

5. DISCUSIÓN

Una vasta cantidad de compuestos con actividad estrogénica ha sido liberada al ambiente en las últimas décadas, principalmente bajo la forma de pesticidas de uso agrícola y químicos industriales (Danzo, 1998). Prácticamente todos estos compuestos entran en contacto con los sistemas acuáticos, ya sea por aspersión directa o por lavado pluvial de los campos sembrados en el caso de los pesticidas, o por volcado directo de efluentes en el caso de los compuestos químicos industriales, convirtiendo a los organismos acuáticos en los primeros blancos de acción. Como resultado, esta población de individuos se torna especialmente adecuada para la selección de biomarcadores en especies animales que actúen como centinelas. Esta selección es de vital importancia para llevar a cabo el estudio de los potenciales efectos de la contaminación ambiental por xenoestrógenos sobre la salud humana y del ecosistema (Crews y col., 2000; Knobil, 1999). Además, en los últimos años, hubo un incremento en las evidencias de perturbaciones endocrinas en animales silvestres que refuerzan la necesidad del desarrollo de sistemas sensibles para monitorear las poblaciones potencialmente expuestas a xenoestrógenos permitiendo obtener señales de alerta sobre los posibles efectos nocivos sobre la salud humana y del ecosistema (Bergeron y col., 1994; Colborn y col., 1993; Crain y Guillette, 1998).

El yacaré overo, *Caiman latirostris*, es una de las dos especies de caimanes argentinos y está ampliamente distribuido en el noreste de nuestro país (Larriera, 1995; Yanoski, 1990). La investigación de los efectos de los xenoestrógenos en esta especie tiene especial interés ya que presenta aptitudes ecológicas y fisiológicas particulares que permiten considerarlo un potencial centinela de contaminación ambiental.

5.1 Evaluación de Vtg como biomarcador

La inducción de Vtg se produce normalmente en hembras de especies ovíparas por unión del E2 a los receptores de estrógeno hepáticos, estimulando así la transcripción del gen de Vtg y la posterior traducción a proteína (Palmer y Palmer, 1995). Se ha demostrado que los machos de estas especies tienen la capacidad de producir Vtg ante un estímulo estrogénico exógeno (Jobling y col.,

1995; Selcer y col., 2001). También se ha observado que sustancias xenoestrogénicas como el DDT y el DES tienen la capacidad de imitar la acción del E2 al inducir la producción de Vtg en machos de anfibios y peces (Palmer y Palmer; 1995).

En el presente trabajo, demostramos que el tratamiento con E2, provoca la inducción de la expresión de 2 proteínas plasmáticas de alto peso molecular (395 y 405 kDa, determinado a partir de geles de poliacrilamida en condiciones nativas, y 205 y 225 kDa por PAGE-SDS) en hembras y machos juveniles de *C. latirostris*. Además, pudimos confirmar la identificación de estas proteínas como Vtg por su naturaleza fosforilada y mediante el reconocimiento específico por un anticuerpo policlonal anti-Vtg donado por el Dr. Selcer.

Una vez inducida e identificada la Vtg de *C. latirostris*, la pudimos aislar y purificar para la generación de anticuerpos policlonales específicos para nuestra especie en estudio. Con el antisuero obtenido y purificado desarrollamos metodologías para la detección de Vtg de *C. latirostris*. Por medio de western blot identificamos específicamente la proteína, permitiendo realizar una evaluación cualitativa de la Vtg expresada tanto en yacarés como en dos especies de tortugas juveniles tratadas con E2, *Phrynops hilarii* y *Trachemys scripta*. Por inmunohistoquímica evaluamos la síntesis/acumulación en tejido hepático y por ELISA obtuvimos mediciones cuantitativas de las concentraciones plasmáticas de Vtg en yacarés tratados previamente con E2. El desarrollo de estas metodologías nos permitirá evaluar la exposición a agentes estrogénicos exógenos.

Previamente se ha utilizado E2 para inducir la producción de Vtg en otras especies ovíparas vertebradas, entre las que se encuentran peces, anfibios y reptiles (Herbst y col., 2003; Palmer y Palmer, 1995; Selcer y col., 2001). Nuestros resultados obtenidos del análisis de la inducción de Vtg en yacarés juveniles sugieren que las proteínas de Vtg nativas son diméricas, como también ha sido observado en Vtg de otras especies (Callard y Ho, 1987; Mosconi y col., 1998; Selcer y col., 2006). Además, estas observaciones son consistentes con las bandas y pesos moleculares determinados para la Vtg de *Alligator*

mississippiensis, analizadas en condiciones desnaturalizantes (Gunderson y col., 2003; Selcer y col., 2001).

Es probable que las dos proteínas identificadas como Vtg que observamos en el plasma de *C. latirostris* provengan de la traducción de genes diferentes, ya que este fenómeno ha sido descrito en peces, pollos y anfibios (Bowman y col., 2000; Jaggi y col., 1980; Wang y Williams, 1983; Wahli y col., 1979).

La naturaleza fosforilada (evidenciada por el colorante catiónico Stains All) de las proteínas inducidas aportó una información fundamental para la identificación de las mismas como Vtg, ya que en todas las especies ovíparas estas proteínas tienen un porcentaje variable, pero siempre presente, de fosforilación. Tal es el caso de la Vtg de *X. laevis* con un grado de fosforilación de 1,6%, el de la Vtg de pollo con un porcentaje de fosforilación de 2,4% y el caso de insectos en los que se detectó un 1,5% de contenido de fósforo (Tata y Smith, 1979).

La confirmación de la identidad de las proteínas inducidas como Vtg de yacaré fue aportada por el reconocimiento de las mismas utilizando un anticuerpo policlonal generado por el grupo de Selcer y col. (2001) contra un péptido que representa una porción altamente conservada de la molécula de Vtg. La secuencia de este péptido (EYRHIIPTTVGLPAELSLYQSAI) fue seleccionada por sus autores basándose en alineamientos múltiples de secuencias de Vtg de pollo (*G. gallus*), del sapo africano (*X. laevis*) y de peces (*A. transmontanus*, *F. heteroclitus* y *I. unicuspus*). Este anticuerpo mostró reacción cruzada contra Vtg de varios vertebrados, entre los que se encuentran el sapo *X. laevis*, las tortugas, *T. scripta* y *L. kempí*, el pez, *C. auratus* y el aligador *A. mississippiensis* (Selcer y col., 2001). En nuestro trabajo el anticuerpo mostró reacción positiva específica en los ensayos de western blot para las dos proteínas inducidas por el tratamiento con E2 en yacaré hembras.

En lo que respecta a la caracterización del antisuero generado en nuestro laboratorio (anti-Vtg LETHW 03-07) es interesante resaltar que como antígeno se utilizó la proteína completa de Vtg de *C. latirostris*. En los ensayos de western blot, nuestro anticuerpo mostró una reacción más intensa contra Vtg de yacaré en relación al anticuerpo provisto por el Dr. Selcer, usado como control positivo. El

motivo de esta diferencia podría deberse a que nuestro anticuerpo se generó contra la molécula completa de Vtg de yacaré, de este modo reconocería un número mayor de epitopes específicos que el anticuerpo proporcionado por el Dr. Selcer. Otra razón podría radicar en la posibilidad que la secuencia conservada (en varias especies) contra la cual fue generado el anticuerpo provisto por el Dr. Selcer, no se encuentre como tal en nuestra especie de yacaré, presentando un menor grado de homología.

Habiendo confirmado la identidad de la proteína inducida como Vtg, nuestro siguiente objetivo fue desarrollar un bioensayo altamente sensible y específico para cuantificar Vtg circulante, concretamente un ELISA competitivo. Utilizando Vtg purificada de *C. latirostris* se generó una curva estándar, la cual demostró que el ensayo es muy sensible y presenta un amplio rango de trabajo para la detección de Vtg (6 a 1560 ng/ml). Este ensayo desarrollado no sólo permite controlar los patrones de expresión de la Vtg sino que además es específico para nuestra especie con un rango de trabajo más amplio que el que fuera desarrollado para cocodrilos Morelet (*Crocodylus moreletii*) (Selcer y col., 2006). Probablemente se deba a que para la obtención de su ELISA, Selcer y col. (2006) utilizaron el anticuerpo generado contra una porción conservada de Vtg, no específico para estos cocodrilos.

Numerosos contaminantes se consideran xenoestrógenos debido a que presentan una respuesta estrogénica en diferentes ensayos *in vivo* y/o *in vitro* (Soto y col., 1994; Nakada y col., 2004). El uso de marcadores fisiológicos, como la inducción de proteínas por acción de E2, que actúen como indicadores de respuesta temprana a la contaminación del medioambiente con xenoestrógenos, puede aportar una información importante con respecto a los potenciales efectos de estos contaminantes sobre la salud del ecosistema. La inducción de Vtg en especies ovíparas es utilizada frecuentemente como un biomarcador estándar de exposición a xenoestrógenos (Cheek y col., 2004; Irwin y col., 2001; Palmer y Palmer, 1995). La determinación de Vtg plasmática en yacarés macho y hembra juveniles se presenta como un biomarcador sensible de exposición de animales silvestres a agentes con actividad estrogénica. Otros autores apoyan el uso del

Vtg como biomarcador a partir de su evaluación en sistemas acuáticos (Cheek y col., 2001; Folmar y col., 1997; Palmer y col., 1998; Tyler y col., 1999). Sin embargo, la mayor parte de los estudios de contaminación que emplean la vitelogénesis se realizan en peces (Allen y col., 1999; Cheek y col., 2004; Kirby y col., 2004). Por otro lado, también se observó inducción de Vtg en tortugas y lagartos expuestos experimentalmente a xenoestrógenos (Brasfield y col., 2002; Herbst y col., 2003; Palmer y Palmer, 1995; Tada y col., 2004), lo que refuerza la utilidad de este blanco como biomarcador de exposición a estrógenos ambientales en reptiles. Son escasos los estudios en los que se evalúa la Vtg en animales silvestres que habitan en ambientes contaminados (Gunderson y col., 2003; Irwin y col., 2001; Rie y col., 2005; Selcer y col., 2006; Shelby y Mendonca, 2001). Esto se debe principalmente a la ausencia de anticuerpos disponibles específicos para Vtg en estos animales y a la limitada reacción cruzada con otras especies de los anticuerpos disponibles (Selcer y col., 2001; 2006). Si bien es cierta la ventaja de trabajar con especies pequeñas también es cierto que los peces se encuentran en los primeros escalones de la red trófica. Los reptiles, por el contrario, al estar en los niveles superiores, tienen la capacidad de bioacumular y biomagnificar sustancias con actividad estrogénica dando una respuesta más real de los potenciales riesgos para la salud humana y del ecosistema. Por esta razón aunque el biomarcador es el mismo, siempre es de elección la utilización de especies superiores como centinelas.

La obtención del anticuerpo específico y el desarrollo del ELISA ofrece numerosas ventajas, entre ellas: 1) la utilización de una técnica no agresiva para la toma de muestra, 2) la necesidad de un volumen reducido de plasma, sin la necesidad de biopsias de tejido; 3) la alta sensibilidad y especificidad del ensayo; y 4) la relación costo-beneficio, ya que permite la evaluación de un elevado número de muestras con un bajo costo en relación al western blot, por ejemplo. En este análisis, sin embargo; no podemos dejar de mencionar una característica que limita en parte su aplicación, la inestabilidad de la Vtg y la necesidad de utilizar inhibidores de proteasas dificulta la toma de muestra de sangre en condiciones de campo en áreas muy alejadas de fuentes de energía eléctrica.

El criterio para utilizar a la Vtg como biomarcador es que los animales sexualmente inmaduros y los machos normalmente no expresan Vtg, pero son capaces de sintetizarla en respuesta a estímulos estrogénicos. En nuestro trabajo al tratar a yacarés machos con inyecciones de E2 se observó un aumento del contenido proteico plasmático. El mismo resultado fue detectado por Van den Belt y col. (2003) en dos especies de peces. En ambos casos la proteína que aumenta principalmente es la Vtg.

Por otro lado, cuando se administraron dos dosis de E2 a yacarés macho, se observó un efecto de cebado sobre la inducción de Vtg debido a la primera inyección, lo que sugiere la existencia de un cierto mecanismo de “memoria” molecular que podría estar actuando a diferentes niveles (por ejemplo en el procesamiento o síntesis proteica). El significado de este efecto de cebado aún se desconoce, no obstante, al observarse grandes variaciones en las respuestas individuales en los yacarés, se podría especular que las diferencias en la exposición a xenoestrógenos durante el desarrollo embrionario podría ser el mecanismo subyacente al aumento en la sensibilidad de respuesta a E2 (Foran y col., 2002).

La inducción de Vtg en yacarés de corta edad como bioensayo de laboratorio para evaluación de sustancias xenoestrogénicas permite la utilización de este centinela en etapas postnatales tempranas. Demostramos que las crías de yacaré fueron capaces de responder al tratamiento estrogénico y de sintetizar Vtg, evidenciando la maduración de su maquinaria de síntesis. En el mismo sentido, se observó que peces expuestos a E2 en estadíos tempranos de vida también son capaces de responder frente a un estímulo estrogénico sintetizando Vtg (Brion y col., 2004). Esto podría justificarse debido a que ya en etapas muy tempranas del desarrollo se expresan los receptores estrogénicos de los subtipos α y β y que la exposición a E2 estimula la expresión de los genes sensibles a estrógenos (Legler y col., 2000).

Si bien se observaron diferencias significativas en la inducción de Vtg en las crías de todos los grupos de tratamiento con E2, respecto al control, en este último grupo experimental se detectaron muy bajos niveles de Vtg circulante como

también fuera observado en tortugas sexualmente inmaduras (Herbst y col., 2003). Esto podría deberse a que en crías se han detectado niveles de estrógenos que, podrían ser suficientes para inducir la síntesis de Vtg a esta edad, pero no en animales juveniles.

Cuando comparamos la respuesta en la inducción de Vtg entre las crías y los yacarés juveniles frente al estímulo estrogénico observamos que las crías fueron menos sensibles (para un mismo tratamiento con E2, las crías inducen 0,24 mg/ml de Vtg y 0,68 mg/ml, mientras que los machos juveniles 1,18 mg/ml y 10,15 mg/ml, con 1 y 2 dosis de E2 respectivamente). Se puede observar que las crías no respondieron al segundo estímulo con E2 tal como sucedió con los animales juveniles, en los cuales la primera dosis estrogénica actuó a modo de cebado. Este resultado probablemente estaría indicando una falta de maduración en los mecanismos involucrados en la adquisición de “memoria” en crías *C. latirostris*, o bien que a la edad estudiada estos mecanismos no se encuentran involucrados. Los resultados que obtuvimos utilizando las crías de yacaré aportan nuevos conocimientos que permiten ampliar el espectro de uso de las metodologías desarrolladas en este trabajo, previamente no explotadas.

Otra aplicación adicional del anticuerpo y de las metodologías optimizadas, fue la detección de Vtg en tortugas. En primera instancia, mostramos que el anticuerpo que desarrollamos en nuestro laboratorio exhibió una alta reacción cruzada con Vtg de las dos especies evaluadas (*P. hilairei* y *T. scripta*). La Vtg detectada en estas especies de tortuga fue una proteína única de un peso molecular aproximado de 215 kDa determinado en PAGE-SDS, lo que se corresponde a lo observado en otras especies de tortugas (Callard y Ho, 1987; Heck y col., 1997; Selcer y Palmer, 1995). Además, mediante demostración de la aplicación de nuestro anticuerpo para la detección de Vtg en tortugas silvestres, podemos proponer que la detección de Vtg podría utilizarse no sólo como indicador de exposición a agentes estrogénicos sino para estudiar la biología reproductiva tanto de yacaré como de estas tortugas de agua dulce.

Los aligatores hembras y los caimanes poseen un ciclo reproductivo estacional, que comienza en primavera con la síntesis de Vtg, previo a la

ovulación (Guillette y col., 1997; Lance, 2003). En los aligatores americanos sólo una parte de la población de las hembras desarrolla actividad reproductiva en una estación dada, principalmente debido a diferentes calidades en las condiciones ambientales (Guillette y col., 1997; Lance 2003). La medición de los niveles circulantes de Vtg podría emplearse como una herramienta importante para caracterizar hembras sexualmente maduras e identificar aquellas capaces de reproducirse en una temporada en particular. Si bien hasta el momento no se encuentran datos disponibles de los niveles circulantes de Vtg en hembras reproductoras *C. latirostris*, en otras especies se han observado niveles que serían fácilmente detectados con el ELISA que hemos desarrollado. Tal es el caso de hembras de *Crocodylus moreletii* cuya concentración circulante en épocas reproductivas promedia los 2,5 mg/ml (Selcer y col., 2006). Escasos son los datos adicionales disponibles en reptiles silvestres para establecer comparaciones. En tortugas hembras adultas *Chinemys reevesii* se detectó un rango de 1 a 15 mg/ml de Vtg circulante (Tada y col. 2004), mientras que Herbst y col. (2003) detectaron 4,6 mg/ml de Vtg circulante en una única tortuga hembra reproductora.

Como se puede advertir, la vitelogénesis puede ser un indicador importante tanto para la fisiología de la reproducción como para la perturbación endocrina por xenoestrógenos (Kime y col., 1999). La inducción de Vtg en machos y animales sexualmente inmaduros de especies ovíparas representa un biomarcador muy sensible de exposición postnatal a compuestos de acción estrogénica (Cheek y col., 2004; Palmer y Palmer, 1995; Sumpter y Jobling, 1995). La inhibición y la estimulación de la vitelogénesis pueden tener consecuencias directas en la capacidad reproductiva entre las que se pueden mencionar alteraciones en la fecundación, supervivencia o inadecuada calidad de la yema (Murphy y col., 2005). Otros autores han observado en estudios *in vitro* y en peces hembra adultos una alteración de la vitelogénesis debido a una síntesis hepática reducida y/o su disminución a nivel sérico como resultado de la contaminación ambiental por la presencia de metales (Hwang y col., 2000; Kirubagaran y Joy, 1995).

La elección de especies centinelas y biomarcadores es crítica para el desarrollo de sistemas eficientes de monitoreo para cada región.

Con el presente trabajo, se aportan nuevas herramientas que permiten una mejor caracterización de *C. latirostris* como especie centinela para el monitoreo de contaminación por xenoestrógenos en el ecosistema. Mayores estudios acerca de los niveles circulantes de Vtg en las poblaciones silvestres de yacarés aportarán datos adicionales para continuar con la caracterización de esta especie. Estos resultados serán importantes para identificar humedales con alto y bajo grados de contaminación por xenoestrógenos y contribuirán con datos significativos para preservar las poblaciones silvestres y la salud del ecosistema.

5.2 Evaluación de exposición a E2 sobre el oviducto

En reptiles se ha demostrado que los ductos sexuales (Müller y Wolf) son tejidos dependientes de hormonas (Austin, 1989; 1990; Crain y col., 1999; Raynaud y Pieau, 1985). La dependencia hormonal del oviducto ha sido comprobada previamente en nuestro laboratorio luego de la administración de E2 a hembras juveniles de yacarés induciendo una significativa hipertrofia e hiperplasia del ducto (Stoker y col., 2002). En experimentos anteriores, cuando evaluamos oviductos de animales de 10 días de edad que habían recibido un tratamiento prenatal con agentes xenoestrogénicos como BPA (1,4 y 140 ppm) no observamos modificaciones en la actividad proliferativa ni en la altura del epitelio indicando que el oviducto no sería un buen biomarcador para evaluar postnatalmente una exposición prenatal a xenoestrógenos (Stoker, 2004).

Sin embargo, no se puede descartar que el ducto de Müller, expuesto prenatalmente a xenoestrógenos, presente alguna modificación que induzca una respuesta diferente a estímulos estrogénicos posteriores (por ejemplo, luego de una exposición postnatal a xenoestrógenos, o a los estrógenos endógenos característicos de la madurez sexual). En mamíferos, hay numerosas evidencias que demuestran efectos observados a largo plazo que son el resultado de la exposición a perturbadores endocrinos durante la vida prenatal (Knobil, 1999; Markey y col., 2001; 2003; Ramos y col., 2001; 2003; Sonnenschein y Soto, 1998).

En el presente experimento nos preguntamos si el oviducto de animales de corta edad responde a estímulos estrogénicos postnatales.

Como se muestra en los resultados, el tratamiento neonatal con E2 en hembras de *C. latirostris* indujo un aumento de la actividad proliferativa y un incremento en la altura del epitelio del oviducto en los animales evaluados a los 40 días de edad. El aumento de la altura del epitelio no se debió únicamente al aumento en el número de células sino también al aumento en el tamaño celular en parte por acumulación de productos de secreción exócrina.

A partir de los resultados obtenidos podemos afirmar que la hiperplasia e hipertrofia del oviducto constituyen un buen biomarcador de efecto estrogénico para evaluaciones postnatales y de corto plazo.

5.3 Biomarcadores de exposición prenatal a perturbadores endocrinos.

Una de las posibles vías de exposición a perturbadores endocrinos en especies ovíparas es la transferencia materna de estos contaminantes de naturaleza lipofílica que se depositan en la yema de los huevos durante la vitelogénesis. La carga de contaminantes de los adultos, puede ser transferida a sus crías, afectando el desarrollo de los embriones, un período de alta sensibilidad a los efectos de agentes hormonalmente activos (Guillette y Gunderson, 2001; Matter y col., 1998).

La interacción entre poblaciones celulares específicas de las gónadas durante el desarrollo, es responsable de una función reproductiva adecuada una vez alcanzada la madurez sexual. Puede suceder que los tejidos gonadales alteren su morfología por acción de perturbadores endocrinos sin llegar al extremo de revertir el sexo (Stoker y col., 2003), o bien pueden encontrarse morfológicamente bien organizados, pero poseer mecanismos bioquímicos modificados que pueden conducir a alteraciones metabólicas. Estas alteraciones, establecidas durante el desarrollo, pueden modificar el crecimiento y desarrollo postnatal y/o ocasionar un funcionamiento reproductivo inadecuado durante la vida adulta (Matter y col., 1998).

En función de lo anteriormente expuesto, se puede observar que es de vital importancia la búsqueda de biomarcadores de exposición prenatal a perturbadores endocrinos.

5.3.1 Alteraciones en el peso de los huevos

Nuestros resultados mostraron que la exposición *in ovo* a atrazina y endosulfán provocó un aumento en la pérdida de peso de los huevos y una disminución en el peso de las crías *C. latirostris*. La pérdida de peso de los huevos se produjo principalmente por un menor peso de las crías.

Al igual que lo observado por Manolis y col. (1987) para otras especies de cocodrilos, en nuestras experiencias todos los huevos perdieron peso durante la incubación. Lutz y Dumba Cooper (1984) observaron que la pérdida fraccional de peso de los huevos en *Crocodylus acutus* bajo incubación controlada es notablemente constante y es alrededor de 15%, similar a lo que fue reportado para varias especies de aves. En nuestro trabajo, sin embargo, el promedio de pérdida de peso fraccional de los huevos en *C. latirostris*, fue ligeramente menor a lo observado para *C. acutus* ($10,3\% \pm 3,3$), lo cual podría atribuirse al registro tardío del peso inicial de los huevos (en estadios 15 a 18 de desarrollo embrionario). Manolis y col. (1987) sugieren que la pérdida de peso en *C. johnstoni* se debe a la evaporación de agua ya que observaron una fuerte asociación con la presencia de cámaras de aire (consideradas como indicadoras de deshidratación). En su estudio, la pérdida fraccional de peso en huevos sin cámara de aire fue de 2,5-3,5%, mientras que en aquellos huevos con cámara de aire experimentan una pérdida de peso fraccional 2,7 veces mayor. En nuestros estudios, aún cuando la proporción de huevos con cámara de aire fue mayor en la incubadora con menor humedad (la correspondiente a 30°C), no se registraron diferencias en la pérdida de peso entre ambas temperaturas de incubación, ni en huevos que presentaban o no, cámara de aire.

En nuestro trabajo, la pérdida de peso en *C. latirostris* se asoció únicamente con el tratamiento, siendo significativamente mayor en aquellos huevos tratados con una dosis de atrazina ecológicamente relevante (0,2 ppm) y con dosis relativamente bajas de endosulfán (2 y 20 ppm). Hasta el presente, la pérdida de peso en los huevos se atribuía principalmente a la evaporación de agua a través de la cáscara (Manolis y col., 1987), sin embargo nuestros resultados sugieren

que podría asociarse con algunos aspectos metabólicos del embrión involucrados en el proceso. Nuestros resultados indican que la atrazina y el endosulfán provocan un aumento en la pérdida de peso de los huevos y una disminución en el peso fraccional de las crías, sugiriendo que la exposición a estas sustancias afecta la capacidad del embrión para asimilar la energía presente en el huevo como tejido embrionario. Estudios exhaustivos, que exceden los objetivos de esta tesis, deberían realizarse para dilucidar los posibles mecanismos a través de los que se ejercen dichos efectos.

El endosulfán es un perturbador endocrino con efecto estrogénico demostrado *in vitro* (Soto y col., 1995). Sin embargo, considerando que el grupo tratado con E2 tiene la misma pérdida de peso en los huevos que los controles, es posible inferir que el efecto del endosulfán podría no estar mediado por su acción estrogénica. Los órganos que son frecuentemente afectados por el endosulfán son riñones, hígado y glándulas paratiroides (U. S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990). Podría sugerirse que la exposición *in ovo* a endosulfán afecta al metabolismo de embriones *C. latirostris*, alterando el funcionamiento de varios órganos y/o al sistema endocrino perturbando señales que controlan el desarrollo.

Con respecto a atrazina, la dosis utilizada en este trabajo se considera ecológicamente relevante (Hayes y col., 2002), por lo que nuestros resultados son altamente significativos. Existen estudios que demuestran que ratas que recibieron atrazina en forma oral mostraron un crecimiento retrasado (Stevens y Sumner, 1991). En humanos, se encontró una asociación entre los niveles de este pesticida en el agua para consumo y un crecimiento intrauterino disminuido (Munger y col., 1997). Además la exposición a atrazina a lo largo del tercer trimestre de gestación incrementa el riesgo de nacimiento de bebés de bajo peso para la edad gestacional (Villanueva y col., 2005). Los órganos blanco para atrazina y su mecanismo de acción aún no se conocen con certeza, pero estudios en ratas sugieren que afectan al sistema nervioso central y la glándula tiroides (Kornilovskaya y col., 1996). Además se observó a través de un ensayo *in vitro* que atrazina compete por receptores de estrógeno presentes en oviducto de *A.*

mississippiensis lo cual podría evidenciar su capacidad para actuar como xenoestrógeno (Vonier y col., 1996). La tiroxina y las hormonas esteroideas están íntimamente asociadas a la regulación del metabolismo y el crecimiento.

Actualmente se desconoce el impacto de los pesticidas estudiados en las poblaciones naturales de yacarés, sin embargo, se puede suponer que las crías más pequeñas tendrían menos oportunidades de supervivencia durante el primer año de vida, y de este modo se podría afectar la dinámica de la población de la especie (Prado, 2003). Esta disminución en el desarrollo de los embriones podría estar ocurriendo en otras especies de vertebrados, incluyendo a los humanos, víctimas inconscientes de la exposición a alimentos y aguas contaminados.

Los resultados presentados de la evaluación de los pesos justifican una exploración más exhaustiva de la pérdida de peso de los huevos como potencial biomarcador de exposición a pesticidas tales como endosulfán y atrazina, otorgando así nuevas pautas para postular a *C. latirostris* como centinela de contaminación ambiental.

Cabe destacar que todos estos estudios fueron realizados tratando huevos con una única dosis de contaminante en una etapa muy sensible del desarrollo embrionario. Sería muy interesante estudiar los efectos de una exposición constante, comenzado en etapas iniciales del desarrollo embrionario.

5.3.2 Efectos de los pesticidas sobre la determinación sexual.

Como se mencionó anteriormente, en las especies con determinación sexual por temperatura, la exposición prenatal a xenoestrógenos puede revertir el efecto de la temperatura. En nuestro trabajo, nos propusimos evaluar el efecto de atrazina y endosulfán sobre la determinación sexual. Ni atrazina ni endosulfán aplicados en la etapa 20 de desarrollo embrionario fueron capaces de revertir el sexo de los embriones de huevos incubados a 33°C obteniéndose el 100% de animales machos. En estudios previos, demostramos que otro perturbador endocrino, el BPA, fue capaz de imitar el efecto del E2 en su capacidad de revertir el sexo de yacarés incubados a temperatura de obtención de machos obteniéndose el 100% de hembras (Stoker y col., 2003). Este efecto resultó ser

dosis dependiente, y en los animales tratados prenatalmente con dosis de E2 o de BPA que no fueron suficientes para revertir el sexo, los machos resultantes presentaron alteraciones en la histoarquitectura gonadal (caracterizada por el incremento del perímetro de los túbulos seminíferos) similares a las que aquí describimos para endosulfán y atrazina. Por esta razón podríamos inferir que, en dosis mayores a las estudiadas, endosulfán y atrazina podrían causar reversión sexual. Sin embargo, dosis mayores ya no serían ecológicamente relevantes y podrían producir efectos tóxicos (Kamijima y Casida, 2000).

5.3.3 Alteraciones en la histoarquitectura gonadal de machos.

La exposición *in ovo* a los contaminantes endosulfán y atrazina ocasionó modificaciones en la histoarquitectura de las gónadas de los yacarés machos. La alteración del perímetro de los túbulos seminíferos demostrada en machos de 10 días de edad fue similar a la que previamente describimos en yacarés de la misma edad tratados *in ovo* con BPA y E2 (Stoker y col., 2003). Esta alteración puede deberse a una desorganización del estroma peritubular o a modificaciones causadas sobre las células que se encuentran dentro del túbulo: células de Sertoli y células germinales. Las células de Sertoli forman el esqueleto de sostén y participan en la regulación de la espermatogénesis, resultando un posible blanco de acción de estrógenos y xenoestrógenos. En efecto, en la rata está demostrado que las células de Sertoli poseen receptores de estrógeno β (O'Donnell y col., 2001) al igual que lo observado en cerdo (Lekhkota y col., 2006) y que el volumen ocupado por las células de Sertoli por testículo, disminuye como resultado del tratamiento neonatal con DES (Atanassova y col., 1999). Recientemente se ha demostrado que el BPA afecta las uniones intercelulares de células de Sertoli en cultivo (Fiorini y col., 2004). Una estructura y funcionamiento normales de las uniones entre células de Sertoli son imprescindibles para una correcta espermatogénesis y, más específicamente, para que cumpla su función la barrera hematotesticular (Griswold, 1998; Russell, 1998). Mayores evidencias de perturbación en la histoarquitectura de gónadas de machos fueron demostradas en peces *Lepomis macrochirus* por acción de endosulfán (Dutta y col., 2006). En

ellos se evidenció una alta desorganización de la estructura testicular, con alteraciones significativas en tejido conectivo, aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos y porciones donde se pierde la adecuada delimitación de la pared tubular. Además, los autores describieron daños en las células de Sertoli. Estos daños observados en peces por exposición a endosulfán podrían afectar a las espermátides y espermatozoides, y posiblemente tengan un impacto negativo en la espermatogénesis y la fertilidad de machos (Dutta y col., 2006).

Contrariamente a lo que hemos observado en nuestro trabajo, en un estudio realizado en codornices juveniles expuestas a altas dosis de atrazina en el alimento, se demostró ausencia de modificaciones en el diámetro testicular, entre otros parámetros evaluados, los cuales tampoco fueron significativamente alterados (Wilhelms y col., 2005). Esto podría deberse a: 1) que el efecto estrogénico de atrazina no está claramente definido, 2) la diferencia en las dosis administradas y 3) muy probablemente al momento de la administración ya que se ha demostrado en múltiples estudios la mayor labilidad de los embriones a sufrir cambios organizacionales (Crain y Guillette, 1998; Guillette y col., 1995; Milnes y col., 2006).

En trabajos previos demostramos que el E2 provoca un aumento en el perímetro de los túbulos seminíferos (Stoker y col. 2003), tal como observamos con atrazina, además, se ha demostrado que este herbicida, tiene afinidad de unión al receptor de estrógeno (Connor y col., 1996; Tennant y col., 1994). Estas dos razones nos permiten sugerir que el efecto observado sobre la histoarquitectura gonadal podría ser un biomarcador de actividad estrogénica.

Las causas que podrían producir como efecto final una alteración del perímetro de los túbulos seminíferos son múltiples. En nuestro trabajo observamos que ni la actividad proliferativa ni la apoptosis intratubular se modificaron al momento del sacrificio de los animales, lo que podría evidenciar un balance adecuado entre las células en proliferación y las que ingresan a la muerte celular programada. Por lo tanto, alteraciones en el recambio celular intratubular no explicarían las variaciones en el perímetro tubular. Por este motivo fue interesante estudiar el comportamiento de las células mioides peritubulares, como posible

células blanco del efecto de perturbadores endocrinos. Para identificar y estudiar el comportamiento de las células peritubulares, evaluamos la marcación de desmina, proteína del citoesqueleto presente en células contráctiles, específica para esta población celular (Anthony y Skinner, 1989; Virtanen y col., 1986). Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de las células mioides peritubulares en todos los grupos de tratamientos. Resultados similares fueron observados en peces tras haber sido expuestos por 72 hs y 1 semana, a diazinon, un pesticida organofosforado (Dutta y Meijer, 2003). Estos autores postularon que el incremento en el tamaño de los túbulos seminíferos podría deberse a un debilitamiento en el tejido conectivo que rodea a los túbulos y en las células mioides debido a la exposición.

El término “mioide” fue introducido basándose en su semejanza citológica con las células del músculo liso a través de microscopía electrónica y además, debido a que son células responsables de la contracción muscular (Maekawa y col., 1996). Estas células de origen mesenquimático se encuentran adyacentes a las células de Sertoli en el tejido que delimita a los túbulos seminíferos, separadas entre sí por una membrana basal. Cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los túbulos seminíferos así como también en la regulación de la función y desarrollo de las células de Sertoli (Anthony y Skinner, 1989; Maekawa y col., 1996; Palombi y col., 1992). Las células peritubulares junto a fibras de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular en el tejido periférico constituyen la pared tubular. Esta compleja estructura proporciona una barrera no específica que limita el pasaje de células y macromoléculas dentro del túbulo (Dym y Fawcett, 1970). De este modo, las células peritubulares cumplen con su importante función proveyendo un soporte estructural para el túbulo seminífero y ayudando a un mantenimiento adecuado de la histoarquitectura del epitelio (Hadley y col., 1985). La importancia de los resultados observados en nuestro trabajo radica en que las interacciones entre las células epiteliales y mesenquimáticas son esenciales para una variedad de funciones celulares. Se postuló que durante la embriogénesis las células mesenquimáticas producen sustancias que pueden conducir a la diferenciación del

epitelio adyacente (Cunha y col., 1983). La interacción entre las células peritubulares y las células de Sertoli es un ejemplo ya que las células mides producen un factor parácrino, P-Mod-S, que modula la diferenciación y las funciones de las células de Sertoli, participando así de la regulación endocrina del tejido (Anthony y Skinner, 1989; Skinner y col., 1985).

Los resultados presentados respecto a la histoarquitectura gonadal de machos constituyen evidencias que apoyan la utilización de esta variable como biomarcador ya que resultó ser muy sensible, verificable para una variedad de xenoestrógenos y de gran relevancia por su posible implicancia en la fertilidad futura de los animales.

5.3.4 Alteraciones en los perfiles hormonales.

Una de las dificultades que implica el trabajo con especies no tradicionales es la ausencia de antecedentes para llevar a cabo los estudios. Esta realidad implica que se deba realizar una caracterización previa de los patrones de la variable a estudiar. Así, para evaluar posibles alteraciones en los perfiles hormonales plasmáticos, realizamos previamente un estudio de los niveles normales de los mismos, utilizando animales de diferentes edades mantenidos en condiciones de cautiverio a los que les determinamos por RIA los niveles de E2 y T. La importancia del resultado obtenido reside en la caracterización de los niveles hormonales normales en esta especie. Un resultado interesante que obtuvimos fue que prácticamente en todas las edades evaluadas los machos y las hembras presentaron un patrón dependiente del sexo en relación a los niveles de E2 y T. De este modo, desde una edad muy temprana machos y hembras poseen diferentes concentraciones hormonales y una alteración en estos niveles por exposición a xenoestrógenos podría ser utilizada como un buen biomarcador.

Existen controversias en relación a los niveles séricos de las hormonas esteroides en el aligador americano que se deben posiblemente a diferencias metodológicas (Guillette y col., 1994; Lance, 2003) esto impide contar con datos precisos para animales de edades determinadas. Además es frecuente encontrar clasificaciones según el tamaño del animal como medida de madurez sexual para

la presentación de dichos resultados, esto es esperable porque el tamaño de los animales (tanto en yacarés como en aligatores) se encuentra estrechamente afectado por las condiciones nutricionales y ambientales (Prado, 2003; Rooney y col., 2004) y en consecuencia, en animales silvestres, la edad para alcanzar la madurez sexual no es precisa. *C. latirostris* se estima que alcanza la madurez sexual entre los 6 y 10 años, esto es una vez que superan 1,30 m (Prado, 2003) mientras los aligatores la alcanzan entre los 10 y 18 años y 1,80 m (Lance, 2003).

Por otro lado, es necesario tener en cuenta que tanto los machos aligatores prepúberes (menores a 1,80 m) y los sexualmente maduros (mayores o iguales a 1,80 m), presentan una variación de los niveles de E2 y T que es estacional, dependiente de la temperatura ambiente, siendo las concentraciones circulantes de los juveniles menores a la de los adultos (Guillette y col., 1997; Lance, 2003; Lance y col., 2003; Rooney y col., 2004). Para las hembras, en cambio, si bien hay una coincidencia en los antecedentes encontrados para la estacionalidad hormonal de las hembras adultas, en las juveniles los resultados son controvertidos. Algunos autores observaron, que las hembras juveniles también presentan un perfil estacional (Guillette y col., 1999b; Rooney y col., 2004), mientras que otros autores afirman que las hembras juveniles sólo poseen niveles basales de las hormonas circulantes que no se modifican a lo largo del año (Lance, 2003).

En nuestro trabajo, se utilizaron muestras plasmáticas de animales en cautiverio, tomadas en el lapso de 3 días en período estival, y de animales de nuestro bioterio, cuyas condiciones ambientales imitan las del período estival, de los cuales se tomaron las muestras en un mismo día. De esta manera, se evitaron posibles interferencias por estacionalidad.

Los machos juveniles desde los 10 días hasta 18 meses de edad, poseen bajos niveles circulantes de E2 (de 1,9 a 6,9 pg/ml). Estos valores son similares a los observados en aligatores juveniles (1,6 pg/ml, Lance y col., 2003). En animales de 5 y 6 años de edad también obtuvimos niveles de E2 similares (39 pg/ml) a los datos informados para el aligador americano (Rooney y col., 2004).

Respecto a los niveles circulantes de T en machos, nuestros resultados indican que, hasta los 18 meses, éstos se incrementan significativamente conforme a la edad exhibiendo luego un *plateau* hasta los 6 años. Los niveles de T de yacaré macho a los 6 años no difieren de los informados para aligatores juveniles (Lance, 2003). En las hembras de 5 y 6 años, obtuvimos concentraciones de E2 similares a las reportadas para sexualmente inmaduros (Guillette y col., 1994; Lance 2003; Rooney y col., 2004) e inferiores a las de aligatores hembras adultas (Guillette y col., 1997). Es interesante resaltar que en este grupo etario, las hembras de mayor tamaño fueron las que exhibieron los mayores niveles de E2 lo que podría indicar un mayor grado de madurez sexual y un pronto comienzo de su actividad reproductiva. Sabemos que, es necesario un incremento de los valores de las hormonas sexuales para iniciar la maduración y el crecimiento de los órganos reproductivos que llevarán a una óptima reproducción de los animales.

En lo referente a los niveles de T en las hembras juveniles, nuestros valores se encuentran dentro del rango de valores descriptos en aligatores (20-90 pg/ml; Guillette y col., 1994; 1999a; Gunderson y col., 2004). En los resultados de hembras juveniles obtuvimos una importante variabilidad, sobre todo a los 18 meses de edad, lo que podría indicar una diferencia en el grado de maduración sexual de los animales o en la actividad de las enzimas esteroideogénicas. Cabe destacar en las hembras de mayor tamaño observamos una disminución en la concentración de T y un incremento de los niveles de E2. Esto podría sugerir una mayor conversión de T en E2 por acción de la enzima aromatasa, y de este modo los animales poseerían los mayores niveles de E2 que necesitan para favorecer la maduración de los órganos reproductivos.

Conociendo los perfiles hormonales normales se evaluaron los efectos de la exposición *in ovo* a contaminantes sobre los niveles circulantes de E2 y T en diferentes edades. Observamos que las hembras de 10 días de edad expuestas *in ovo* a atrazina o endosulfán, presentaron niveles de E2 que no difieren de los controles. Sin embargo, los animales tratados *in ovo* con atrazina y endosulfán en las concentraciones de 2 y 20 ppm, exhibieron niveles más elevados, que si bien sólo muestran una tendencia no difieren de los niveles obtenidos en el grupo

expuesto *in ovo* a E2 1,4 ppm (control positivo) que sí aumentaron significativamente respecto al control (vehículo).

Por otro lado, observamos que los machos expuestos a endosulfán 20 ppm presentaron una disminución significativa de los niveles de T plasmática. Como se mencionó anteriormente, los niveles séricos tanto de E2 como de T presentan valores característicos dependientes del sexo. Por esta razón definimos comparar también los niveles hormonales obtenidos con los correspondientes a los de los animales controles del sexo opuesto, de manera tal de evaluar si la perturbación endocrina sufrida acercaba los valores a los del sexo opuesto. Así resultó que los niveles de T disminuidos de los machos de 10 días edad expuestos a endosulfán no difirieron de los observados en las hembras (controles y obtenidas por reversión sexual), permaneciendo los restantes grupos de tratamiento similares a los controles.

Cabe destacar que el grupo de yacarés tratado con atrazina si bien no difirió de los controles en cuanto a los niveles séricos de T, tampoco lo hizo respecto a las hembras controles y obtenidas por reversión sexual, mostrando un vez más la perturbación endocrina en cuanto a los niveles hormonales dependientes del sexo y probablemente tengan relevancia en la fertilidad futura de estos animales. Este mismo resultado se repitió para los grupos de machos expuestos a E2 y BPA. La similitud en el efecto provocado por atrazina, BPA y E2, llevaría a proponer que este efecto de disminución de T implicaría un comportamiento estrogénico de los contaminantes utilizados. Otros autores observaron que la atrazina provoca una disminución significativa de T en sapos, pero las dosis usadas -a excepción de la usada por Hayes y col. (2002)- fueron mayores a las evaluadas en nuestro trabajo (Hecker y col., 2005 a; b; Spanò y col., 2004). Codornices macho expuestas *in ovo* a atrazina no presentaron diferencias respecto a los controles en los niveles de T circulante utilizando dosis análogas y hasta 2 veces mayores que las utilizadas en nuestro trabajo (Wilhelms y col., 2006). Las diferencias respecto a alteraciones en la histoarquitectura gonadal (comentadas anteriormente) y niveles hormonales entre codornices (Wilhelms y col., 2005, 2006) y otras especies, pone en evidencia las diferencias en la sensibilidad de un mismo biomarcador en diferentes especies

y enfatiza la necesidad de realizar estudios en más de una especie y de evitar extrapolaciones. En ratas macho, una dosis diaria de 0,2 ppm de atrazina por 25 días fue necesaria para provocar una disminución en los niveles de T circulante, mientras que una dosis de 0,05 ppm durante el mismo período no causó tal efecto (Trentacoste y col., 2001).

Los resultados que muestran una disminución de la T en los machos tratados con contaminantes *in ovo*, se asemejan a los observados en ambientes contaminados, donde una población de aligatores expuestos a una contaminación por dicofol, DDT, DDE presentó una disminución de T circulante en machos que fueron similares a las concentraciones detectadas en las hembras (Guillette y col., 1994; 2000). En hembras juveniles provenientes del mismo lago contaminado, se observaron presencia de folículos multiovulares y se detectaron aumentos notables en E2 circulante (Guillette y col., 1994). Si bien en nuestro trabajo el aumento de los niveles de E2 circulante en crías hembra de 10 días de edad expuestas a pesticidas no difirieron significativamente del control, tampoco fueron diferentes a las concentraciones de E2 circulante de hembras tratadas *in ovo* con E2, las cuales sí presentaron niveles significativamente elevados respecto a las crías controles. Esto podría indicar que los contaminantes adoptan un patrón de comportamiento similar al obtenido luego de exponer huevos a E2 lo que podría manifestar que estos pesticidas alteran los perfiles hormonales siguiendo una vía estrogénica. Al igual que en los aligatores silvestres expuestos naturalmente a contaminantes clasificados como xenoestrógenos (Guillette y col., 1994), en yacaré expuestos *in ovo* experimentalmente a xenoestrógenos observamos alteraciones en la dinámica folicular a los 10 días de edad y una alta incidencia de folículos multiovulares a los 12 meses (Rey y col., 2005; Stoker y col., 2004).

Las perturbaciones observadas en aligatores juveniles provenientes de los lagos contaminados, llevan a los autores a postular que la exposición a contaminantes xenoestrogénicos provocan una desmasculinización de machos y superfeminización de las hembras (Guillette y col., 1994) lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestros estudios. Tal como sucede en mamíferos y aves, en los reptiles los esteroides sexuales son esenciales para un correcto

desarrollo del tracto reproductor (Guillette y col., 1994) por lo cual las implicancias sobre la fertilidad futura de estos animales plantea dudas y preocupación.

Las alteraciones observadas en las concentraciones plasmáticas de las hormonas en aligatores naturalmente expuestos a xenoestrógenos se mantuvieron por años luego del nacimiento (Crain y col., 1998; Guillette y col., 1999b). Existen numerosos estudios en los cuales se detectaron alteraciones en las concentraciones de hormonas esteroides circulantes, en organismos expuestos a contaminantes que perturban al sistema endocrino. En peces, se determinaron alteraciones en esteroides plasmáticos a raíz de haber sido expuestos a efluentes de residuales e industriales (Folmar y col., 1996; 2001; Orlando y col., 1999, 2004; Van der Kraak, 1998).

Los mecanismos a través de los cuales los químicos con actividad xenoestrógena pueden alterar la esteroidogénesis son numerosos y pueden poner en evidencia tanto efectos organizacionales como activacionales (Guillette y col., 1995; McLachlan, 2001). Los más estudiados son: las alteraciones sobre el eje-hipotálamo-hipofisario-gonadal, modificaciones en las enzimas requeridas para la esteroidogénesis y/o la biotransformación hepática (aromatasa, enzimas de la familia del citocromo P450, etc).

En peces *L. macrochirus* expuestos por 1 y 2 semanas a endosulfán, se observó un menor número de células de Leydig, encargadas de sintetizar testosterona, razón por la cual podría justificarse la disminución de testosterona observada (Dutta y col., 2006). Esta hipótesis también fue planteada por Trentacoste y col. (2001), a raíz de observar una disminución en la testosterona intratesticular provocada por la ingesta de atrazina en ratas macho pre-púberes. Estos autores además postulan que tal disminución también podría ser a causa de una pérdida en la capacidad de sintetizar testosterona de las células de Leydig. Así, propusieron que la atrazina estaría produciendo una alteración en el eje hipotalámico-hipofisario, debido a que observaron una reducción en los niveles de la hormona luteinizante (LH), provocando un efecto secundario sobre las células de Leydig quienes responden al estímulo de LH para la síntesis de testosterona (Trentacoste y col., 2001). Estas mismas observaciones también fueron

demostradas tras exponer ratas a BPA en forma peri- y postnatal (Akingbemi y col., 2004). Adicionalmente, se demostró que la reducción de testosterona tanto testicular como circulante, no sólo se producía por una disminución en la secreción de la LH hipofisaria, sino además por una interacción entre BPA y el receptor de estrógeno, lo cual provocaba una inhibición de una enzima esteroidogénica (citocromo P450_{17 α} hidroxilasa) presente en células de Leydig, con la consecuente reducción de la síntesis de testosterona (Akingbemi y col., 2004).

La disminución en los niveles de testosterona también podría explicarse a través de modificaciones en la concentración de la enzima aromatasa (Hayes y col., 2002; Spanò y col., 2004). Se ha demostrado que la exposición a estrógenos puede inducir la expresión génica de la aromatasa testicular en peces de manera dosis dependiente (Halm y col., 2002). Sin embargo, mientras algunos autores encuentran un aumento en el E2 circulante como consecuencia de la actividad de la aromatasa (Spanò y col., 2004), otros no observaron un aumento de E2 (Hecker y col., 2005a), rechazando de este modo la hipótesis planteada que responsabiliza a la actividad de la aromatasa de la disminución de T. Mayores evidencias que estarían de acuerdo con una estimulación de la actividad enzimática se encontraron en peces macho expuestos a octilfenol, debido a que presentaron niveles de T disminuidos y aumentados los de E2 (Mills y col., 2001). A su vez, se registró un incremento de la actividad aromatasa gonadal en machos aligatores, a niveles similares a los detectados en hembras controles luego de exponerlos en forma embrionaria a atrazina (Crain y col., 1997). Estas evidencias convierten a la medición de la actividad de la enzima aromatasa en una herramienta útil para justificar las alteraciones en los niveles de testosterona, por lo que sería muy interesante esta evaluación para complementar nuestro trabajo.

Otro posible mecanismo que podría encontrarse afectado es la biotransformación hepática. Debido a que es regulada por los esteroides sexuales y se establece durante el desarrollo, este sistema es potencialmente susceptible a la perturbación de agentes hormonalmente activos provocando alteraciones organizacionales (Guillette y col., 1995a). Una alteración organizacional sería aquella provocada en animales obtenidos por reversión sexual, los cuales fueron

tratados *in ovo* con E2 y se incubaron a 33°C (temperatura de obtención de machos), cuya morfología gonadal y los niveles hormonales circulantes se correspondía a con un perfil de hembra y se mantuvo en el tiempo. Asimismo, los xenoestrógenos pueden tener efectos transitorios, induciendo enzimas encargadas de la biotransformación de los compuestos hormonalmente activos que además juegan un rol importante en la inactivación de los esteroides endógenos (Guillette y Gunderson, 2001). Esto podría justificar las diferencias observadas en los niveles hormonales entre los animales de 1 año y los animales de 10 días de edad sometidos a los mismos tratamientos, donde las alteraciones hormonales observadas no se corresponden a los mismos grupos experimentales. En este análisis no se puede descartar que los perturbadores endocrinos usados hayan producido efecto a nivel de la glándula suprarrenal, que en los vertebrados es otra fuente de hormonas esteroides.

En resumen, las alteraciones tanto organizacionales como activacionales producidas por la exposición a xenoestrógenos podrían conducir a modificaciones en diferentes niveles de regulación de las concentraciones circulantes, la biodisponibilidad y/o el *clearance* de T y E2, perturbando los mecanismos de señalización normal que coordinan los procesos fisiológicos en el organismo.

5.3.5 Alteraciones transitorias y permanentes de los biomarcadores.

Los contaminantes ambientales hormonalmente activos pueden alterar el desarrollo, el metabolismo y la fisiopatología de los órganos y sistemas hormonodependientes. El hecho que numerosos sistemas se encuentren afectados por mezclas complejas de agentes químicos en el medioambiente, indica que es necesario un gran número de investigaciones interdisciplinarias y en diferentes especies para comprender las implicancias de la perturbación endocrina. Además, la selección del biomarcador y del momento en el cual es evaluado es crítico a la hora de definir un efecto. Guiados por estos conceptos hemos realizado estudios en animales de laboratorio, de nuestra fauna y en humanos (Beldoménico y col., 2007; Durando y col., 2007; Markey y col., 2001;

Muñoz-de-Toro y col., 2005; 2006a; b; Ramos y col., 2001; 2003; Stoker y col., 2003).

En esta tesis, presentamos los resultados del estudio de una especie de nuestra fauna a la que pretendemos caracterizar como centinela de contaminación por xenoestrógenos. Para este fin, además de identificar los biomarcadores, es de suma utilidad definir cuales presentan cambios transitorios y cuales permanentes. Observamos que las hembras producidas por reversión sexual, tanto por BPA como por E2, presentaron alteraciones permanentes (organizacionales) que no permiten distinguir las de las hembras obtenidas por temperatura. Además, es interesante resaltar que hembras y machos de 10 días de edad sometidos a tratamientos con E2 y BPA presentaron alteraciones de sus niveles hormonales que no se mantuvieron a los 12 meses, evidenciando que las alteraciones observadas en las crías fueron “corregidas” y/o enmascaradas por mecanismos compensadores. Por otro lado, observamos alteraciones en los niveles hormonales que fueron evidentes sólo en animales de 12 meses de edad. Estos resultados sugieren la posibilidad de que ocurran alteraciones reversibles o transitorias en los niveles hormonales o que el medio endocrino endógeno regule la expresión de una alteración organizacional.

En mamíferos, hay numerosas evidencias que demuestran efectos observados a largo plazo que son el resultado de la exposición a perturbadores endocrinos durante la vida prenatal (Durando y col., 2007; Knobil, 1999; Markey y col., 2001; 2003; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Ramos y col., 2001; 2003). En roedores pre-púberes y adultos expuestos perinatalmente a dosis ambientalmente relevantes de BPA se observaron alteraciones permanentes en la morfogénesis de la glándula mamaria que predisponen al desarrollo de lesiones neoplásicas (Durando y col. 2007; Muñoz-de-Toro y col., 2005) y en el tracto genital de crías que son observadas durante la vida adulta y que afectan a las funciones del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, pudiendo contribuir a anomalías en los animales adultos cuya exposición a BPA finalizó hace tiempo (Markey y col., 2003; 2005). Por otro lado, se observó un patrón de diferenciación alterado de células estromales periductales de la próstata ventral en ratas pre-púberes expuestas

prenatalmente a BPA (Ramos y col., 2001) y efectos transitorios sobre niveles de prolactina y T, sugiriendo que una exposición prenatal a dosis ambientalmente relevantes de BPA inducen cambios transitorios y permanentes en el eje reproductivo de machos (Ramos y col., 2003).

Un creciente número de publicaciones muestran que los xenoestrógenos actúan a través de los receptores de estrógeno α y/o β (Krishnan y col., 1993; Kuiper y col., 1998; Soto y col., 1994). Usando un modelo *in vitro* para estudiar activación de la vía del receptor de estrógenos α a través de la expresión de un gen reportero, se demostró que niveles bajos de xenoestrógenos pueden actuar aditivamente con otros xenoestrógenos y con estrógenos naturales (Rajapakse y col., 2002). Efectos comparables también han sido demostrados en otros modelos (Matter y col., 1998; Vonier y col., 1996). De esta manera, la presencia de contaminantes ambientales puede confundir la interpretación de una dosis de estudio controlada experimentalmente debido a que, los individuos generalmente, están expuestos a múltiples xenoestrógenos, y esta asociación es la que determina la intensidad de los efectos (Soto y col., 1997). En el presente estudio, seleccionamos BPA, endosulfán y atrazina como modelos individuales de exposición a un único xenoestrógeno, intentando minimizar cualquier efecto promovido por la asociación con otros químicos. Sin embargo, la presencia de otros perturbadores endocrinos en los huevos de los yacarés, provenientes de una posible transferencia desde la misma madre, no puede ser descartada totalmente. Se tomaron todos los recaudos posibles para minimizar las posibilidades de exposición; cosechando nidos de zonas de baja probabilidad de contaminación ambiental. Futuros estudios con asociaciones de compuestos serían de gran relevancia. Además, sería interesante estudiar la sensibilidad en la detección de cambios en los perfiles hormonales en animales juveniles expuestos prenatalmente a xenoestrógenos, frente a un nuevo estímulo estrogénico (por ejemplo: exposición postnatal a xenoestrógenos), tal como fuera observado el efecto de diferentes dosis de E2 sobre la inducción de Vtg en animales juveniles.

En nuestro estudio en *C. latirostris*, las perturbaciones producidas por los contaminantes evaluados en las dosis relevantes para el medioambiente fueron

evidentes en la pérdida fraccional del peso de los huevos, por posibles alteraciones metabólicas en el embrión, la histoarquitectura testicular y en los niveles hormonales de animales de 10 días de edad. Esto último nos permite alertar sobre la existencia de un riesgo potencial de alteraciones sobre el sistema reproductivo y endocrino de yacarés expuestos a químicos que contaminan la región Litoral de la Argentina (región con elevado desarrollo agroindustrial).

Varias preguntas quedan por ser respondidas sobre las posibles diferencias entre especies respecto a la sensibilidad a estrógenos ambientales y sus efectos a largo plazo.