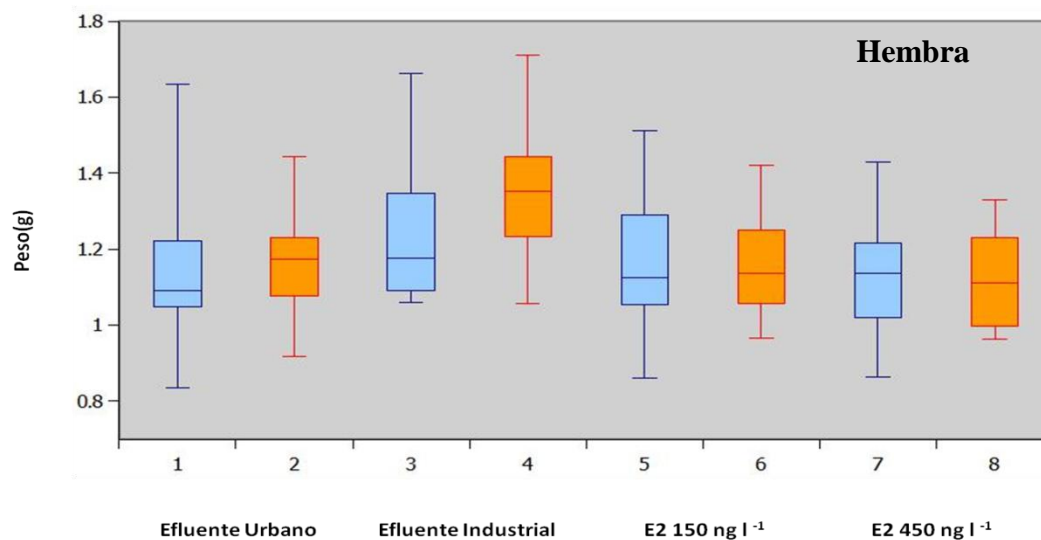


Figura 31. Representaciones Boxplot del peso (g) de los machos y hembras de *P. promelas* usados como control (celeste) y expuestos durante 21 días a un efluente urbano, a un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹ (naranja). No se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los pesos entre los grupos control y tratados.

Índice Gónado-Somático – IGS

En la Tabla 5 se muestran los valores de IGS promedio obtenidos para machos y hembras en cada experimento. En la Figura 32 se observan las representaciones en Boxplot de IGS de machos y hembras (naranja) respecto a su grupo control (celeste). El IGS no se vio afectado significativamente ($p < 0,05$) por los distintos efluentes ensayados en las condiciones experimentales aplicadas.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 5. Valores promedio con su desvío estándar del índice gónado-somático (IGS) de machos y hembras de *P. promelas* control y expuestos (objetivo) durante 21 días a un efluente urbano, un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹. S = test de Student; MW = test de Mann-Whitney.

IGS								
Experimento	Machos				Hembras			
	Control	Objetivo	Test	p valor	Control	Objetivo	Test	p valor
E. Urbano	1,27±0,35	1,23±0,24	S	0,87	10,55±4,07	10,3±3,11	S	0,85
E. Industrial	1,52±0,57	1,39±0,32	S	0,58	13,82±7,03	11,21±5,69	S	0,40
E2 150 ng l⁻¹	1,36±0,16	1,15±0,41	MW	0,38	12,28±2,74	11,65±4,79	S	0,69
E2 450 ng l⁻¹	1,05±0,43	1,49±0,30	S	0,14	14,78±3,61	11,73±2,72	S	0,078

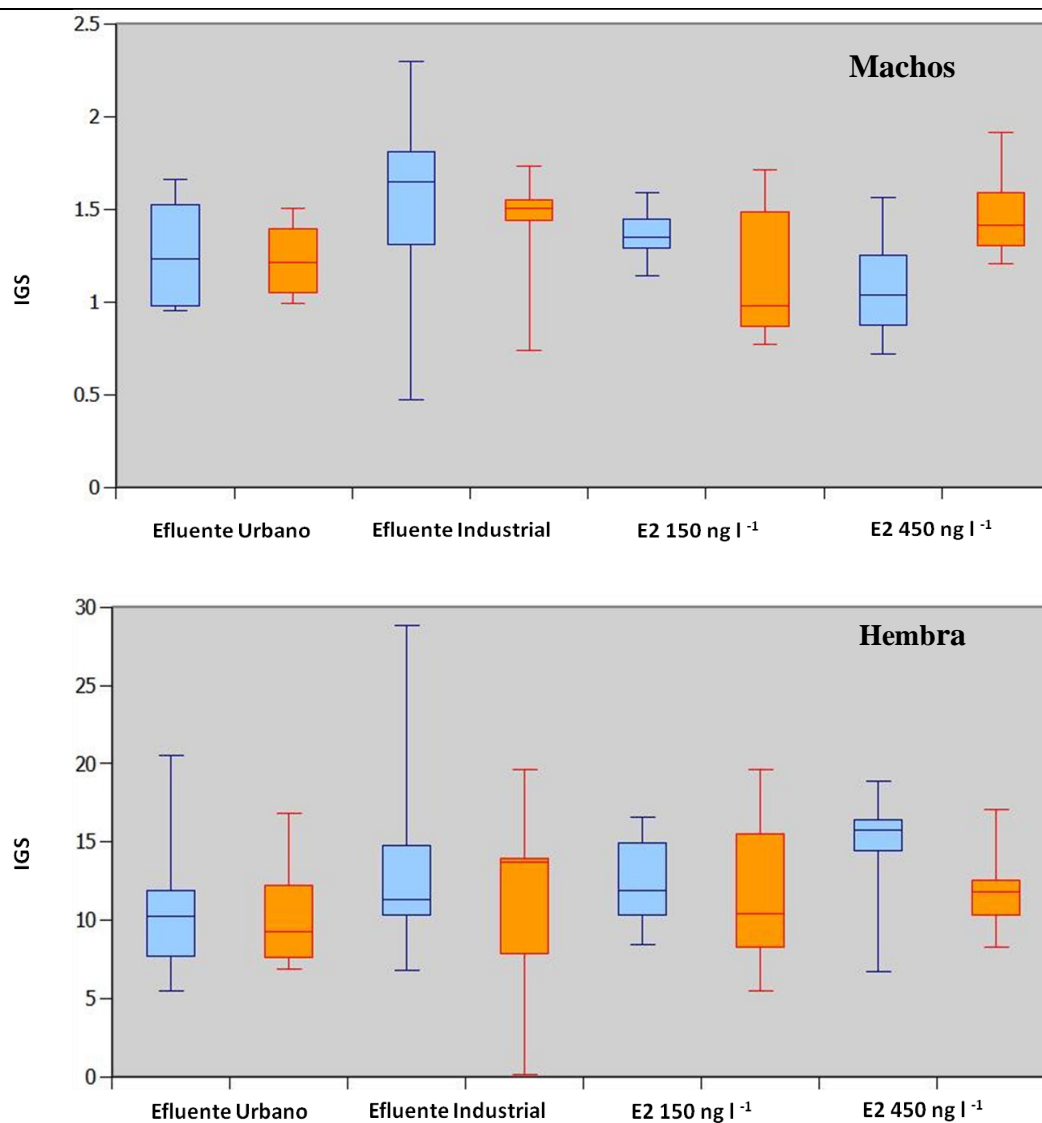


Figura 32. Representaciones Boxplot de los valores de IGS de los machos y hembras de *P. promelas* usados como control (celestes) y expuestos durante 21 días a un efluente urbano, a un efluente industrial y al

estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹ (naranja). No se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el IGS entre los grupos control y tratados.

Tubérculos Nupciales

En ninguno de los experimentos las hembras del grupo control o del grupo tratadas desarrollaron tubérculos nupciales. Los machos adultos en período reproductivo desarrollan normalmente tubérculos nupciales que fueron constatados en los peces control. El score de tubérculos nupciales no se vio afectado en los machos tratados con el efluente urbano, industrial o con las dos dosis de estradiol experimentadas como se observa en la Tabla 6 y en la Figura 33.

Tabla 6. Número de tubérculos nupciales promedio y su desvío estándar de machos de *P. promelas* control y expuestos (objetivo) durante 21 días a un efluente urbano, un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹. S = test de Student.

Tubérculos nupciales				
Experimento	Machos			
	Control	Objetivo	Test	p valor
E. Urbano	42,25±7,41	43,50±4,51	S	0,78
E. Industrial	35,22±4,63	31,33±10,11	S	0,31
E2 150 ng l⁻¹	35,83±8,18	31,67±12,16	S	0,50
E2 450 ng l⁻¹	35,00±5,10	36,75±5,70	S	0,69

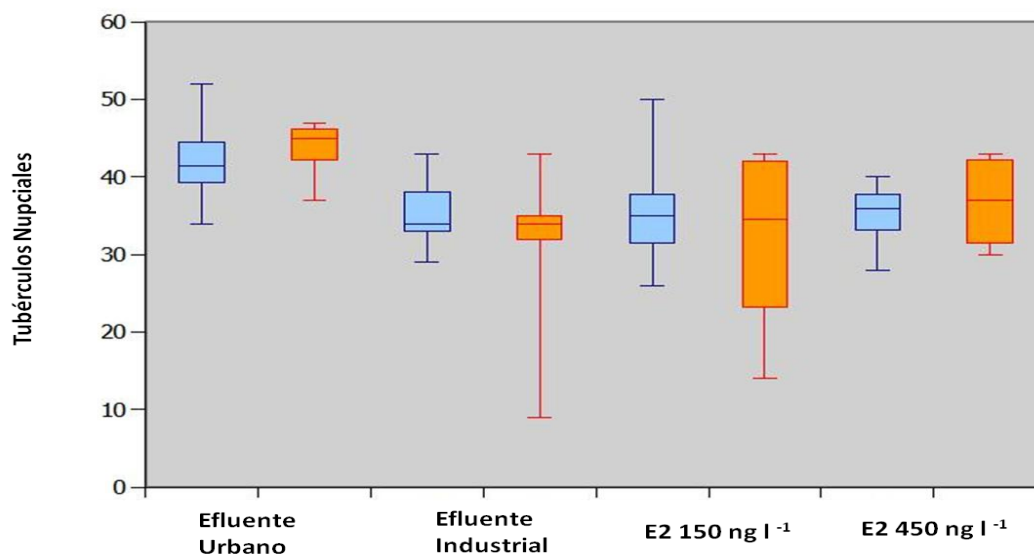


Figura 33. Representaciones Boxplot del score de de tubérculos nupciales (TN) de los machos de *P. promelas* usados como control (celeste) y expuestos durante 21 días a un efluente urbano, a un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹ (naranja). No se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los TN entre los grupos control y tratados.

Puesta de óvulos

El efluente urbano produjo un aumento en el número de óvulos puestos por hembra, pero el test estadístico no paramétrico (Kolmogorov-Smirnov o KS) no arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 7) (Fig. 34)

El efluente industrial indujo una disminución significativa ($KS = 0,0005 < 0,05$) del número de óvulos liberados por hembra (Tabla 7) (Fig. 34), de hecho el número de óvulos disminuyó a la mitad. Cuando se analizó el comportamiento de la liberación de óvulos en el tiempo se observó que el efluente industrial deprimió la liberación de óvulos desde

el tercer día en adelante y en forma sostenida (Fig. 34).

El tratamiento con estradiol en la dosis de 150 ng l⁻¹ (E2-150) indujo un aumento significativo ($p < 0,05$) del número de óvulos liberados por hembra por día, llegando a una duplicación del mismo (Tabla 7). Sin embargo, la dosis de 450 ng l⁻¹ (E2-450) de estradiol no tuvo un efecto sobre esta variable (Tabla 7). Cuando se observó la evolución de la liberación de óvulos a lo largo del período de estudio se constató que el E2-150 induce un aumento de la liberación de óvulos a partir del día 7 mientras que el aumento inducido por el efluente urbano ocurrió a partir del día 13 (Fig. 34).

Tabla 7. Número de óvulos liberados por hembra de *P. promelas* por día en los animales controles y tratados (objetivo) durante 21 días a un efluente urbano, a un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹. La estrella muestra donde hubo diferencias significativas. KS = test de Kolmogorov-Smirnov.

Puesta de óvulos				
Experimento	Hembras			
	Control	Objetivo	Test	p valor
E. Urbano	7,18	16,1	KS	0,071
E. Industrial	19,97	9,35	KS	0,001*
E2 150 ng l⁻¹	8,40	15,89	KS	0,0003*
E2 450 ng l⁻¹	13,14	15,33	KS	0,25

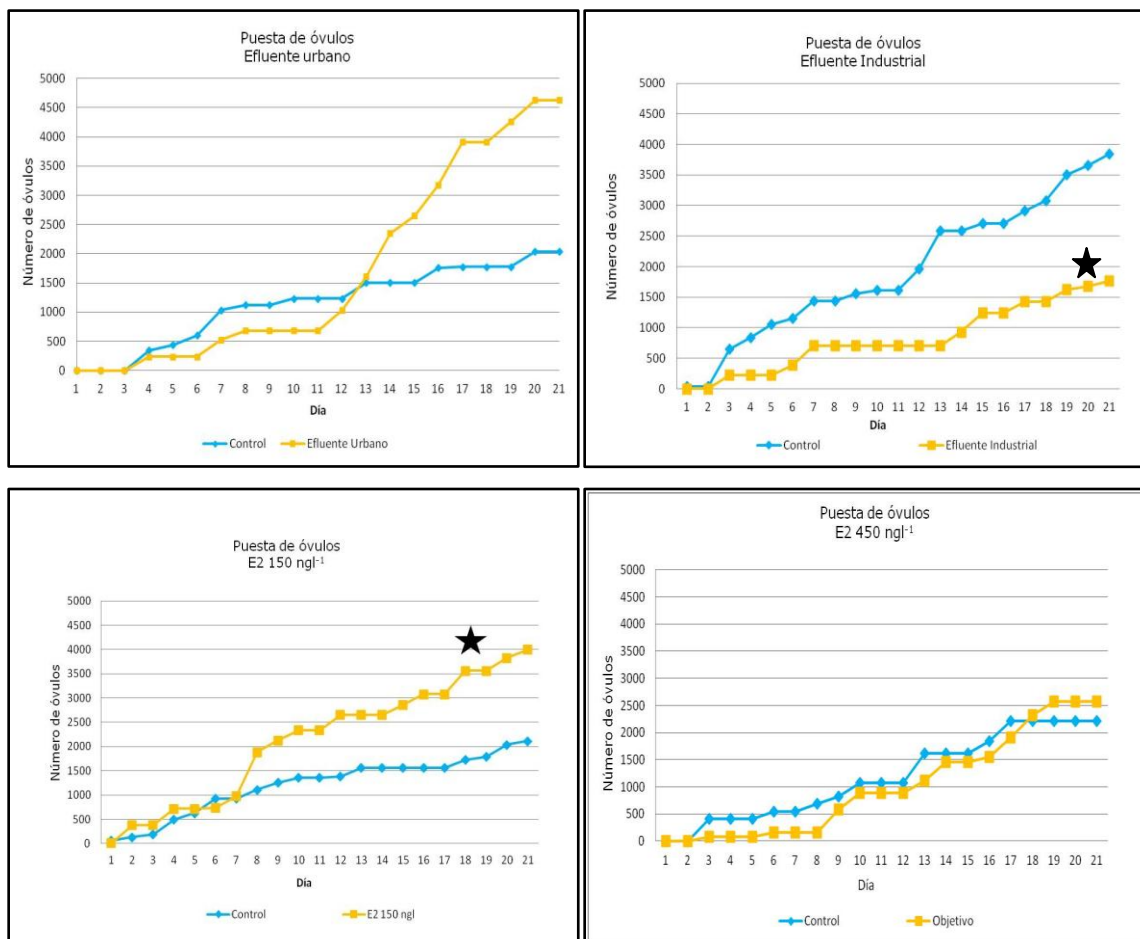
Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Figura 34. Suma acumulada de las puestas de óvulos de las hembras de *P. promelas* durante los 21 días del período de experimentación. Se muestran los controles (celeste) y los resultados de la exposición de las hembras (naranja) a un efluente urbano, a un efluente industrial y al estradiol (E2) en concentraciones de 150 y 450 ng l⁻¹. La estrella muestra en donde se encontró diferencias significativas con el test Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$).

Resultados histológicos cualitativos

Machos

Los testículos de todos los machos de todos los experimentos estaban en espermatogénesis y contenían los tipos celulares característicos de ese proceso: espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides (Figura 35).

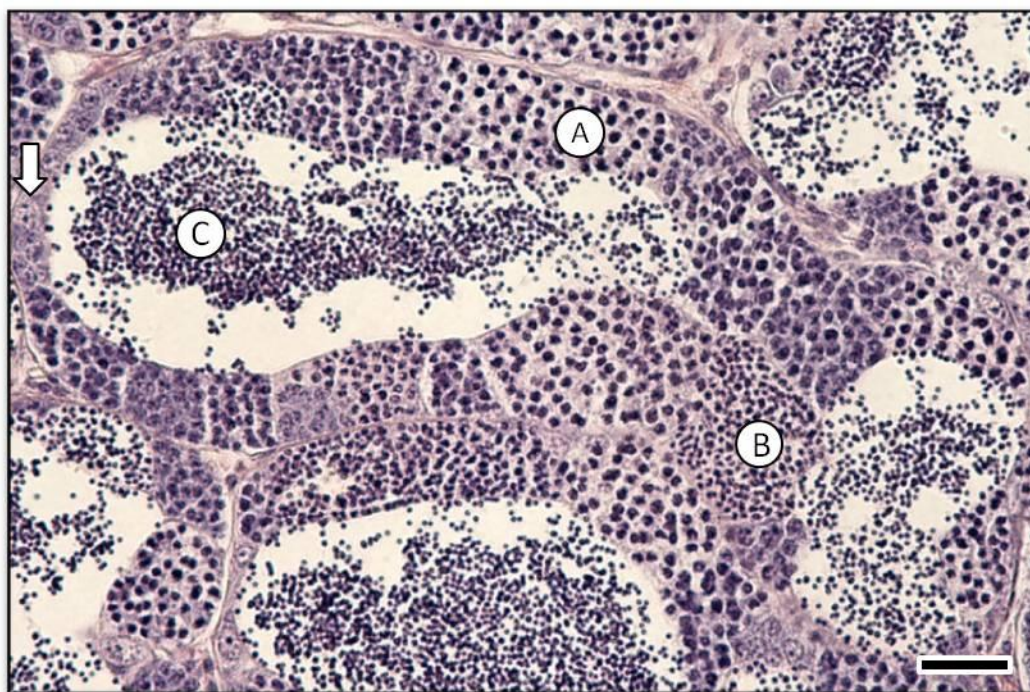


Figura 35. Corte histológico de un testículo de un macho de *P. promelas* en espermatogénesis. Se observan espermatogonias (flecha); espermatocitos (A), espermatidas (B), espermatozoides liberados a la luz tubular (C). Barra = 50 µm. Hematoxilina & Eosina (H&E)(40x).

Los estadios gonadales encontrados fueron del tipo 1, 2 y 3 y no se encontraron individuos con estadios gonadales 0. En la Figura 36 se

muestran estadios característicos correspondientes a los estados de desarrollo gonadal 2 y 3 para *P. promelas*. En los machos expuestos al efluente urbano, industrial, o al estradiol (E2) no se observó la presencia de ovocitos y no se detectó reversión del sexo ni parcial ni total.

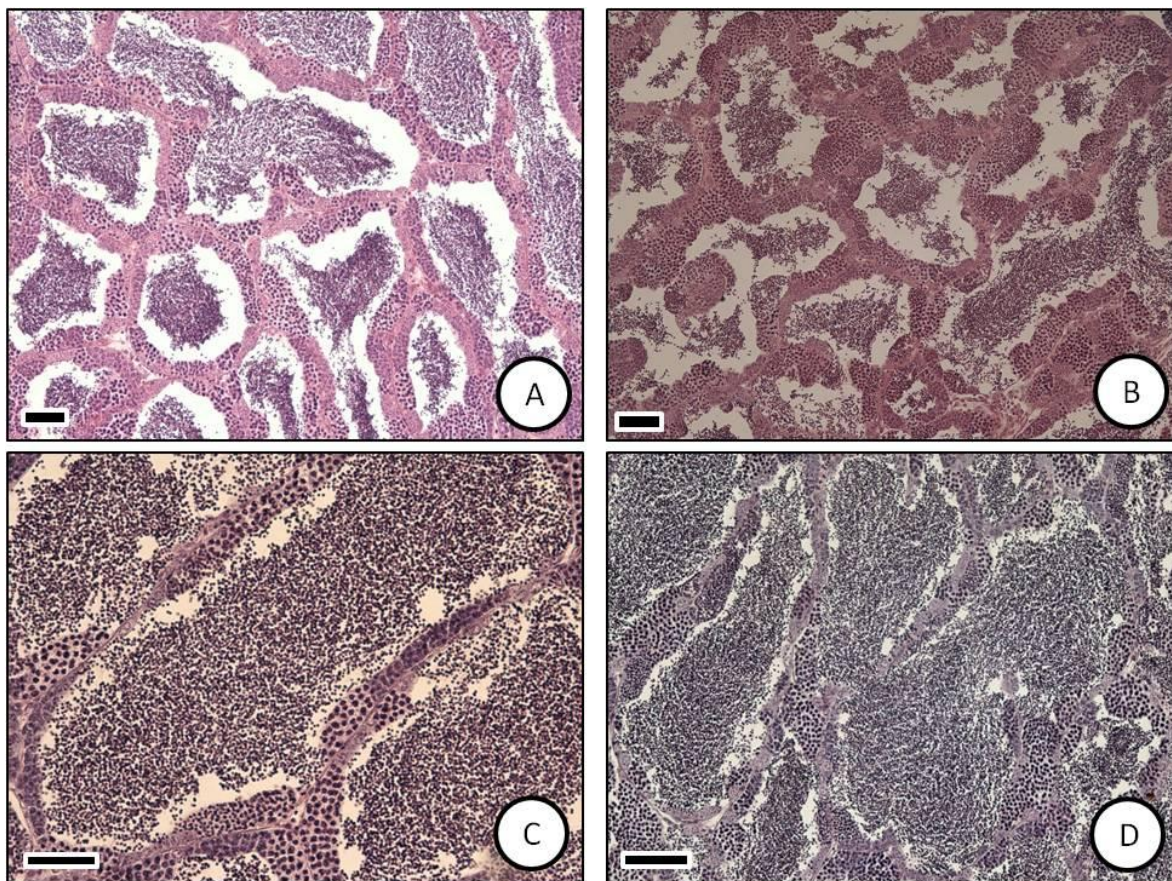


Figura 36. Estadios de desarrollo gonadal en machos de *P. promelas* expuestos a bioensayo crónico semi-estático de 21 días de duración. En (A) individuo de grupo control del experimento E2 150 ng^l⁻¹ en espermatogénesis estadio tipo 2 ,en (B) individuo del grupo objetivo del experimento E2 150 ng^l⁻¹ en estadio tipo 2, en (C) individuo de grupo control del experimento E2 150 ng^l⁻¹ en espermatogénesis estadio tipo 3 y en (D) individuo de grupo objetivo del experimento E2 150 ng^l⁻¹ en espermatogénesis estadio tipo 3. Barra = 25 µm.

Hembras

Los ovarios de las hembras de todos los grupos de experimentos estaban en proceso de ovogénesis y contenían los tipos celulares característicos de ese proceso: ovocitos perinucleolares, ovocitos corticales, ovocitos en vitelogénesis temprana, ovocitos en vitelogénesis tardía, ovocitos maduros, folículos post-ovulatorios y ovocitos atrésicos (Figura 36).

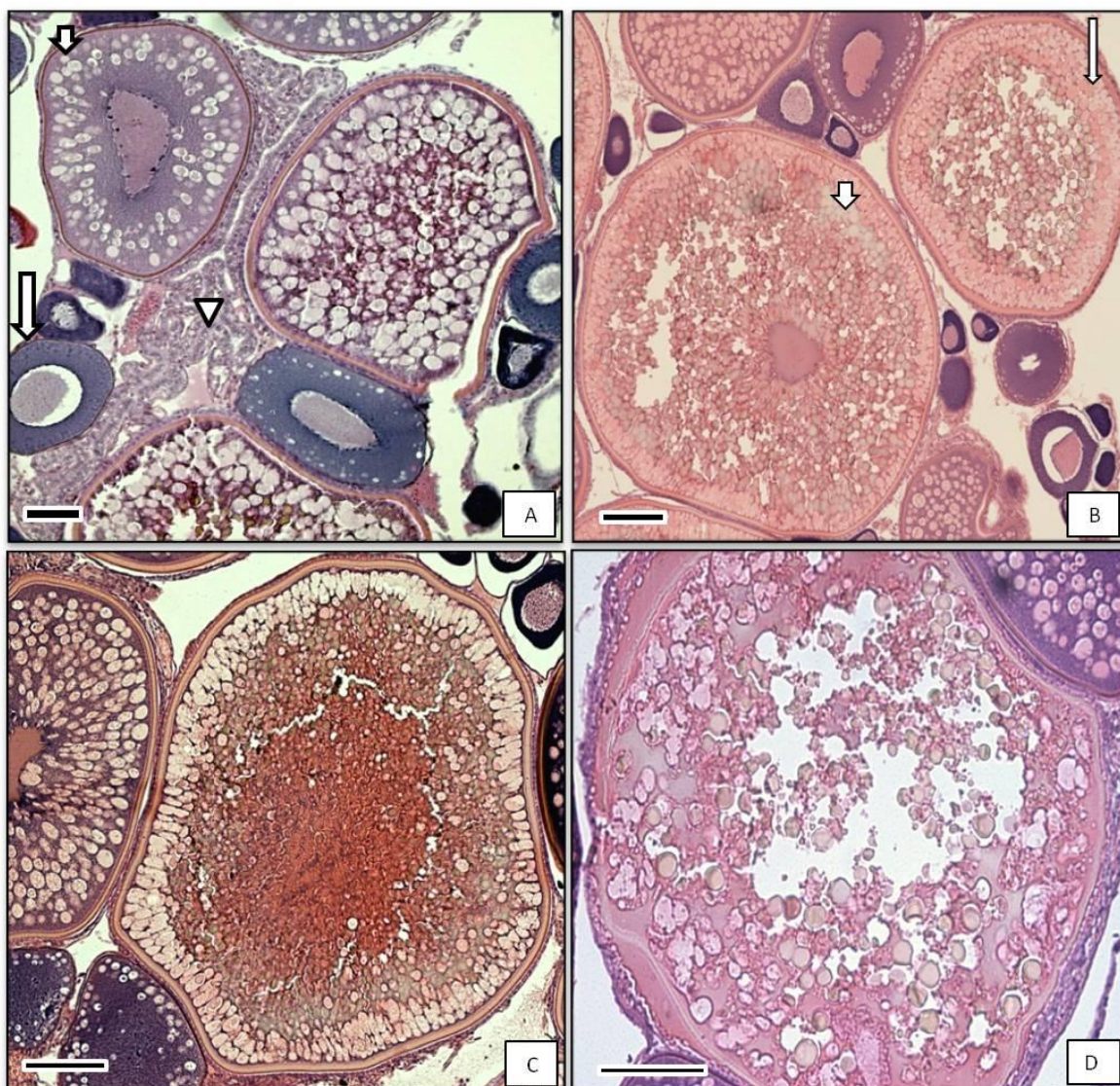


Figura 37. Cortes histológicos de ovarios de de hembras de *P. promelas*. Se observan en (A) ovocitos perinucleolares (flecha larga), ovocitos con alvéolos corticales (flecha corta) y folículo post ovulatorio (punta de flecha). En (B) ovocitos en vitelogénesis temprana (flecha larga) y en inicio de maduración como lo indica la migración del núcleo hacia la periferia (flecha corta). En (C) un ovocito maduro. En (D) un ovocito atrésico con la descomposición de la membrana pelúcida y del vitelo característico de esta etapa. Barra = 50 μm .

Los estadios de desarrollo gonadal fueron del tipo 2, 3 y 4 (Fig. 38) y no se hallaron individuos con estadios 0, 1 y 5 más allá de haber encontrado ovocitos en todas las fases del desarrollo ovogénico.

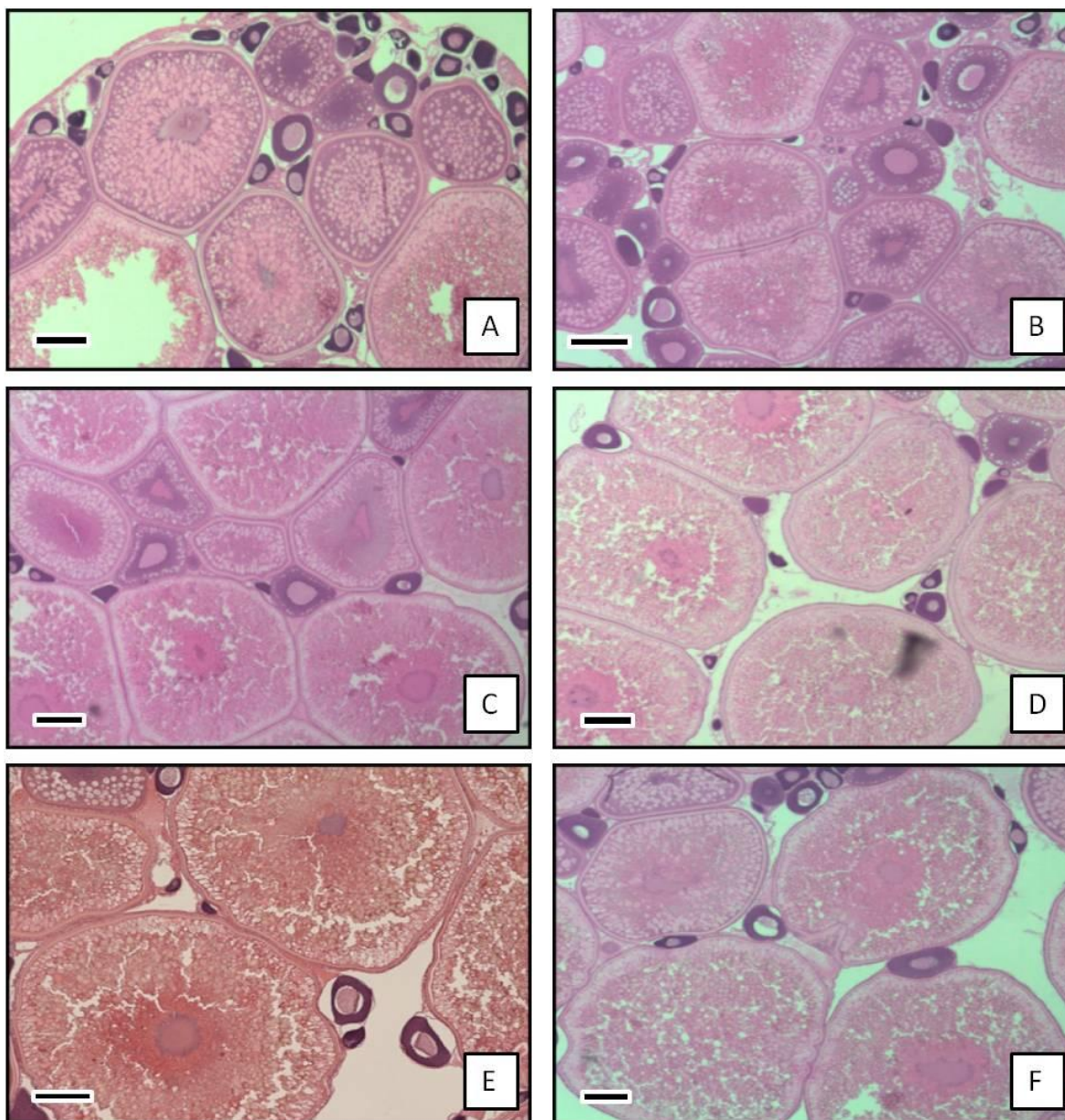


Figura 38. Estadios de desarrollo gonadal en hembras de *P. promelas* expuestas a bioensayo crónico semi-estático de 21 días de duración. En (A) estadio tipo 2 de un individuo de grupo control y (B) objetivo del experimento con E2 150 ng l⁻¹. En (C) estadio tipo 3 de un individuo de grupo control y (D) de objetivo del experimento con E2 450 ng l⁻¹. En (E) ovario en estadio tipo 4 de un individuo de grupo control y (F) objetivo del experimento con E2 150 ng l⁻¹. Barra = 100 µm.

Análisis histológicos cuantitativos

Experimentos con el Efluente Urbano

Machos

En la tabla 8 se muestran los valores medios con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos celulares considerados (espermatogonias, espermatocitos, espermatidas) respecto de su grupo control así como tampoco el test de Mann and Whitney en espermatozoides. En la Figura 39 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Tabla 8. Valores promedio de espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoos y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente urbano de la ciudad de Fray Bentos. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney.

Tipo celular	Control	Objetivo	Test	p valor
Espermatogonias	37,73±20,06	40,45±16,32	S	0,85
Espermatocitos	130,80±23,73	132,78±51,85	S	0,95
Espermatidas	43,27±13,05	40,32±18,06	S	0,82
Espermatozoos	89,27±55,30	46,03±10,64	MW	0,38

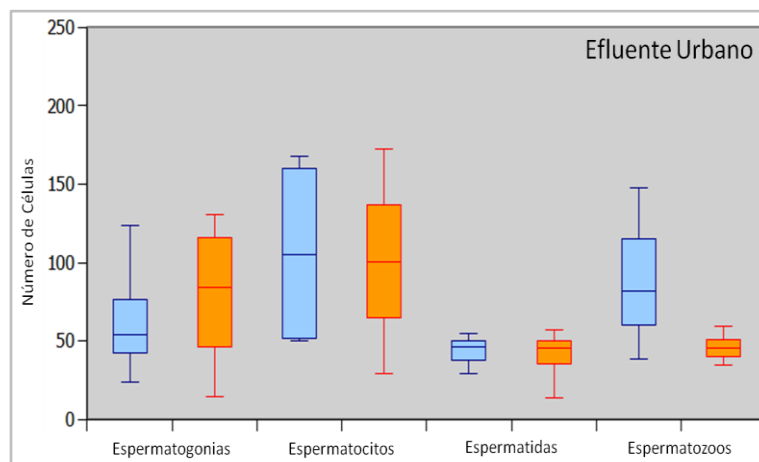


Figura 39. Representaciones Boxplot de los conteos de espermatogonias, espermaticitos, espermátidas y espermatozoos de los machos de *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente urbano (naranja) de la ciudad de Fray Bentos y a su control negativo respectivamente (celeste).

Hembras

En la tabla 9 se muestran los valores promedios con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Mann and Whitney no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos celulares considerados (ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis tardía y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) respecto de su grupo control así como tampoco el test de Student ($p > 0,05$) en ovocitos en vitelogénesis temprana. En la Figura 40 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 9. Valores promedio de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente urbano de la ciudad de Fray Bentos. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney; NC = no corresponde.

Ovocitos	Control	Objetivo	Test	p valor
Perinucleolares	12,33 ± 5,37	10,07 ± 2,34	MW	0,28
Corticales	5,20 ± 1,99	5,71 ± 2,52	MW	0,79
Vit. temprana	2,29 ± 1,19	1,74 ± 1,14	S	0,26
Vit. tardía	0,54 ± 0,93	0,55 ± 0,47	MW	0,25
Maduros	0	0,04 ± 0,14	NC	NC
Atrésicos/FPO	0,64 ± 1,06	0,94 ± 0,99	MW	0,24

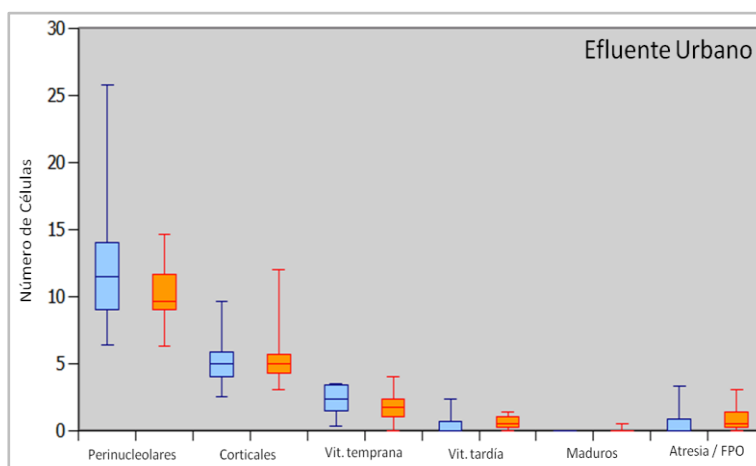


Figura 40. Representaciones Boxplot de los conteos de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) de ovarios de *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente urbano (naranja) de la ciudad de Fray Bentos y a su control negativo respectivamente (celeste).

Experimentos con el Efluente Industrial

Machos

En la Tabla 10 se muestran los valores promedios con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test no paramétrico de Mann and Whitney no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre espermatogonias y su grupo control y el test de Student ($p > 0,05$) tampoco lo hizo con los restantes tipos celulares (espermaticitos, espermátidas y espermatozoos) (Tabla10). En la Figura 41 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Tabla 10. Valores promedio de espermatogonias, espermaticitos, espermátidas y espermatozoides y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney.

Tipo celular	Control	Objetivo	Test	p valor
Espermatogonias	57,99 ± 25,44	57,91 ± 55,93	MW	0,31
Espermaticitos	131,94 ± 28,82	103,42 ± 33,85	S	0,08
Espermátidas	55,30 ± 25,21	38,62 ± 20,91	S	0,15
Espermatozoos	100,63 ± 60,74	128,62 ± 60,60	S	0,35

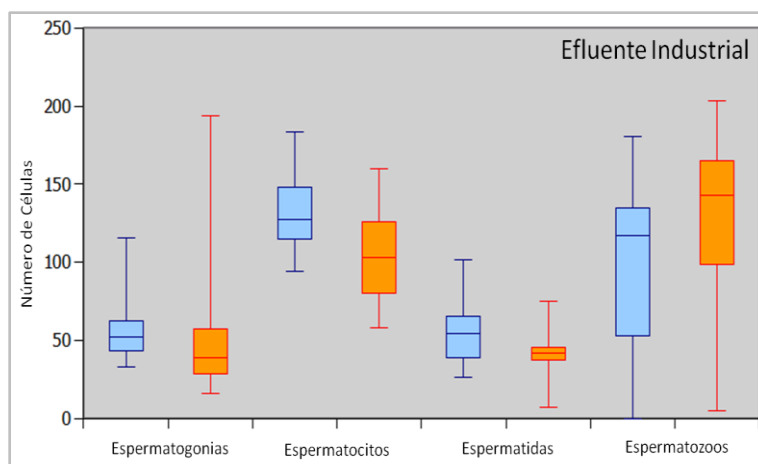


Figura 41. Representaciones Boxplot de los conteos de espermátogonias, espermátocitos, espermátidas y espermatozoides de los machos de *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente industrial (naranja) de una planta de producción de pulpa de celulosa y a su control negativo respectivamente (celeste).

Hembras

En la Tabla 11 se muestran los valores promedio con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos celulares considerados (ovocitos perinucleolares, corticales y en vitelogénesis temprana). Tampoco el test no paramétrico de Mann-Whitney mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ovocitos en vitelogénesis tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) con respecto a su grupo control. En la Figura 42 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 11. Valores promedio de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente industrial de una planta de producción de pulpa de celulosa. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney.

Ovocitos	Control	Objetivo	Test	p valor
Perinucleolares	11,44 ± 4,71	9,54 ± 4,59	S	0,41
Corticales	8,06 ± 3,53	7,58 ± 3,49	S	0,78
Vit. temprana	1,93 ± 1,15	2,96 ± 1,71	S	0,16
Vit. tardía	0,93 ± 0,97	1,08 ± 1,00	MW	0,77
Maduros	0,04 ± 0,11	0,13 ± 0,25	MW	0,47
Atrésicos/FPO	0,98 ± 1,11	1,00 ± 0,76	MW	0,73

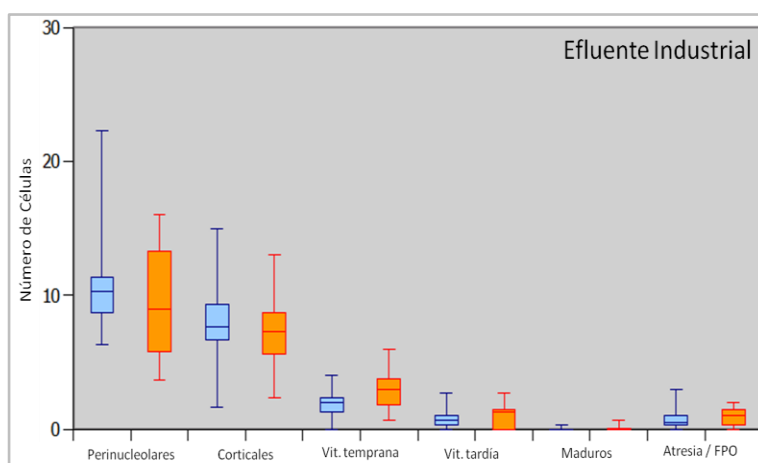


Figura 42. Representaciones Boxplot de los conteos de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) de ovarios de *P. promelas* expuestos durante 21 días a un efluente industrial (naranja) de una planta de producción de pulpa de celulosa y a su control negativo respectivamente (celeste).

Experimentos de tratamiento con estradiol 17- β a 150 ng l⁻¹

Machos

En la Tabla 12 se muestran los valores promedio con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre espermatogonias, espermatocitos y espermátidas respecto de su correspondiente grupo control. Sin embargo, el estradiol indujo una disminución clara (42 %) y significativa ($p < 0,05$) del número de espermatozoides respecto del control (Tabla 12). En la Figura 43 se representan los boxplot de los conteos realizados.

Tabla 12. Valores promedio de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoos y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol 17- β 150 ng l⁻¹. * diferencia estadísticamente significativa. S = test de Student.

Tipo celular	Control	Objetivo	Test	p valor
Espermatogonias	49,03 \pm 18,00	66,42 \pm 18,41	S	0,12
Espermatocitos	83,70 \pm 36,23	119,25 \pm 30,08	S	0,09
Espermátidas	34,87 \pm 21,23	34,63 \pm 14,36	S	0,98
Espermatozoos	168,87 \pm 44,86	98,14 \pm 35,30	S	0,0012*

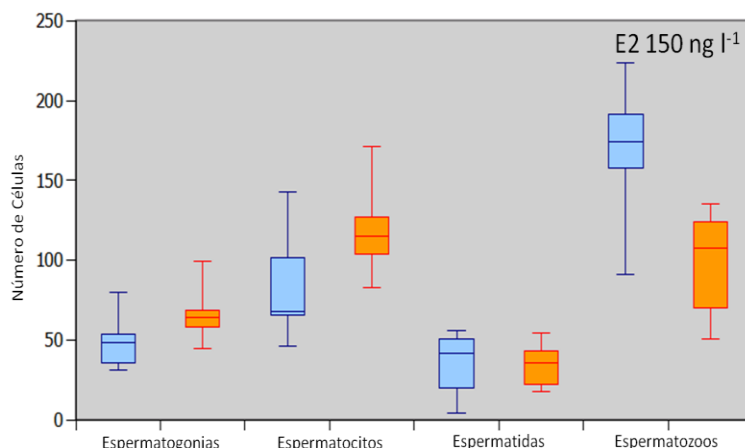


Figura 43. Representaciones Boxplot de los conteos de espermátogonias, espermátocitos, espermátidas y espermátozoos de los machos de *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol -17 β a una dosis de 150 ng l⁻¹ (naranja) y su control correspondiente (celeste).

Hembras

En la Tabla 13 se muestran los valores promedio con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos celulares considerados (ovocitos perinucleolares, en vitelogénesis temprana y atrésicos/folículos post ovulatorios. Tampoco el test no paramétrico de Mann and Whitney mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ovocitos corticales, en vitelogénesis tardía y maduros respecto de su correspondiente grupo control. En la Figura 44 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 13. Valores promedio de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios(FPO) y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis de 150 ng l⁻¹ y el control correspondiente. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney.

Ovocitos	Control	Objetivo	Test	p valor
Perinucleolares	14,67 \pm 6,04	17,83 \pm 5,97	S	0,21
Corticales	6,17 \pm 1,76	7,25 \pm 4,24	MW	0,90
Vit. temprana	1,97 \pm 0,83	2,17 \pm 1,34	S	0,67
Vit. tardía	1,28 \pm 0,80	1,11 \pm 1,14	MW	0,84
Maduros	0,11 \pm 0,16	0,06 \pm 0,13	MW	0,38
Atrésicos/FPO	1,22 \pm 0,77	1,75 \pm 1,07	S	0,18

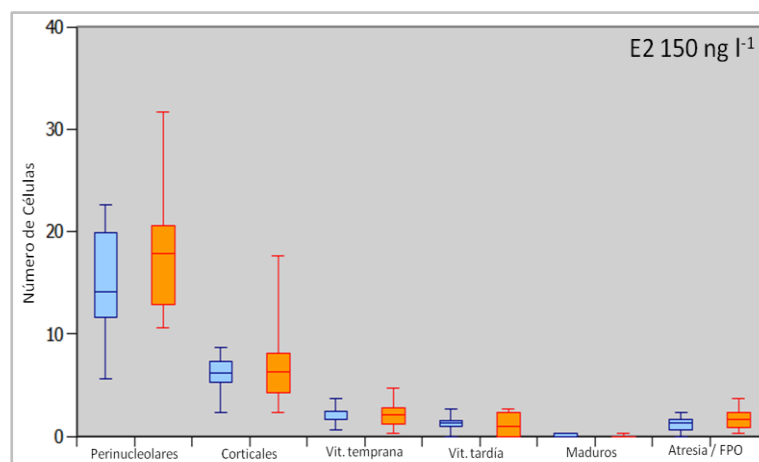


Figura 44. Representaciones Boxplot de los conteos de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) de ovarios de *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis e 150 ng l⁻¹(naranja) a su control correspondiente (celeste).

Experimentos de tratamiento con estradiol -17 β a 450 ng l⁻¹

Machos

En la Tabla 14 se muestran los valores promedio con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoos respecto de su grupo control. En la Figura 45 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Tabla 14. Valores promedio de espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis de 450 ng l⁻¹. S = test de Student.

Tipo celular	Control	Objetivo	Test	p valor
Espermatogonias	47,95 \pm 8,76	49,60 \pm 15,51	S	0,86
Espermatocitos	113,20 \pm 13,56	131,40 \pm 38,30	S	0,40
Espermatidas	50,35 \pm 19,83	58,95 \pm 12,00	S	0,48
Espermatozoos	143,60 \pm 60,87	134,85 \pm 68,14	S	0,85

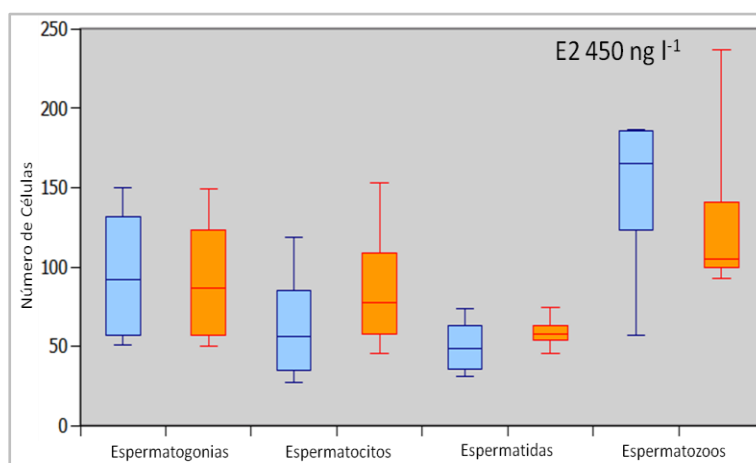


Figura 45. Representaciones Boxplot de los conteos de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides de los machos de *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis de 450 ng l⁻¹ (naranja) y del control correspondiente (celeste).

Hembras

En la Tabla 15 se muestran los valores promedio con sus desvíos estándar para los tipos celulares considerados en el análisis cuantitativo. El test de Student no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos celulares considerados (ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogénesis temprana y tardía). El test no paramétrico de Mann-Whitney tampoco mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ovocitos atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) respecto de su control correspondiente. En la Figura 46 se representan los boxplots de los conteos realizados.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 15. Valores promedio de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogenénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) y el valor probabilidad (p) para *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis de 450 ng l⁻¹ y de su control correspondiente. S = test de Student; MW = test de Mann Whitney.

Ovocitos	Control	Objetivo	Test	p valor
Perinucleolares	16,92 \pm 10,43	19,05 \pm 7,22	S	19,05 \pm 7,22
Corticales	6,62 \pm 4,24	7,24 \pm 2,67	S	7,24 \pm 2,67
Vit. temprana	2,50 \pm 1,25	2,81 \pm 1,40	S	2,81 \pm 1,40
Vit. tardía	2,04 \pm 1,39	2,48 \pm 1,05	S	2,48 \pm 1,05
Maduros	0,04 \pm 0,12	0	MW	0
Atrésicos/FPO	1,21 \pm 1,62	0,57 \pm 0,42	MW	0,57 \pm 0,42

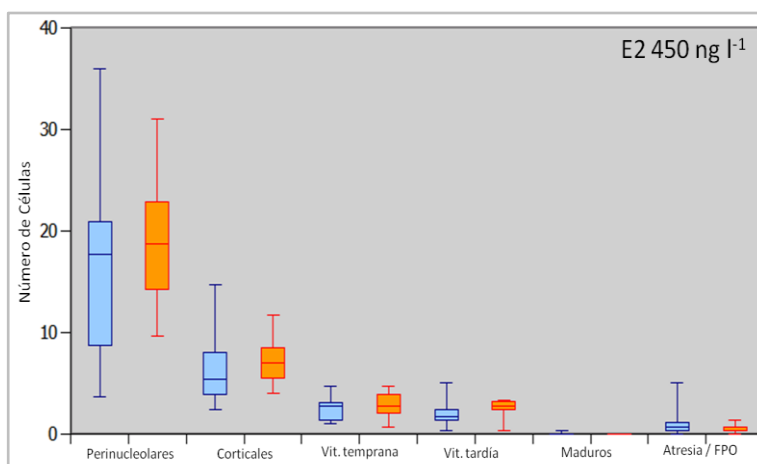


Figura 46. Representaciones Boxplot de los conteos de ovocitos perinucleolares, corticales, en vitelogenénesis temprana y tardía, maduros y atrésicos/folículos post ovulatorios (FPO) de ovarios de *P. promelas* expuestos durante 21 días al estrógeno estradiol-17 β a una dosis de 450 ng l⁻¹ (naranja) y de su control correspondiente (celeste).

En la tabla 16 se presentan a manera de resumen los resultados obtenidos en todos los experimentos realizados.

Efectos de efluentes industriales y urbanos en *Pimephales promelas*

Tabla 16. Resultados obtenidos en los bioensayos crónicos de 21 días con el pez *P. promelas* en las matrices efluente urbano (EU), efluente industrial (EInd), estradiol-17 β a una dosis de 150 ng l⁻¹ (E2 150) y 450 ng l⁻¹ (E2 450). M = macho; H = hembra. - = respuesta disminuida; + = respuesta aumentada; 0 = no hubo respuesta.

Variable / Experimental	EU		EInd		E2 150		E2 450	
	M	H	M	H	M	H	M	H
Longitud	-	0	0	0	0	0	0	0
Peso	0	0	0	0	0	0	0	0
IGS	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubérculos nupciales	0	0	0	0	0	0	0	0
Puesta de óvulos	0		-		+		0	
Histología cualitativa	0	0	0	0	0	0	0	0
Histología cuantitativa								
Espermatogonias	0		0		0		0	
Espermatocitos	0		0		0		0	
Espermátidas	0		0		0		0	
Espermatozoos	0		0		-		0	
Ovocitos Perinucleolares	0		0		0		0	
Corticales	0		0		0		0	
Vit. temprana	0		0		0		0	
Vit. tardía	0		0		0		0	
Maduros	0		0		0		0	
Atrésicos / FPO	0		0		0		0	

DISCUSION

En este trabajo se evaluaron los potenciales efectos sobre aspectos de la reproducción en el pez *Pimephales promelas* de dos efluentes, uno urbano proveniente de la ciudad de Fray Bentos y uno industrial perteneciente a la industria de producción de pulpa de celulosa ubicada en la misma ciudad comparándolos con los efectos del estradiol en dosis de 150 y 450 ng l⁻¹. Para ello se consideraron los siguientes indicadores en machos y hembras adultos: talla, peso, índice gonadosomático, presencia/ausencia de tubérculos nupciales, número de óvulos liberados, cambios cualitativos y cuantitativos gonadales en grupos control y grupos tratados.

Las variables biológicas consideradas, el peso, el índice gonadosomático y los tubérculos nupciales no se vieron alterados en ninguno de los experimentos realizados y correspondieron a los valores normales para la especie (Watanabe et al. 2007), mostrando que los efluentes urbano e industrial y los estrógenos utilizados no tuvieron efecto sobre las variables estudiadas.

A pesar de que en condiciones naturales se ha reportado la ocurrencia de anomalías gonadales en *P. promelas* (Dietrich & Krieger 2009), no se evidenciaron anomalías en los individuos utilizados en nuestros experimentos. No fue observado el desarrollo de anomalías

gonadales cualitativas en ningún experimento cuando se utilizó el efluente urbano, el efluente industrial y el estradiol. Las alteraciones gonadales esperadas eran: presencia de ova-testis o testis-ova, sincitios de células germinales, espermatozoides en degeneración o restos celulares de la espermatogénesis en el ducto espermático y que pueden producirse como respuesta frente a la exposición de compuestos químicos con capacidad estrogénica (Miles-Richardson et al. 1998, 1998; Giesy et al. 1999; Wolf et al. 2004) y que también pueden encontrarse condiciones naturales (Dietrich & Krieger 2009).

La ausencia de alteraciones histopatológicas cualitativas gonadales como presencia de ova-testis o testis-ova asociadas a alteraciones en el eje HPG sugiere que la capacidad estrogénica de los efluentes utilizados en este trabajo es baja o nula para producir estas alteraciones.

Efectos de los estrógenos

No se observaron modificaciones inducidas por las dosis de estrógeno en las variables: longitud, peso, IGS y tubérculos nupciales.

Los valores de longitud y peso hallados frente a la exposición a estrógenos en las dosis de 150 y 450 ng l⁻¹ no fueron alterados ni en los machos ni en las hembras expuestas. Los valores hallados corresponden con los normalmente encontrados para *Pimephales promelas* (Watanabe

et al. 2007).

El crecimiento puede ser afectado por los compuestos estrogénicos, estos pueden regular negativamente el eje GH/IGF-1 en parte por la reducción en abundancia de los receptores de la hormona de crecimiento GH (Lerner et al. 2012). En investigaciones de ciclo de vida con *P. promelas*, con inicio en etapas embrionarias, se han observado alteraciones en el crecimiento (Parrot et al. 2004). Por lo tanto, la ausencia de efecto sobre la talla y el peso de *P. promelas* detectadas en los experimentos con estradiol utilizados sugieren que esas dosis o el tiempo utilizado no fueron efectivos para alterar estos parámetros. Un diseño experimental incluyendo el ciclo de vida, desde la etapa embrionaria hasta el adulto, podría aportar efectos sobre la longitud y el peso.

Índice gonadosomático

El índice gonadosomático es una variable sensible a los estrógenos. Panter et al. (2000), Hyndman et al. (2010), Shappell et al. (2010) y Dammann et al. (2011) no encontraron alteraciones en el índice gonadosomático cuando utilizaron dosis de estradiol menores a 120 ng l^{-1} . Los resultados encontrados en este trabajo sobre el IGS en el experimento E2-150 son acordes a los antecedentes.

Panter et al. (1998) expusieron machos de *P. promelas* a dosis

elevadas de estradiol (320 y 1000 ng l⁻¹) obteniendo alteraciones en el IGS. Considerando los hallazgos encontrados por Panter et al. (1998) era esperable que la E2-450 tuviese un efecto de alteración del IGS. Pero la ausencia de efecto sobre el parámetro IGS en el experimento E2-450 no concuerda con Panter et al. (1998) y es por tanto una interrogante a resolver.

Tubérculos nupciales

El desarrollo de características sexuales secundarias como los tubérculos nupciales no se vio afectado en ninguno de los machos expuestos en ninguno de los experimentos de control positivo de estrogenicidad. Así como tampoco hubo desarrollo de tubérculos nupciales en las hembras indicativo de androgenicidad o anti estrogenicidad. En los machos la cantidad y distribución de los mismos fueron los característicos para la especie (Jensen 2001, Watanabe 2007, OECD 2009) y tampoco hubo ejemplares con un "score" de más de 50 indicativo de alguna alteración (OECD 2009).

Los estrógenos pueden alterar la expresión de los tubérculos nupciales en machos y en hembras de *P. promelas* como reporta Miles-Richardson et al. (1999) mediante la exposición a 17β-estradiol en dosis de 2750 ng l⁻¹. Sin embargo, Ankley et al. (2001) usando el estrógeno metoxiclor no observó efectos ni en machos ni en hembras.

La ausencia de efectos sobre los tubérculos nupciales sugiere que las dosis analizadas de E2-150 y E2-450 no fueron suficientes para alterar el desarrollo de los mismos.

Aspectos testiculares cualitativos y cuantitativos

No se observaron alteraciones testiculares indicativas de exposición al estradiol en E2-150 y E2-450. El 17β -estradiol está presente en la circulación sanguínea de los peces machos a bajas concentraciones (Miura et al. 1999) y es un fuerte agonista de los receptores de estrógeno que afecta a los testículos de *P. promelas* (Leino et al. 2005). Los cambios que el 17β -estradiol pueden generar en la gónada masculina de adultos de *P. promelas* son variados (Miles-Richardson et al. 1999, Wolf et al. 2004) y dependientes de la dosis, produciendo por ej: degeneración leve de los espermatozoides, surgimiento de testis-ova (Leino et al. 2005) y atrofia de los mismos (Panter et al. 1998, Leino et al. 2005). La ausencia de este tipo de anomalías sugiere que las dosis utilizadas en los controles positivos de estrogenicidad fueron bajas para afectar la estructura celular de los testículos.

El análisis cuantitativo de las poblaciones celulares de los testículos de *P. promelas* mostró que la cantidad de espermatozoides presentes fue afectada negativamente en los peces expuestos a 17β -

estradiol en el experimento E2-150. Este resultado es similar al hallado por Marlatt et al. (2013) en donde obtuvieron alteraciones a nivel de la gametogénesis masculina como el decrecimiento en la proporción de espermátidas de *P. promelas* en dosis de 17β -estradiol de 100 ng l^{-1} sin observar lesiones testiculares.

En las condiciones experimentales que se realizó este trabajo, la dosis del experimento E2-150 de estradiol tuvo un efecto significativo, de tipo estrogénico y fue la disminución del número de espermatozoides observados. También pudo haber habido una mayor liberación de los espermatozoides en este experimento como respuesta a que la liberación y puesta de óvulos fue aumentada significativamente.

Aspectos ováricos cualitativos y cuantitativos

No se observaron alteraciones ováricas indicativas de exposición al estradiol en E2-150 y E2-450. Wolf et al. (2004) observaron atresia folicular generada por el 17β -estradiol a 2750 ng l^{-1} y a pesar de que la presencia de ova-testis en *P. promelas* puede ocurrir naturalmente (Dietrich & Krieger 2009), no se encontró esta anomalía en las hembras expuestas a E2-150 y E2-450 ni en las de los grupos control. Otros autores han demostrado que la exposición de *P. promelas* a nonilfenol y nonilfenol etoxilado ($0,5 - 3,4 \mu\text{g l}^{-1}$), ambos agonistas de estrógenos, no indujeron alteraciones a nivel gonadal (Miles-Richardson 1999), y el

metoxiclor en alta concentración ($3,6 \mu\text{g l}^{-1}$) produjo un leve aumento de folículos atrésicos en algunas hembras expuestas (Ankley et al. 2001). Por tanto las dosis de E2 utilizadas en esta investigación parecen no poseer la suficiencia para generar cambios celulares en los ovarios de los peces expuestos.

La puesta de óvulos fue incrementada significativamente en un 89% frente a la exposición en el control positivo de estrogenicidad E2-150, mientras que en el experimento E2-450 la producción de óvulos no se vio alterada. Dammann et al. (2011) muestran que a bajas concentraciones (7 ng l^{-1}) de 17β -estradiol la producción de óvulos en *P. promelas* es estimulada y reporta que a mayores concentraciones de 17β -estradiol (50 ng l^{-1}) esta producción es disminuida e incluso podría llegar a ser inhibida. Shappell et al. (2010) y Marlatt et al. (2013) que expusieron a peces adultos de *P. promelas* a concentraciones de E2 44 y 100 ng l^{-1} respectivamente no encontraron diferencias significativas en la producción de óvulos. En este trabajo, en el experimento E2-450 la dosis de 17β -estradiol utilizada no afectó el número de óvulos liberados.

Un balance espacial y temporal adecuado de los estrógenos es crucial para un correcto funcionamiento del organismo y la interferencia de perturbadores endócrinos con la expresión o actividad de la enzima aromatasa *cyp19* tiene consecuencias para la reproducción en peces

teleósteos (Cheshenko et al. 2008). La dosis más baja del estrógeno E2 utilizada en este trabajo muestra efecto sobre la producción de óvulos, la alteración por medio de EDCs estrogénicos sobre cyp19 puede haber causado los efectos observados en este parámetro reproductivo.

Halm et al. (2002) demostraron en las gónadas de *P. promelas* que el E2 supra-regulaba la expresión del ARNm p450aromB y que era dosis dependiente, siendo la mayor expresión en los ovarios de las hembras expuestas a 320 ng l⁻¹. En especies de desove múltiple como *P. promelas* estos niveles de expresión se asocian con un nuevo ciclo de desarrollo de los ovocitos (Halm et al. 2002).

Por tanto la dosis del experimento E2-150 puede haber acelerado el proceso de conversión de testosterona a estradiol por medio de la supra-regulación de los genes de aromatasa y generar una mayor producción de óvulos sin haber afectado la puesta.

Efluente urbano

En el experimento de exposición al efluente urbano no se observaron cambios en el peso y tubérculos nupciales. En cambio si se observó una disminución significativa pequeña de la talla de los machos de 0,3 cm. Los valores de IGS de machos y hembras no fueron afectados por el efluente urbano y estuvieron dentro del rango de

valores normales de la especie (machos = 0,35 - 2,76; hembras = 1,4 - 25) (Watanabe et al. 2007). La ausencia de afectación del índice gonadosomático en machos y hembras expuestas al efluente urbano sugiere que este efluente no posee los niveles de compuestos químicos estrogénicos o androgénicos para poder afectar esta variable o a las interacciones antagónicas que estos compuestos químicos puedan tener entre sí.

Crecimiento

La variación en la talla encontrada en este trabajo aunque pequeña podría ser un efecto inducido por el efluente urbano con capacidad estrogénica que actuaría sobre el eje GH/IGF-1. El análisis de aguas del arroyo Fray Bentos (efluente urbano) utilizadas en este estudio demostró la presencia de los compuestos estrogénicos estradiol, estrona, estriol, etinilestradiol, 4-nonilfenol y para-ter-octilfenol (Miguez 2013)(Anexo I). Lerner et al. (2012) mostraron que los compuestos estrogénicos como los presentes en el agua superficial del arroyo Fray Bentos (Miguez 2013), pueden regular negativamente el eje GH/IGF-1 y comprometer el crecimiento. Thorpe et al. (2009) y Vajda et al. (2011) expusieron a *P. promelas* frente a efluentes urbanos con capacidad estrogénica similares al utilizado en este trabajo pero no encontraron diferencias en el crecimiento en los organismos expuestos. Tal vez la

concentración de tóxicos de los efluentes evaluados por dichos autores no fue la suficiente como para alterar el crecimiento de los peces o también a la posibilidad de las interacciones antagónicas entre los productos químicos que este tipo de efluentes poseen y minimicen los efectos.

En *Pimephales promelas* han habido efectos sobre el crecimiento cuando los ensayos fueron utilizando el ciclo de vida iniciándose desde la etapa embrionaria hasta el adulto (Parrot et al. 2004, 2005). La etapa embrionaria es una etapa particularmente sensible en respuesta a perturbadores endócrinos (Warner et al. 2007) y otros contaminantes (Jeziarka et al. 2009). Se debe considerar un diseño experimental de ciclo de vida iniciándose el mismo en la etapa embrionaria lo que permitiría ahondar mejor sobre los efectos en el crecimiento de *P. promelas* expuestos a distintos efluentes con capacidad estrogénica.

Aspectos testiculares cualitativos y cuantitativos

No se encontraron anomalías o alteraciones en los testículos de los peces que fueron expuestos al efluente urbano. La dosis de 17 β -estradiol utilizada por Miles-Richardson et al. (1998) y Wolf et al. (2004) fue 2750 ng l⁻¹ y produjo alteraciones en las poblaciones celulares testiculares de *Pimephales promelas*. La exposición a nonilfenol y nonilfenol etoxilado en dosis de hasta 5,5 μ g l⁻¹ no produjo lesiones

testiculares (Miles-Richardson et al. 1999). Estos compuestos químicos fueron caracterizados en el agua del arroyo Fray Bentos (Miguez 2013) en niveles más bajos que los autores citados lo que explicaría la ausencia de anomalías testiculares.

El agua superficial del arroyo Fray Bentos indujo una disminución importante pero no significativa en la cantidad de espermatozoides producidos. Si bien la tendencia a la disminución era el efecto esperado para un efluente de carácter estrogénico, el mismo no fue significativo, por lo cual no se puede concluir sobre una posible alteración cuantitativa testicular.

Los estrógenos poseen un importante rol en la regulación de la expresión génica en los testículos (Schulz et al. 2010) aunque su rol en la espermiación no está claramente identificado (Vizziano et al. 2007).

La interacción de los compuestos estrogénicos en las aguas que reciben la descarga de efluentes cloacales son capaces de generar efectos estrogénicos como la demasculinización gonadal en *P. promelas* (Vajda et al. 2011). Si bien se constató una disminución del número de espermatozoides en experimento con el efluente urbano, la misma no fue significativa por lo cual no se puede concluir sobre un efecto estrogénico de este efluente.

Aspectos ováricos cualitativos y cuantitativos

No se observaron alteraciones ováricas cualitativas indicadoras de efecto frente a la exposición al efluente urbano tales como ova-testis o aumento de la atresia folicular. La exposición a altas dosis de estrógenos afecta la atresia folicular (Wolf et al. 2004). Las bajas concentraciones de los compuestos químicos presentes en el efluente urbano (Miguez 2013) (Anexo I) que podrían inducir anomalías en el desarrollo ovárico o las interacciones antagónicas entre ellos, explicarían la ausencia de estas.

El agua superficial del arroyo Fray Bentos tuvo un efecto nivel de producción de los óvulos, constatando la producción del doble de su respectivo grupo control, aunque dicho aumento no fue significativo ($p > 0,05$). Se trata de un efecto de tipo estrogénico como se observó en el experimento E2-150.

El efecto estrogénico en esta matriz que recibe la descarga de los efluentes cloacales de Fray Bentos y que posee compuestos químicos de capacidad estrogénica, puede deberse a la contribución individual de cada uno o a la interacción entre estos. Los estrógenos presentes en esta matriz pueden interactuar con los receptores de estrógeno de membrana o nucleares teniendo efectos sobre la activación o supresión a varios niveles del eje hipotálamo – hipófisis – gónada, alterando de esta manera la producción de óvulos y su puesta. A su vez, la

producción de estradiol puede también ser aumentada debido a que la aromatasa es susceptible a perturbadores endócrinos (Cheshenko et al. 2008). Filby et al. (2007) demostraron en *Pimephales promelas* que hay supra-regulación de la expresión ovárica del gen *cyp19* que codifica para la enzima aromatasa cuando hay exposición a efluentes urbanos estrogenizantes y una mezcla compleja de estrógenos (17 β -estradiol - 17 α -etinilestradiol).

La dinámica hídrica y pluvial que afectan al arroyo Fray Bentos y las características temporales de la descarga del efluente cloacal sobre el arroyo Fray Bentos podrían sinergizar o antagonizar la interacción de los compuestos estrogénicos que fueron analizados y de otros compuestos químicos presentes en el arroyo que no fueron considerados y que podrían alterar la producción de óvulos.

Efluente Industrial

No se observaron cambios en la talla, el peso, el IGS y los tubérculos nupciales. A su vez, tampoco se observaron alteraciones en la estructura de los testículos u ovarios. Hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de óvulos puestos del 54% respecto al grupo control.

Crecimiento

Los valores de longitud y peso hallados de *Pimephales promelas* frente a la exposición del efluente industrial no fueron alterados ni en machos ni en hembras. Estos valores corresponden con los normalmente encontrados para la especie (Watanabe et al. 2007).

El análisis de compuestos químicos del efluente industrial de producción de pulpa de celulosa utilizado en este estudio demostró la presencia de los compuestos estrogénicos estradiol, estrona, 4-nonilfenol y para-ter-octilfenol (Miguez 2013)(Anexo I). Los compuestos estrogénicos pueden regular negativamente el eje GH/IGF-1, comprometiendo de esta manera el crecimiento (Lerner et al. 2012).

Kovacs et al. (2013) no encontró diferencias en el crecimiento frente a la exposición por 5 días de adultos de *P. promelas* a efluentes industriales de producción de pulpa de celulosa. Parrot et al. (2004) con un diseño experimental de ciclo de vida, comenzando en la etapa embrionaria, demostró efectos en el crecimiento inducidos por efluentes industriales de producción de pulpa de celulosa. Las alteraciones en las funciones endócrinas en el desarrollo temprano de un organismo pueden tener implicancias en muchos procesos fisiológicos de etapas posteriores (Warner et al. 2007) como el crecimiento.

Los resultados hallados en esta investigación son similares a los de Kovacs et al. (2013) sin embargo, la posibilidad de afectar el

crecimiento en embriones de *P. promelas* por efluentes de producción de pulpa de celulosa está demostrada (Parrot et al. 2004). Por lo tanto considerar un diseño experimental de ciclo de vida iniciándose en etapas embrionarias podría dilucidar efectos sobre el crecimiento en este pez.

Aspectos testiculares cualitativos y cuantitativos

No se encontraron anomalías o alteraciones en los testículos de los peces que fueron expuestos al efluente industrial. La dosis de 17β -estradiol reportados que producen alteraciones en las poblaciones celulares testiculares de *Pimephales promelas* fue de 2750 ng l^{-1} (Miles-Richardson et al. 1998, Wolf et al. 2004). La metiltestosterona, un potente agonista de andrógenos, indujo un epitelio germinal muy delgado y actividad espermatogénica dispersa en los machos de *P. promelas* expuestos (Ankley et al. 2001). Los compuestos químicos que fueron caracterizados en el efluente industrial (Miguez 2013), han demostrado poseer capacidad de alterar variables reproductivas en *P. promelas* como la reducción de los tubérculos nupciales e inducir cambios a nivel testicular como la proliferación de las células de Sertoli y restos celulares en los túbulos espermáticos (Miles-Richardson et al. 1998, 1999). La ausencia de anomalías testiculares se debería a los bajos niveles de estos compuestos químicos en el efluente industrial o a la posible interacción antagonista de estos que pueda minimizar sus

efectos.

En ensayos de ciclo de vida autores como Parrott et al. (2004, 2005) han descrito efectos adversos de los efluentes de plantas de producción de pulpa de celulosa sobre la gónada y la producción de óvulos en *P. promelas*. Nuestro diseño experimental de 21 días y con ejemplares adultos es distinto al usado por Parrott et al. (2004) y tal vez explique la ausencia de anomalías macroscópicas e histopatológicas gonadales.

Aspectos ováricos cualitativos y cuantitativos

El efluente industrial presentó un efecto de disminución en el número de óvulos puestos y esa reducción fue del 54% y estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Numerosos estudios previos sostienen que los efluentes de plantas de producción de pulpa de celulosa afectan la producción de óvulos en *P. promelas* (Hewitt et al. 2008) e inclusive alteran y disminuyen la puesta de óvulos (Parrott et al. 2004, Popesku et al. 2010, Werner et al. 2010, Kovacs et al. 2013 y Waye et al. 2014).

Ankley et al. (2001) demostró que la producción de óvulos de *P. promelas* frente a compuestos estrogénicos y androgénicos en altas dosis es afectada negativamente. El análisis de compuestos químicos estrogénicos en el efluente industrial (Miguez 2013) mostró a 4-

nonilfenol, un alquilfenol utilizado en procesos industriales, en concentraciones que han producido efectos negativos sobre la gónada de *P. promelas* (Miles-Richardson et al. 1999) y sobre la puesta de óvulos (Giesy et al. 2000). El 4-nonilfenol es un agonista estrogénico débil con capacidad de imitar a los estrógenos por su acción directa sobre los receptores de estrógeno (Giesy et al. 2000). El efluente industrial resultante de la producción de pulpa de celulosa puede estar ejerciendo sobre el eje HPG de *P. promelas* efectos de disrupción endócrina disminuyendo la puesta de óvulos.

Estudios recientes muestran una relación entre la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en efluentes de plantas de producción de pulpa de celulosa con la puesta de óvulos de *P. promelas*. Valores mayores a 20 mg L⁻¹ de DBO tienen un mayor potencial de afectar la cantidad de óvulos producidos (Kovacs et al. 2013). El valor de DBO obtenido para el efluente industrial utilizado en esta investigación (Miguez 2013)(Anexo II) fue menor al valor estimado por Kovacs et al. (2013). No obstante, nuestros resultados demostraron que se vio afectada negativamente la producción de óvulos. Kovacs et al. (2013) también encontraron efluentes de este tipo capaces de afectar la producción de óvulos con valores de DBO menores a los que sugiere como probables de afectar este parámetro reproductivo y concluye que

las razones por las cuales estos efluentes afectan la reproducción de peces no está resuelto aún.

Popesku et al. (2010) postulan que las hembras de *P. promelas* expuestas a efluentes derivados de la producción de pulpa de celulosa son capaces de producir óvulos pero incapaces de ovular. Postularon que las sustancias que estos efluentes poseen afectan vías sensibles de dopamina en el cerebro de los mismos.

Los numerosos compuestos químicos que esta matriz posee y la capacidad de interacción entre ellos explicarían la alteración en la producción de óvulos aunque no dilucida la vía por la cual la produce.

El eje Hipotálamo – Pituitaria – Gónada, HPG, es un sistema altamente dinámico. Responde a estresores ambientales incluyendo a los contaminantes a través de varios mecanismos de retroalimentación manteniendo las condiciones que llevan a la reproducción. Estas respuestas compensatorias pueden ocurrir durante la exposición al agente estresor o una vez finalizada (Ankley et al. 2009). El estudio de los modos de acción de los compuestos químicos sobre el eje HPG y con el uso de nuevos enfoques de investigación como la genómica y la transcriptómica en ensayos validados en especies referentes como *Pimephales promelas* y otras permitirán establecer enfoques integrales de las respuestas de los organismos a los contaminantes ambientales.

CONCLUSIONES

1. No se observaron alteraciones cualitativas a nivel gonadal frente a las dos dosis de estradiol ensayadas (150 y 450 ng l⁻¹), ni frente al efluente urbano (arroyo Fray Bentos) ni al industrial.
2. La dosis de 17β-estradiol (150ngl⁻¹) indujo una disminución significativa (p<0.05) del 42% en el número de espermatozoides y un aumento significativo (p<0.05) del 50% en los óvulos liberados.
3. El único efecto significativo observado en el efluente urbano fue la disminución ligera en la talla de los machos.
4. El efluente industrial indujo una disminución significativa (p<0.05) del 50% en el número de óvulos liberados, siendo este el comportamiento contrario al observado cuando se usaron estrógenos.
5. El efluente industrial afecta a un parámetro reproductivo fundamental como el número de óvulos emitidos. Pudiendo tener efectos poblacionales de comprobarse efectos similares en el estudio con especies de peces nativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ankley, G.; Jensen K, Kahl M, Korte J & Makynen E. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Env. Tox. Chem.* 20(6)1276-1290.
- Ankley, G. Kahl, A. Jensen, K. Hornung, M. Korte, A. Makynen, E. and Leino, R. 2002. Evaluation of the Aromatase Inhibitor Flutamide in a short Term Reproduction Assay with the Fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Tox. Sci.* 67:121-130.
- Ankley, GT, Villeneuve DL; 2006. The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future. *Aquat. Toxicol.* 78 91–102.
- Ankley, G.T, Bencic, D.C., Breen, MS, Collette, TW, Conolly, RB, Denslow, ND, Edwards, SW, Ekman, DR, Garcia-Reyero., N, Jensen, KM, Lazorchak, JM, MartinoviC, D., Miller, DH, Perkins, EJ, Orlando, EF, Villeneuve, DL, Wang, RL; Watanabe, K. 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat. Toxicol.* 92 168–178.
- Arukwe, A & Goksoyr, G. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population and evolutionary implications for endocrine disruption. *Comp. Hepat.* 2

- Bergman A, Heindel J, Jobling S, Kidd K & Zoeller T. 2012. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. World Health Organisation (WHO). ISBN:978 92 4 150503 1.
- Bernanke, J. y Kohler, H. The impact of Environmental Chemicals on Wildlife Vertebrates. Rev. Env. Conta. Toxicol. 198:1-47.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). Repro. Nut. Develop. 26(4):877-920.
- Borg B. 1994. Androgens in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 109C(3):219-245.
- Cheshenko, K. Pakdel, F. Segner, H. Kah, O & Eggen, R. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. 2008. Gen. Comp. Endocrin. 155:31-62.
- Chiang, MW & Au, DW. 2013. Histopathological approaches in ecotoxicology. En: Encyclopedia of aquatic ecotoxicology. Eds.: Féraud JF & Blaise C. Springer NY, 1222 pp.
- Damman A, Shappell N, Bartell S & Schoenfuss, H. 2011. Comparing biological effects and potencies of estrone and 17 β -estradiol in mature Fathead minnows, *Pimephales promelas*. Aquat. Toxicol. 105:559-568.
- Denslow, N. y Sepúlveda, M. 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. En: The Fish

- Oocyte. From basic studies to biotechnological applications. Eds: Babin, P.; Cerdá, J. y Lubsenz, E. Springer, The Netherlands. 513pp.
- Dietrich, D. & Krieger, O. 2009. Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish. Wiley, NJ USA. 319pp.
 - Filby, A.; Neuparth, T.; Thorpe, K.; Owen, R.; Galloway, T. y Tyler, C. 2007. Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Env. Hea. Pers.* 115(12):1704-1710.
 - Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B & Zohar Y. 1983. The gonadal steroids. En: *Fish Physiology, Volumen IX, Reproduction, Part A*. Eds: Hoar W, Randall D & Donaldson E. Academic press, NY. 475 pp.
 - Giesy J, Pierens S, Snyder E, Miles-Richardson S, Kramer V, Snyder S, Nichols K & Villeneuve D. 2000. Effects of 4-nonilphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19(5):1368-1377.
 - Gregory, M.; Aravindakshan, J.; Nadzialek, S y Cyr, D. Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Testicular Functions. 2007. En: *Fish Spermatology*. Eds: Hadi, S. Alpha Science International. Oxford, UK.
 - Grier, H. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. En: *The Sertoli cell*. Eds: Rusell, L. & Grsiwold, M. Cache River press, Clearwater. 703-739.

- Grier & Lo Nostro 1999. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish: Institute of Marine Research and University of Bergen.
- Halm, S. Pounds, N. Maddix, S. Rand-Weaver, M. Sumpter, J. Hutchinson, T & Tyler, C. 2002. Exposure to exogenous 17 β -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult Fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 60:285-299.
- Heindel J, Zoeller T, Jobling S, Iguchi T, Vandenberg L y Woodruff T. 2012. En: State of the science of endocrine disrupting chemicals. Eds: Bergman A, Heindel J, Jobling S, Kidd K y Zoeller T. World Health Organisation (WHO). ISBN:978 92 4 150503 1.
- Hewitt, M.; Kovacs, T.; Dubé, M.; MacLatchy, D.; Martel, P.; McMaster, M.; Paice, M.; Parrott, J.; Van den Heuvel, M. y Van der Kraak, G. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Env. Tox. Chem.* 27(3):682-697.
- Hickman C, Roberts L y Larson A. 2001. Integrated principles of Zoology. 11 Ed. Mac Graw-Hill. NY. 899pp.
- Hutchinson T, Ankley G, Segner & Tyler C. 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish. Biomarkers as "signspots", not "traffic lights" in risk assessment. *Env. Hea. Persp.* 114(1):106- 114.

- Hyndman K, Biales A, Bartell S & Schoenfuss H. 2010. Assessing the effects of exposure timing on biomarker expression using 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.* 96:264-272.
- Jensen KM, K. J. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Phys.* 128 C 127-141.
- Jensen, K. Kahl, A. Makynen, E. Korte, A. Leino, R. Butterworth, B. and Ankley, G. 2004. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 70, 99–110.
- Kah O, Anglade I, Lepretre E, Dubuorg P y de Monbrison D. The reproductive brain in fish. 1993. *Fish Physiology and biochemistry* 11, 1-6. 85-98.
- Keel, K. 2012. Disruptores endócrinos: Efectos en peces *Pimephales promelas*. Tesis para obtener el título de magister en biología celular y molecular. Facultad de Ciencias, Uruguay.
- Kovacs, T. Martel, P. O'connor, B. Hewitt, M. Parrott, J. Mc Master, M. Maclatchy, D. Van der Kraak, G & Van den Heuvel, M. 2013. A survey of Canadian mechanical pulp and paper mill effluents. Insights concerning the potential to affect fish reproduction. *Environ. Sci. Health. Part A.* 48:1178-1189.

- Leino, R. Jensen, K. & Ankley, G. 2005. Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ. Toxicol. Pharmacol. 19 (1) 85–98.
- Lerner D, Sheridan M & Mc Cormick S. 2012. Estrogenic compounds decrease growth hormone receptor abundance and alter osmoregulation in Atlantic salmon. Gen. Comp. Endocrin. 179:196-204.
- Lubzens, E., Young, G., Bobé, J. & Cerdá, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. Gen. Comp. Endo. 165:367-389.
- Marlat V, Bonnie L, Ornostay A, Hogan N, Kennedy C, Elphick J & Martyniuk C. 2013. The effects of urea based herbicide linuron on reproductive endpoints in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Comp. Biochem. Phys. Part c. 157:24-32.
- McMaster, E. Hewitt, M. Parrott, J. 2006. A Decade of Research on the Environmental Impacts of Pulp and Paper Mill Effluents in Canada: Field Studies and Mechanistic Research J. Toxicol. Environ. Health. B 9 (4) 319—339.
- Miguez, D. 2013. Integrated risk assesment of endocrine disruptors in the Uruguay river. Tesis de doctorado, School of applied sciences - Cranfield water science institute.

- Mihaich, E.; Rhodes, J.; Wolf, J.; Van der Hoeven, N.; Dietrich, D.; Hall, T.; Caspers, N.; Ortego, L.; Staples, C.; Dimond, S. y Hentges, S. Adult fathead minnow, *Pimephales promelas*, partial life-cycle reproductive and gonadal histopathology study with bisphenol A. 2012. *Env. Toxicol. Chem.* 31(11) 2525-2535.
- Miles-richardson, S. Pierens, S. Nichols, K. Kramer, V. Snyder, E. Snyder, S. Render, J. Fitzgerald, S. Giesy, J. 1999. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Res* 80(2) 122-137.
- Miles Richardson, S. Kramer, V. Fitzgerald, S. Render, J. Yamini, B. Barbee, S. Giesy, J. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47: 129-145.
- Miura, T. Miura, C. Ohta, T. Nader, M. Todo, T. & Yamauchi, K. 1999. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males.
- Muñoz Cueto, J. 2005. Control hormonal de la reproducción de peces. Cadiz, España: Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.
- Nagahama Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish Physiology*, Volumen IX, Reproduction, Part A. Eds: Hoar W, Randall D & Donaldson E. Academic press, NY. 475 pp.

- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38:217-229.
- Nagahama Y & Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop. Growth Differ.* 50:195-219.
- Nichols, K.; Miles-Richardson, R.; Snyder, E. y Giesy, J. 1999. Effects of exposure to municipal wastewater in situ on the reproductive physiology of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Env. Tox. Chem.* 18(9) 2001–2012.
- OECD. 2007. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.Revised draft OECD guideline for the testing of chemicals.
- OECD 2009. OECD Guidance document for the diagnosis of endocrine related histopathology of fish gonads.
- Page, LM & Burr, BM. 2011. Peterson field guide to freshwater fishes of North America North of Mexico. Houghton Mifflin Harcourt NY. 663pp.
- Panter, G. Thompson, R. & Sumpter, J. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to

environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat. Toxicol.* 42 243–253

- Panter G, Thompson R & Sumpter J. 2000. Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environ. Sci. Technol.* 34:2756-2760.
- Parrott, J. Wood, C. Boutot, P. & Dunn, S. 2004. Changes in growth and secondary sex characteristics of fathead minnows exposed to bleached sulphite mill effluent. *Environ. Toxicol.Chem.* 22(12) 2908-2915.
- Parrott, J. 2005. Overview of methodology and endpoints in Fathead minnow lifecycle test assessing pulp and paper mill effluents. *Wat. Qual. Res. Can.* 40(3):334-346.
- Peter, R. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. En: *Fish Physiology, Volumen IX, Reproduction, Part A*. Eds: Hoar W, Randall D & Donaldson E. Academic press, NY. 475 pp.
- Popesku, J. Tan, E. Martel, P. Kovacs, T. Rowan-Carroll, A. Williams, A. Yauk, C. & Troudeau, V. 2010. Gene expression profiling of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) neuroendocrine brain in response to pulp and paper mill effluents. *Aquat. Toxicol.* 99:379-388.
- Raven P y Jhonson G 2001. *Biology*. 6^o Ed. Mc Graw-Hill. 1240 pp.
- Querat, B. Sellouk, A. & Salmon, C. 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of

sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. Biol. Rep. 63:222-228.

- Reddy, P y Rawat, S. 2013. Assesment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol. Inter. Res. Jour. Env. Sci. 2(8) 79 – 82.
- Rickwood, C. Dubé, M. Hewitt, M. Kovacs, T. & MacLatchy, D. 2006. Use of paired Fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproductive test. Part 2. Source identification of biological effects at a bleached kraft pulp mill. Environ. Tox. Chem. 25(7):1847-1856.
- Saona, G, Carnikian, A. Spósito, M. Baklayan, P & Espínola, J. 2015. Sensibilidad de los bioensayos de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas* en una serie de muestras de efluentes y tóxicos de referencia. Innotec. 10:49-55.
- Schulz, W., Franca, R., Lareyre, J., Le-Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. & Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. Gen. Comp. Endocrin. 165:390-411.
- Segner, H.; Caroll, K.; Fenske, M.; Janssen, C.; Maack, G.; Pascoe, D.; Schafers, C.; Vanderbergh, G.; Watts, M. y Wenzel, A. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA Project. 2003. Ecotox. Environ. Safety. 54:302-314.

- Shappell, N. Hyndman, K. Bartell, S. & Schoenfuss. 2010. Comparative biological effects and potency of 17 α - and 17 β -estradiol in fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 100:1-8.
- Skolness, S. Blanksma, C. Cavallin, J. Churchill, J. Durhan, E. Jensen, K. Jhonson, R. Kahl, M. Makynen, E. Villeneuve, D & Ankley, G. 2013. Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the Fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Tox. Sci.* Doi:10.1093/toxsci/kft010.
- Sokal, R. Rohlf, F. 1996. *Introduction to Biostatistics*. W. H. Freeman & Co., Reading , 1996.
- Swanson, P. 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In *Proceedings of the IVth international symposium on reproductive physiology of fish*. Eds: Scott, A. Sumpter, J. Kime, D & Rolfe M.
- Taylor L & Scroggins R. 2013. Biological test methods in ecotoxicology. En: *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology*. Eds.: Férard JF & Blaise C. Springer NY, 1222 pp.
- Tetreault, G. Bennett, C. Cheng, C, Servos, M. & Mc Master, M. 2012. Reproductive and histopathological effects in wildfish inhabiting an effluent-dominated stream, Wascana Creek, SK, Canada. *Aquat. Toxicol.* 110-111:149-161

- Thorpe K., Maack G., Benstead G & Tyler C. 2009. Estrogenic wastewater treatment work effluents reduce egg production in fish. *Environ. Sci. Technol.* 43:2976-2982.
- Tillit, D.; Papoulias, D.; Whyte, J. y Richter, C. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 99:149-159.
- Todorov, J.; Elskus, A.; Schlenk, D.; Lee Ferguson, P.; Brownawell, B. y McElroy, A. 2002. Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) exposed to New York city sewage effluent. *Mar. Env. Res.* 54:691-695.
- USEPA. 1988. Guidelines for the culture of Fathead minnows, *Pimephales promelas* for use in toxicity tests. EPA/600/S3-87/001. pp 4.
- USEPA. 2002a. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Fifth edition. Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460. EPA/821/R-02/012.
- USEPA. 2002a. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth edition. Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460. EPA/821/R-02/013.

- USEPA 2002. A Short-term Test Method for Assessing the Reproductive Toxicity of Endocrine-Disrupting Chemicals Using the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). EPA 600/R-01-067, pp. 141, 144.
- USEPA 2006. Histopathology guidelines for the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) 21-day reproduction assay. 59 pp. USEPA 2007.
- Vajda, A. Barber, L. Grayb, J. Lopez, E. Boldena, A. Schoenfuss, H. Norris, D. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. 2013. *Aquat. Tox.* 103:213-221.
- Van der ven, I.; Wester, P. y Vos, J. 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Env. Toxicol. Chem.* 22(4) 908-913.
- Van der Kraak, G. 2009. The GnRH system and the neuroendocrine regulation of reproduction. En: *Fish Neuroendocrinology*. Eds: Bernier, N. Van der Kraak, G. Farrell, A. & Brauner, C. Elsevier, San Diego, USA. 537pp.
- Villeneuve, D. Blake, L. Brodin, J. Cavallin, J. Durhan, E. Jensen, K. Kahl, M, Makynen, E. Martinovic, D. Mueller, N & Ankley, G. 2008. Effects of a 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibitor, Trilostane, on the Fathead Minnow Reproductive Axis. *Tox. Sci.* 104(1):113-123.

- Vizziano, D. Baron, D. Randuineau, G. Mahe, S. Cauty C & Guiguen, Y. 2008. Rainbow Trout Gonadal Masculinization Induced by Inhibition of Estrogen Synthesis Is More Physiological Than Masculinization Induced by Androgen Supplementation. *Biol.Reprod.* 78: 939-946.
- Watanabe, K., Jensen, K., Orlando, K. & Ankley, G. 2007. What is normal? A characterization of the values and variability in reproductive endpoints in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Comp. Bio. Phys. Part C.* 146:348-356.
- Waye A, Lado W, Martel P, Arnason J & Trudeau V. 2014. Ovulation but not mill production is inhibited in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to a reproductively inhibitory pulp mill effluent. *Repro. Biol. Endocrin.* 12:43.
- Werner, J. Ouellet, J. Cheng, C. Ju, Y. & Law, D. 2010. Pulp and paper mills effluents induce distinct gene expression changes linked to androgenic and estrogenic responses in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 29(2):430-439.
- Wolf, J., Dietrich, R., Friederich, U., Caunter, J., Brown, A. 2004. Qualitative and quantitative histomorphologic assessment of fathead minnow, *Pimephales promelas* gonads as an endpoint for evaluating endocrine-active compounds: a pilot methodology study. *Toxicol Pathol* 32: 600-612.

- Yonkos, L.; Fisher, D.; Reimschuessel, R. y Kane, A. 2000. Atlas of fathead minnow normal histology. Aquatic Pathobiology Laboratory (<http://aquaticpath.epi.ufl.edu/fhm>).

Páginas web

<http://physiologyonline.physiology.org/content/26/6/412>

<http://www.upm.com/uy>

<http://www.ufaw.org.uk/pubs>

<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

<http://www.latu.org.uy>

Anexo I

Esquema de procesamiento de tejidos para su inclusión en parafina y tinción en hematoxilina y eosina. Tomado de USEPA 2006.

Station No.	Reagent	Pressure/ Vacuum Cycle	Heat (°C)	GONAD PROGRAM (minutes)	WHOLE-FISH PROGRAM (minutes)
1	10% NBF ^a	On	Ambient	40	60
2	70% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
3	80% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
4	95% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
5	95% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
6	100% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
7	100% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
8	100% ethyl alcohol	On	Ambient	40	60
9	Clear Rite 3	On	Ambient	60	80
10	Clear Rite 3	On	Ambient	60	80
11	Paraffin	On	60	45(60 ^b)	75(100 ^b)
12	Paraffin	On	60	45(60 ^b)	75(100 ^b)
13	Paraffin	On	60	45(60 ^b)	75(100 ^b)
14	Paraffin	On	60	45	75
Drain and Clean Cycle ^c					

Reagent	Minutes in Reagent	Reagent Maintenance	
		After 1 st Run	After 2 nd Run
Xylene	4	Remove	Remove
Absolute Alcohol	2	Remove	Remove
80% Alcohol	1	Renew	Renew
Water	1	---	---
Hematoxylin	3	---	Remove
Water	2	---	---
Clarifier	1	Renew	Renew
Water	1	---	---
Bluing	1	Renew	Renew
Water	2	---	---
95% Alcohol	1	Renew	Renew
Eosin	1	---	Renew
Absolute Alcohol	4	Remove	Remove
Xylene	3	Remove	Remove

Anexo II

Caracterización fisicoquímica de las muestras

Los ensayos para la caracterización fisicoquímica de las muestras fueron realizados mayormente en LATU y otros fueron enviados a laboratorios del exterior. Los métodos y normas utilizados fueron los siguientes:

- pH- PEC.PQAR.101 basado en APHA 4500 H
- Grasas y aceites- PEC.PQAR.007 basado en APHA 5520 D
- Cianuros- PEC.PQAR.602 basado en EPA 335.4
- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)- PEC.PQAR.010 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.PQAR.604 basado en ISO 9562:2004
- Carbono orgánico total (como NPOC)- PEC.PQAR605 basado en norma ISO 8245:1999
- Tensioactivos aniónicos (MBAS): sustancias activas al azul de metileno- APHA 5540 C
- Sulfuros- APHA 4500 S D
- Amonio- PEC.PQAR.612 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*- PEC.PQAR.616 basado en EPA 821-R-02-012. Test method 2000.0
- Toxicidad aguda (*Daphnia magna*)- PEC.PQAR.607 basado en EPS 1/RM/14
- Toxicidad aguda (*Vibrio fischeri*)
- Conductividad PEC.PQAR.112 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 >18M Ω), (equipo de purificación de agua - Milipore Simplicity 185).

	Efluente Industrial	Efluente Urbano
Sulfuros (Como S) (mg/l) (LD: 0,1 mg/l)	ND	-
Amonio (como N) (mg/l) (LD: 0,01 mg/l)	30 μ g/L	ND
Grasas y aceites (mg/l) (LD: 5 mg/l)	ND	ND
AOX (como Cl) (μ g/l) (LD: 10 mg/l)	1,94	<17 μ g/L
Fenoles (como C ₅ H ₆ OH) (LD: 1 μ g/l)	3,77	-
Tensioactivos aniónicos (como LAS) (LD: 14 μ g/L)	53,9 μ g/L	ND
cDBO ₅ (como O ₂) (mg/l)	18	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 <i>Pimephales promelas</i> CL ₅₀ _{96hs}	>100%	>100%
Toxicidad aguda <i>Daphnia magna</i> CL ₅₀ _{48hs}	>100%	>100%
Toxicidad aguda Vibrio	>100%	-
pH	7,77	7,44
Turbiedad (NTU)	-	11
Color (unidadPt-Co)	375	43
Cianuro (Como CN) (μ g/L) (LD: 4 μ g/L)	ND	<5
Carbono orgánico total (como C) (mg/l)	-	10,4
Oxígeno disuelto (como O ₂) (mg/l)	-	7,41
Conductividad (ms/cm)	346	-
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) (μ g/l)	<100	<1
Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) (μ g/l)	28	2,7
4-para-nonilfenol (μ g/l)	44	8,3
Para-tert-octilfenol(μ g/l)	0,19	12
Estrona (E1)	3,5 pg/L	2,2 ng/L

Estradiol (E2)	1,2 pg/L	0,6 ng/L
Estriol (E3)	ND	1 ng/L
Etinil estradiol (EE2) (ng/l)	-	< 0,2
E1-3S (ng/l)	-	0,5
Bisfenol A (BPA) (ng/l)	-	< 1

ND: No detectable