

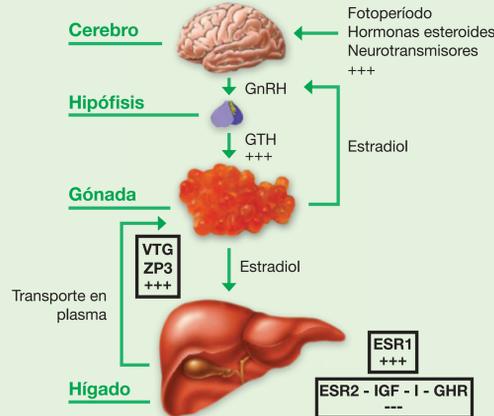
Introducción

Los **disruptores endócrinos** son agentes exógenos que causan alteraciones a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, interfiriendo con el funcionamiento del sistema endócrino de seres vivos. Dichos compuestos actúan como agonistas o antagonistas interactuando con los receptores hormonales, potenciando o atenuando su reacción. Las fuentes pueden ser de origen natural (feromonas y fitoestrógenos) o artificial (insecticidas, herbicidas, plásticos, surfactantes, artículos de cosmética, píldoras anticonceptivas, filtros UV).

Los **disruptores con acción estrogénica** pueden interactuar con receptores de estrógenos (ESR1) presentes en hígados de peces machos y hembras. Induciendo el incremento de ESR1 y provocando en ambos sexos un aumento de ARNm de ciertos genes, tales como: vitelogenina (VTG) y proteínas de la zona radiata (ZP3); no expresados en machos en condiciones normales. Por el contrario, dichas sustancias tienen la capacidad de promover en el hígado, la disminución de ARNm de otro tipo de receptor de estrógenos (ESR2), de receptores de la hormona de crecimiento (GHR) y factores de crecimiento tal como IGF-I, altamente expresados en machos.

Las sustancias con **efectos disruptores androgénicos o antiestrogénicos**, producen efectos contrarios a los estrógenos, disminuyendo en hembras los altos niveles de ARNm de VTG y ZP3 y aumentando ESR2, GHR e IGF-I.

Actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y acción de hormonas esteroideas



Objetivo

En este trabajo se evaluó la presencia de acción disruptora en agua proveniente de Arroyo Fray Bentos al cual derivan efluentes cloacales de dicha ciudad y en efluente industrial de una planta de pulpa de celulosa próxima a esta ciudad.

Metodología

Los ejemplares de *Pimephales promelas* que se utilizaron fueron criados en el laboratorio de Aguas y Productos Químicos del LATU. Se realizó un bioensayo de exposición de 21 días con *Pimephales promelas* a las muestras de Arroyo Fray Bentos y al efluente industrial de planta de celulosa con tratamiento secundario, se incluyeron controles de 17β-Estradiol de 150 y 450 ng/l.

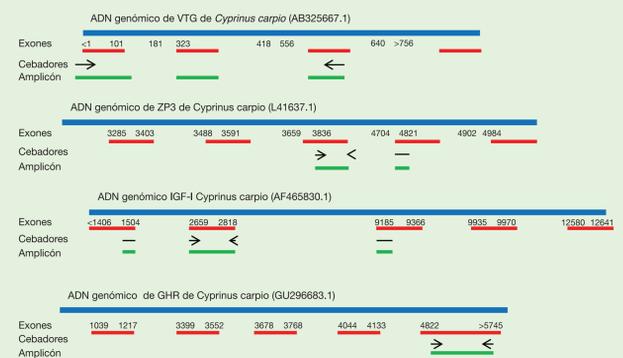


Condiciones ambientales para exposición de <i>Pimephales promelas</i>	
Muestras ensayadas	Agua de Arroyo Fray Bentos (33° 07'16" S, 58° 19' 02" W) Efluente industrial planta de pulpa de celulosa 17.8 Estradiol 150 ng/l 17.8 Estradiol 450 ng/l
Estado de vida	Adultos (6-7 meses)
Tiempo de exposición	21 días
N° Individuos/pecera	2 machos: 4 hembras
Régimen	Semiestático, renovación del 90% del volumen cada 48 h
Temperatura	25 ± 2°C
Fotoperíodo	16 luz: 8 oscuridad horas
Réplicas	Triplicados
Volumen de agua en los acuarios	8 litros
Alimentación	Artemia sp, 1 vez al día Escamas "Tetra"® 2 veces al día
Obtención de las muestras	Inclisión cervical y muerte Diseción para obtención de hígado

Se extrajo ARN y se realizó una retrotranscripción. Los valores de ADN copia objetivo se normalizaron frente al gen control 18S utilizando Sybrgreen como agente fluorointercalante. El termociclador utilizado fue: Corbett Life Science Rotor-gene 6000 (Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur-Montevideo).

Enzima	Condiciones de transcripciones	
	Retrotranscripción	PCR en tiempo real
	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Invitrogen)	ADN polimerasa "Light Cycler SYBR Green I Master" (Roche)
Activación de la ADN polimerasa	—	95°C - 10 minutos
Desnaturalización de ADN	—	94°C - 10 segundos
Pegado de cebadores	25°C - 10 minutos	Temperatura de hibridación: 20 segundos
Extensión	37°C - 50 minutos	72°C - 20 segundos
Inactivación de la reacción	70°C - 15 minutos	—
Extensión final	—	72°C - 7 minutos

Diseño de cebadores



El ADN genómico se representa en color azul, los exones con sus respectivos números de pares de bases en color rojo, los cebadores en negro y el amplificador obtenido luego de la PCR en verde.

Se verificó concentración e integridad del ARN extraído. Se realizaron controles negativos de Retrotranscripción y de PCR. La puesta a punto de la reacción de amplificación se realizó por PCR en tiempo final. Se verificó por PCR en tiempo real la buena eficiencia de reacción de cada par de cebadores y que la misma fuera similar entre los respectivos pares y los de 18S (diferencia menor a 0,02). Se corroboró la inexistencia de ADN genómico en las muestras, utilizando cebadores diseñados para hibridar en exones diferentes y/o utilizando el ARN extraído y ADN genómico como molde en reacciones de amplificación.

Bibliografía

- Biales, A.D., Bencic D.D., Flick R.W., Lazorchak J and Lattier D.L. Environmental Toxicology and Chemistry, 26 (2007): 287-296.
- Filby A., y Tyler C. General and Comparative Endocrinology, 150 (2007): 151-163.
- Warner, J., Rose, J., Karmaus C., Landgraf, R., Taffe, B. Science of the Total Environment 414 (2012): 81-89.
- Werner, J., Ouellet C., Young-Jun, C y Law, R. Environmental toxicology and chemistry 29, nº 2 (2010): 430-439.

Agradecimientos

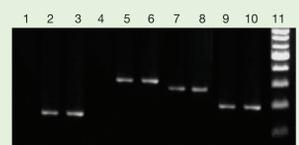
Lic. Agustín Carnikian
PCAR- LATU
Personal de la Unidad de Biología molecular de Instituto Pasteur Montevideo
Personal del Departamento de Aguas del LATU

Resultados y Discusión

PCR en tiempo real - Expresión relativa en Hembras

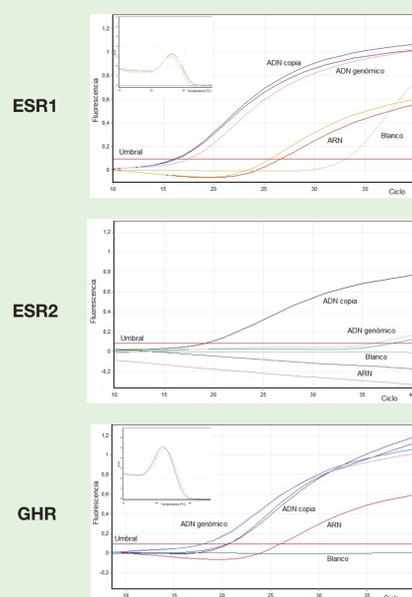


Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de los productos de amplificación, por PCR en tiempo final, con los cebadores correspondientes a los genes: ESR1, IGF-I, 18S y VTG.



Se muestra en carril 1 blanco de PCR de ESR1, en carriles 2 y 3 ESR1, carril 4 blanco de PCR de VTG, carriles 5 y 6 18S, carriles 7 y 8 VTG, carriles 9 y 10 IGF-I y carril 11 marcador de pb 100 pb ladder de Invitrogen. Los pares de bases de las bandas obtenidas fueron los esperados: VTG 279 pb, ESR1 187pb, IGF-I 190 pb y 18S 324pb.

Curvas de amplificación para PCR en tiempo real



Los gráficos más chicos sobre ESR1 y GHR corresponden a los gráficos de fusión de los productos de amplificación a partir de ADN copia y ADN genómico.

La exposición de *Pimephales promelas* frente al agua de arroyo produjo en machos efectos similares a la exposición a estradiol en cuanto a la expresión de ARNm de genes como: ZP3, ESR1 e IGF-I. Induciendo además tendencia a la disminución de ARNm de ESR2 en hembras.

Por el contrario, el efluente industrial provocó efectos opuestos a los del estradiol en los niveles de ARNm de ESR1, ESR2, IGF-I y GHR. Los resultados observados para esta muestra admiten características opuestas a las estrogénicas, pudiendo tener efecto antiestrogénico o androgénico.

Conclusiones

- El Arroyo Fray Bentos mostró actividad estrogénica en la expresión de ARNm de: ZP3, ESR1 e IGF-I.
- El efluente industrial mostró actividad androgénica o antiestrogénica sobre ARNm de: ESR1, ESR2, IGF-I y GHR.
- La cuantificación de ARNm del gen de VTG es buen indicador de estrogénicidad en ambos sexos.
- La cuantificación de ARNm de GHR e IGF-I es un buen indicador de estrogénicidad en machos.
- La cuantificación de ARNm de GHR, IGF-I y ESR2 es un posible buen indicador de antiestrogénicidad o androgenidad en ambos sexos

PCR en tiempo real - Expresión relativa en Machos



Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre controles y expuestos, * p valor <0.05 y ** p valor < 0.01