

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATZ	Atrazina
BPA	Bisfenol A
BrdU	bromodeoxiuridina
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
col.	Colaboradores
DAB	Diaminobencidina
DDE	Diclorodifenildicloroetano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DES	Dietilelbestrol
E2	17 β -estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Etinil estradiol
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
END	Endosulfán
EPA	Environmental Protection Agency
E-SCREEN	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad estrogénica que evalúa proliferación de células MCF-7.
etc	Etcétera
g	Gramo
GAM	Gonadal-Adrenal-Mesonefros
h	Horas
IHQ	Inmunohistoquímica
KDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
LH	Hormona luteinizante
LHC	Largo hocico-cloaca

LT	Largo total
MCF-7	Línea celular de carcinoma de mama cuyo crecimiento es estrógeno dependiente.
mg	Miligramo
N°	Número
ng	nanogramo
NHS	N-hidroxisuccinimida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino con el agregado de Tween
PCBs	Bifenilos policlorados
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pg	Picogramos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPC	Peso fraccional de la cría de yacaré
PPF	Pérdida de peso fraccional
ppm	Partes por millón
RIA	Radioinmunoanálisis
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar medio
T	Testosterona
TBS	Tris buffer salino
TBST	Tris buffer salino con el agregado de Tween
Vtg	Vitelogenina
μg	microgramo

INDICE DE TABLAS

	TÍTULO	Página
TABLA 1	Efectos de la exposición natural o experimental a de perturbadores endocrinos en diferentes especies	4
TABLA 2	Estructuras químicas de agentes con actividad estrogénica	9
TABLA 3	Observaciones de la acción de BPA en animales	11
TABLA 4	Observaciones de la acción de endosulfán en animales	14
TABLA 5	Observaciones de la acción de atrazina en diversos organismos	16
TABLA 6	Determinación de actividad estrogénica de compuestos por diferentes métodos	17
TABLA 7	Ventajas y limitaciones de los diferentes métodos para determinar actividad estrogénica	18
TABLA 8	Técnica inmunohistoquímica para detectar Vtg	49
TABLA 9	Características de los machos <i>C. latirostris</i> .	58
TABLA 10	Características de los hembras <i>C. latirostris</i> .	59
TABLA 11	Esquema de topicación de tratamientos en huevos <i>C. latirostris</i> en etapa 20 de desarrollo embrionario	64
TABLA 12	Tratamiento de huevos <i>C. latirostris</i> en etapa 20 de desarrollo embrionario	65
TABLA 13	Técnica inmunohistoquímica para la determinación de BrdU	72
TABLA 14	Características de los nidos y del hábitat	98
TABLA 15	Nacimientos y variables alométricas	99
TABLA 16	Niveles de E2 circulante en hembras y machos de diferentes edades	109
TABLA 17	Niveles de T circulante en hembras y machos de diferentes edades	110

INDICE DE FIGURAS

	TÍTULO	Página
FIGURA 1:	Mecanismo de acción de las hormonas esteroides endógenas y los posibles sitios de alteración de los perturbadores endocrinos	8
FIGURA 2:	Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> en Latinoamérica	22
FIGURA 3:	Fotografía de un ejemplar adulto de <i>C. latirostris</i>	23
FIGURA 4:	Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> en Argentina	24
FIGURA 5:	Representación esquemática de la síntesis de vitelogenina en animales ovíparos	27
FIGURA 6:	Presencia de cámara de aire formada entre la membrana corioalantoidea y la cáscara de un huevo de <i>Caiman latirostris</i>	29
FIGURA 7:	Determinación sexual en huevos incubados a 33°C en condiciones control y en presencia de xenoestrógenos	31
FIGURA 8:	Síntesis, secreción y biodisponibilidad de esteroides sexuales	36
FIGURA 9:	Esquema de tratamiento realizado para obtener Vtg en las hembras juveniles	40
FIGURA 10:	Toma de muestra de sangre del seno occipital de un yacaré juvenil	41
FIGURA 11:	Especies de tortugas utilizadas para la evaluación de la reacción cruzada del anticuerpo	47
FIGURA 12:	Esquema del ELISA de competición	52
FIGURA 13:	Mantenimiento de crías <i>C. latirostris</i> en condiciones de laboratorio	53
FIGURA 14:	Esquema del tratamiento recibido por las crías <i>C. latirostris</i>	54
FIGURA 15:	Evaluación del sexo de tortugas <i>T. scripta</i> adultas	55
FIGURA 16:	Representación esquemática e imagen macroscópica de genitales internos de hembra <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	56
FIGURA 17:	Delimitación de los bordes apical y basal del epitelio del oviducto	57
FIGURA 18:	Ejemplares de <i>C. latirostris</i> en un invernáculo del refugio El Cachapé	58
FIGURA 19:	Cosecha de huevos a campo	60

FIGURA 20:	Incubadora con el instrumental requerido para mantener la temperatura y humedad constantes	61
FIGURA 21:	Representación esquemática de la determinación sexual en <i>C. latirostris</i>	62
FIGURA 22:	Apertura de huevos de <i>C. latirostris</i> para determinar el estadio embrionario	63
FIGURA 23:	Embrión <i>C. latirostris</i> en etapa 20 de desarrollo. Topicación	63
FIGURA 24:	Genitales internos de hembra y macho en <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	67
FIGURA 25:	Microfotografías a bajo aumento de complejos GAM de crías <i>C. latirostris</i>	68
FIGURA 26:	Delimitación del perímetro de los túbulos seminíferos	69
FIGURA 27:	Microfotografía de un corte histológico de testículo de <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	73
FIGURA 28:	Metodología para la detección de células en apoptosis	75
FIGURA 29:	Separación electroforética de muestras plasmáticas de hembras yacaré juveniles por SDS-PAGE	80
FIGURA 30:	Separación electroforética de muestras plasmáticas de hembras yacaré juveniles en condiciones nativas	81
FIGURA 31:	Separación electroforética de muestras obtenidas en cada paso de la purificación por precipitación	82
FIGURA 32:	Purificación por cromatografía de intercambio iónico	83
FIGURA 33:	Evaluación de la pureza del anticuerpo anti-Vtg	84
FIGURA 34:	Caracterización del anticuerpo obtenido por western blot	85
FIGURA 35:	Determinación de Vtg en tortugas juveniles <i>P. hylarii</i> y <i>T. scripta</i>	86
FIGURA 36:	Expresión hepática de Vtg	87
FIGURA 37:	Titulación del anticuerpo primario utilizando diferentes cantidades de Vtg en la fase sólida	88
FIGURA 38:	Curva de calibrado de ELISA competitivo	89
FIGURA 39:	Detección de Vtg <i>in situ</i> por inmunohistoquímica en machos juveniles tratados con E2	91
FIGURA 40:	Detección de Vtg plasmática en crías hembras	92
FIGURA 41:	Inmunodetección de Vtg en hígado de crías hembras tratadas con E2	93

FIGURA 42	Determinación de Vtg en tortugas <i>P. hylarii</i> silvestres, sexualmente maduras	94
FIGURA 43:	Imagen macroscópica del complejo GAM y oviducto de crías <i>C. latirostris</i> hembra	95
FIGURA 44:	Microfotografías de porciones de oviducto de las crías sometidas a diferentes tratamientos	95
FIGURA 45:	Variación de la altura promedio del epitelio del oviducto	96
FIGURA 46:	Efecto de la estimulación estrogénica sobre la actividad proliferativa del epitelio oviductal	96
FIGURA 47:	Aumento en la actividad proliferativa del epitelio oviductal en respuesta al estímulo estrogénico	97
FIGURA 48:	Crías de <i>C. latirostris</i> recién nacidas	99
FIGURA 49:	Representación gráfica de la variación del peso fraccional de los huevos y del peso fraccional de las crías	100
FIGURA 50:	Microfotografía de testículo de <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	102
FIGURA 51:	Microfotografías representativas de testículos de <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	103
FIGURA 52:	Representación gráfica del perímetro tubular de testículos de los animales expuestos a diferentes tratamientos	103
FIGURA 53:	Caracterización de células mioides por expresión de desmina y α -actina en animales controles de 10 días y 12 meses de edad	104
FIGURA 54:	Expresión de desmina en testículos de <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad sometidos a diferentes tratamientos	105
FIGURA 55:	Representación gráfica del porcentaje de células que expresan desmina relativas al perímetro tubular	106
FIGURA 56:	Determinación de incorporación de BrdU como marcador de proliferación celular	107
FIGURA 57:	Efectos de la exposición a agroquímicos <i>in ovo</i> sobre la actividad proliferativa de las células de los túbulos seminíferos	107
FIGURA 58:	Porcentaje de células en apoptosis intratubular. Relación proliferación celular/apoptosis en los túbulos seminíferos	108
FIGURA 59:	Estradiol circulante en hembras y machos	109
FIGURA 60:	Testosterona circulante en hembras y machos de diferentes	110

	edades	
FIGURA 61:	Representación gráfica de los niveles de E2 sérico en crías hembra de 10 días tratadas <i>in ovo</i> con diferentes agentes	111
FIGURA 62:	Niveles de T circulante en machos <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad	112
FIGURA 63:	Niveles de T circulante en hembras <i>C. latirostris</i> de 10 días de edad.	113
FIGURA 64:	Niveles de T circulante en hembras de 1 año de edad controles y obtenidas por reversión sexual	114
FIGURA 65:	Niveles de E2 circulante en hembras controles y obtenidas por reversión sexual de 1 año de edad	114
FIGURA 66:	Determinación de hormonas esteroides circulantes en hembras de 1 año de edad sometidas a diferentes concentraciones de E2 <i>in ovo</i>	115
FIGURA 67:	Determinación de hormonas esteroides sexuales circulantes en <i>C. latirostris</i> de 1 año de edad controles y tratados a E2 0.014ppm <i>in ovo</i>	116
FIGURA 68:	Testosterona y E2 en hembras de 1 año de edad controles y tratadas con diferentes concentraciones de BPA <i>in ovo</i>	117
FIGURA 69:	Testosterona y E2 circulantes en animales de 1 año de edad controles y tratados con BPA 1,4ppm <i>in ovo</i>	118

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1. Perturbadores endocrinos	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Primeras evidencias de perturbación endocrina	2
1.3 Efectos de los perturbadores endocrinos	3
1.4 Xenoestrógenos	6
1.4.1 Efectos organizacionales y activacionales	6
1.4.2 Mecanismos de de acción	6
1.4.2.1 Estrógenos endógenos <i>versus</i> xenoestrógenos	6
1.4.3 Estructuras químicas	8
1.4.4 Xenoestrógenos seleccionados: Bisfenol A, Endosulfán, y Atrazina	9
1.4.4.1 Bisfenol A	9
1.4.4.2 Endosulfán	12
1.4.4.3 Atrazina	15
1.4.5 Detección y monitoreo de xenoestrógenos	16
1.4.5.1 Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	16
1.4.5.2 Marcadores biológicos de exposición	18
1.5 Organismos centinelas	19
1.5.1 Reptiles como centinela	21
1.6 Yacaré overo posible centinela de contaminación por xenoestrógenos	21
1.6.1 Generalidades de la especie	21
1.6.2. Biología reproductiva	23
1.6.3. Distribución geográfica y problemática	24
1.6.4. ¿Por qué el yacaré sería buen centinela?	25
1.7 Biomarcadores de exposición pre- y/o postnatal a xenoestrógenos	26
1.7.1 Inducción de Vitelogenina	26
1.7.2 Peso de los huevos	29
1.7.3 Determinación sexual	30
1.7.4 Histoarquitectura gonadal	31

1.7.5 Niveles hormonales	33
1.7.5.1 Función de las hormonas endógenas	34
1.7.5.2 Alteración de niveles hormonales por xenoestrógenos	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 Hipótesis de trabajo y objetivo general	38
2.1.1 Objetivos específicos	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1 Desarrollo de métodos para evaluar vitelogenina	40
3.1.1 Animales	40
3.1.2 Protocolo de inducción de Vtg en hembras sexualmente inmaduras	40
3.1.2.1 Obtención de plasma	41
3.1.3 Identificación de Vtg	41
3.1.3.1 Electroforesis nativa y desnaturalizante	42
3.1.3.2 Determinación de proteínas totales	42
3.1.4 Purificación de Vtg	43
3.1.4.1 Precipitación salina	43
3.1.4.2 Cromatografía de intercambio iónico	44
3.1.5 Generación del anticuerpo anti-Vtg	44
3.1.6 Western blot para la detección de Vtg	46
3.1.7 Actividad cruzada del anticuerpo LETHW 03-07	46
3.1.7.1 Animales	46
3.1.7.2 Evaluación de la reacción cruzada	47
3.1.8 Dot blot para monitoreo de Vtg	47
3.1.9 Obtención y procesamiento de muestras de tejido	48
3.1.10 Inmunohistoquímica para detección de Vtg <i>in situ</i>	48
3.1.11 Desarrollo del enzimoimmunoanálisis (ELISA)	50
3.1.11.1 Selección del buffer y la cantidad de antígeno para la sensibilización de placas	50
3.1.11.2 Determinación del título de anticuerpo	50
3.1.11.3 ELISA competitivo	51
3.1.12 Aplicación de las metodologías desarrolladas	52
3.1.12.1 Inducción de Vtg en yacarés macho juveniles	52
3.1.12.1.1 Animales	52
3.1.12.1.2 Protocolo de tratamiento y evaluación	52

3.1.12.2 Inducción de Vtg en crías hembra de yacaré overo	53
3.1.12.2.1 Animales	53
3.1.12.2.2 Protocolo de tratamiento	53
3.1.12.2.3 Evaluación de la inducción de Vtg	53
3.1.12.3 Niveles de Vtg en tortugas silvestres adultas durante la estación reproductiva	54
3.1.12.3.1 Animales	54
3.1.12.3.2 Evaluación de la reacción	55
3.2 Identificación de órganos blanco de acción de estrógenos en el tracto reproductor femenino	55
3.2.1 Evaluación de la altura del epitelio del oviducto	56
3.2.2 Evaluación de la proliferación celular en el oviducto	57
3.3 Determinación de biomarcadores de exposición prenatal a contaminantes.	58
3.3.1 Animales	58
3.3.2 Procedimiento para la incubación de los huevos	60
3.3.3 Determinación de estadios embrionarios	62
3.3.4 Diseño de los tratamientos <i>in ovo</i>	64
3.3.4.1 Exposición prenatal a un xenoestrógeno de uso industrial: Bisfenol A	64
3.3.4.2 Exposición prenatal a agroquímicos: Endosulfán y Atrazina	65
3.3.5 Nacimiento de las crías. Identificación, caracterización y mantenimiento	66
3.3.6 Obtención de muestras	66
3.3.7 Determinación del sexo.	67
3.3.7.1 Sexado por evaluación macroscópica de genitales internos	67
3.3.7.2 Sexado por evaluación histológica de genitales internos	68
3.3.7.3 Sexado por evaluación macroscópica de genitales externos	68
3.3.8 Evaluación de histoarquitectura gonadal de machos.	69
3.3.8.1 Morfometría de los testículos	69
3.3.8.2 Caracterización de las células mioides	70
3.3.8.3 Evaluación del “ <i>turnover</i> ” celular (proliferación/apoptosis)	71
3.3.8.3.1 Proliferación celular por inmunohistoquímica	62
3.3.8.3.2 Evaluación de apoptosis in situ por el método de TUNEL	73
3.3.9 Niveles séricos de estrógenos y testosterona evaluados por radioinmunoanálisis (RIA)	75
3.3.10 Análisis estadístico	77

4. RESULTADOS	78
4.1 Evaluación de Vtg como biomarcador	79
4.1.1 Inducción de síntesis e identificación	79
4.1.2 Purificación de Vtg	81
4.1.3 Generación del anticuerpo anti-Vtg	83
4.1.4 Caracterización del anticuerpo	84
4.1.4.1 Western blot y dot blot	84
4.1.4.2 Actividad cruzada del anticuerpo LETHW 03-07	85
4.1.4.3 Inmunohistoquímica	86
4.1.4.4 Desarrollo del ELISA	87
4.1.4.4.1 Determinación de buffer de sensibilización	87
4.1.4.4.2 Determinación del título de anticuerpo primario	87
4.1.4.4.3 ELISA competitivo	88
4.1.5 Aplicación de las metodologías desarrolladas	90
4.1.5.1 Inducción de Vtg en yacarés macho juveniles	90
4.1.5.2 Inducción de Vtg en crías hembra de yacaré overo	91
4.1.5.3 Niveles de Vtg en tortugas silvestres adultas en estación reproductiva	93
4.2 Identificación de órganos blanco de acción de estrógenos en el tracto reproductor femenino	94
4.2.1 Evaluación de la altura del epitelio del oviducto	95
4.2.2 Evaluación de la proliferación celular en el oviducto	96
4.3 Determinación de biomarcadores de exposición prenatal	97
4.3.1 Características de los nidos cosechados	97
4.3.2 Incubación	98
4.3.3 Nacimientos y variables alométricas	98
4.3.4 Determinación sexual	101
4.3.4.1 Efecto de los tratamientos in ovo con pesticidas sobre la determinación sexual	101
4.3.5 Efectos sobre la histoarquitectura gonadal de machos	101
4.3.5.1 Evaluación del perímetro de los túbulos seminíferos	101
4.3.5.2 Caracterización de las células mioides en el estroma del testículo	104
4.3.5.3 Evaluación del recambio celular intratubular	106
4.3.5.3.1 Evaluación de la proliferación celular	106
4.2.5.3.2 Determinación de muerte celular programada o apoptosis	107

4.3 Niveles circulantes de hormonas esteroides sexuales	108
4.3.1 Perfiles hormonales normales	108
4.3.1.1 Estrógenos	109
4.3.1.2 Testosterona	110
4.3.2 Efecto de exposición <i>in ovo</i> a contaminantes sobre los niveles de hormonas esteroides sexuales en crías de 10 días de edad	110
4.3.2.1 Estrógenos	111
4.3.2.2 Testosterona	112
4.3.3 Efectos a largo plazo de la exposición <i>in ovo</i> a contaminantes de uso agro-industrial	113
4.3.3.1 Hembras nacidas por reversión sexual	113
4.3.3.1.1 Testosterona	113
4.3.3.1.2. Estradiol	114
4.3.3.2. Efectos de la exposición a E2 <i>in ovo</i> sobre los niveles hormonales de machos y hembras	115
4.3.3.3. Efectos de la exposición a bisfenol A <i>in ovo</i> sobre los niveles hormonales de machos y hembras	116
5. DISCUSIÓN	119
5.1 Evaluación de Vtg como biomarcador	120
5.2 Evaluación de exposición a E2 sobre el oviducto	128
5.3 Biomarcadores de exposición prenatal a perturbadores endocrinos	129
5.3.1 Alteraciones en el peso de los huevos	130
5.3.2 Efectos de los pesticidas sobre la determinación sexual	132
5.3.3 Alteraciones en la histoarquitectura gonadal de machos	133
5.3.4 Alteraciones en los perfiles homonales	136
5.3.5 Alteraciones transitorias y permanentes de los biomarcadores	143
6. CONCLUSIONES	147
7. RESUMEN	150
8. ABSTRACT	158
9. BIBLIOGRAFÍA	165