



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DEL LITORAL**

**FACULTAD DE BIOQUÍMICA  
Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y  
TUMORES HORMONODEPENDIENTES**

**EXPOSICIÓN NATURAL Y EXPERIMENTAL A  
COMPUESTOS AGROINDUSTRIALES: EFECTOS  
SOBRE VARIABLES BIOQUÍMICAS Y  
PARÁMETROS DIMÓRFICOS DE RELEVANCIA  
EN LA REPRODUCCIÓN DE *CAIMAN  
LATIROSTRIS*.**

**AUTOR: LIC. ZAYAS MARCELO ALEJANDRO.**

**DIRECTOR: DRA. MÓNICA MUÑOZ DE TORO.**

**CO-DIRECTOR: DR. HORACIO RODRÍGUEZ**

**SANTA FE**

## **Agradecimientos**

A mis directores, la Dra. Mónica Muñoz de Toro, el Dr. Horacio Rodríguez y al Dr. Enrique H. Luque, director del LETH, quienes generosamente me abrieron las puertas de sus laboratorios y me brindaron todo el apoyo y la confianza necesarios para poder crecer.

A mis queridos amigos y compañeros del LETH con quienes tuve el placer de compartir estos años y que con un único párrafo no basta para agradecerles, y poder expresar las vivencias pasadas, Milena Durando, Jorgelina Varayoud, Verónica Bosquiazzo, Laura Kass, Cora Stoker, Germán Galoppo, Lucas Monje, Horacio Rodríguez, Marianela González, Juan Carlos Villarreal, Guillermo Moreno-Piovano, Adriana Pereyra, Virginia Perdomo, Mercedes Milessi, Juan Grant, Guillermina Canesini y muy especialmente quiero agradecer a Guillermo Ramos por su enorme generosidad y consejos.

A los integrantes de los diferentes Proyectos Yacaré sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible, en Chaco: Walter Prado, en Entre Ríos: Yolanda Querchi.

A la *Morris Animal Foundation*, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgar los subsidios y becas necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, por haber hecho posible la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron, brindando su tiempo y consejos y me hicieron sentir orgulloso de esta etapa de mi vida.

A mi familia que sin dudarlos me apoyaron desde el inicio de esta nueva etapa en mi vida y a Dios, por el don de la fe.

## LISTADO DE PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han sido presentados en congresos de distintas sociedades científicas y/o han sido publicados en revistas indexadas del área:

### Presentaciones a Congresos:

“Efecto de bisfenol A sobre biomarcadores de exposición a xenoestrógenos en yacaré overo (*Caiman latirostris*)”. González M, Rey F, **Zayas M**, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. 2006. *Medicina* (Buenos Aires) Vol. 66 Supl. II p. 171, 2006.

“Alteraciones en la histoarquitectura testicular de yacaré y en los niveles de testosterona por exposición embrionaria a agroquímicos”. Rey F, González M, **Zayas M**, Stoker C, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. 2006. *Medicina* (Buenos Aires) Vol. 66 Supl. II p. 172, 2006.

“Efecto de agroquímicos sobre la supervivencia del yacaré overo”. **Zayas M**, Rey F, Gonzalez M, Villarreal JC, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. IX Reunión Argentina de Ciencias Naturales y Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Paraná. 2006.

“Morfología y características citoquímicas de las células sanguíneas de *Caiman latirostris*”. **Zayas M**, Rodríguez HA, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Córdoba. 2008. *International Journal of Morphology* 26(3):769. 2008.

“Contaminantes agro-industriales clasificados como perturbadores endocrinos (PE) y sus efectos sobre parámetros hematológicos e inmunológicos de yacaré overo (*Caiman latirostris*)”. **Zayas M**, Rodríguez H,

Galoppo G, Luque E, Muñoz-de-Toro M. II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Mar del Plata. 2008.

“Prenatal Exposure to Pesticides Disrupts Gonadal Histoarchitecture and Alters Testosterone Levels in Male *Caiman latirostris*”. Luque EH, Rey F, González M, **Zayas M**, Stoker C, Durando M, Muñoz-de-Toro M. Internacional EcoHealth Forum, pag. 69. Mérida (México). 2008

“Organochlorine Compound Residues in Eggs of Broad Snouted Caimans (*Caiman latirostris*)”. Muñoz-de-Toro M, Stoker C, García SR, **Zayas M**, Repetti MR, Galoppo GH, Beldoménico HR, Luque EH. Internacional EcoHealth Forum, pag. 158. Mérida (México). 2008.

“Organochlorine compound egg burden and eggshell features in *Caiman latirostris*”. **MA Zayas**, C Stoker, MA Ferrerira, M Durando, GH Galoppo, HA Rodríguez, HR Beldoménico, EG Caldini, EH Luque, M Muñoz-de-Toro. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. Santa Fe. 2009.

“Organochlorine compound residues in eggs of broad snouted caimans (*Caimans latirostris*) and bioindicators of reproductive performance”. Stoker C, **MA Zayas**, SR García, MR Repetti, GH Galoppo, M Durando, HR Beldoménico, EH Luque, M Muñoz-de-Toro. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. Santa Fe. 2009.

“Efectos de la exposición postnatal temprana a Bisfenol A (BPA) sobre la expresión de receptores de hormonas esteroides en oviducto de *Caiman latirostris* (Yacaré Overo)”. Galoppo G, Stoker C, **Zayas MA**, Durando M, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2009.

“Efecto de contaminantes agro-industriales, sobre la función tiroidea de yacaré overo (*Caiman latirostris*)”. Osti M, **Zayas MA**, Galoppo G, Wals F, Stoker C, Luque EH, Muñoz-de-Toro MM. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Santa Fe. 2010.

“Efecto de la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales sobre el oviducto de yacaré overo (*Caiman latirostris*)”. Galoppo G, Stoker C, **Zayas MA**, Luque EH, Muñoz-de-Toro MM. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Santa Fe. 2010.

“Ontogenia de la expresión de los receptores para estrógenos y andrógenos y actividad proliferativa en el testículo de yacaré overo”. Durando, M; **Zayas, M**; Galoppo, G; Stoker, C; Rodríguez, H; Ramos, J; Luque, E; Muñoz-de-Toro, M. LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. 2010. Medicina (Bs. As.) 70 (Suppl. II):213, 2010.

“Alteraciones en genitales externos de yacaré overos expuestos *in ovo* a agroquímicos”. **Zayas, M**; Durando, M; Galoppo, G; Stoker, C; Rodríguez, H; Luque, E; Muñoz-de-Toro, M. LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. 2010. Medicina (Bs. As.) 70 (Suppl. II):213, 2010.

#### ***Publicaciones en revistas internacionales indexadas en ISI.***

“Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*”. Stoker C, Beldoménico PM, Bosquiazzo VL., **Zayas M**, Rey F, Rodríguez H, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. *General and Comparative Endocrinology* 156(3): 603-612, 2008.

“Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*”. Rey, F., González, M., **Zayas, M.A.**, Stoker, C., Durando, M., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M. *General and Comparative Endocrinology* 162 (3): 286-292, 2009.

“Organochlorine Compound Residues in the Eggs of Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*) and Correlation with Measures of Reproductive

Performance". Stoker C, Repetti MR, García SR, **Zayas MA**, Galoppo GH, Beldoménico HR, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. *Chemosphere* 84(3): 311-317, 2011.

"Hematology and Blood Biochemistry of Young Healthy Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*)". **Zayas M**, Rodríguez HA, Galoppo GH, Stoker C, Durando M, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. *Journal of Herpetology* 45(4): 516-524, 2011.

<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b>	I
<b>INDICE DE TABLAS</b>	V
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	VII
<b>1- INTRODUCCION</b>	
1.1 Perturbadores endocrinos.	1
1.1.1- Generalidades.	1
1.1.2- Consecuencias de la exposición a PE.	3
1.2- Xenoestrógenos.	9
1.2.1- Generalidades.	9
1.2.2- Relación estructura-acción estrogénica.	11
1.3- Perturbadores endocrinos seleccionados para esta tesis.	14
1.4- Compuestos organoclorados (COCs): Pesticidas y compuestos de origen industrial.	14
1.5- Endosulfán.	15
1.6- Atrazina.	18
1.7- Bisfenol-A.	20
1.8- Organismos Centinelas.	24
1.8.1- Generalidades.	24
1.8.2- Reptiles como centinelas de contaminación ambiental.	26
1.9- Biomarcadores de exposición y de efecto de PE.	29
1.9.1- Generalidades.	29
1.9.2- Biomarcadores de exposición a PE.	32
1.9.2.1- Concentración de COCs.	32
1.9.3- Biomarcadores de Efecto a PE.	33
1.9.3.1- Características de la cáscara del huevo: grosor y densidad de poros.	33
1.9.3.2- Parámetros de éxito reproductivo.	34
1.9.3.3- Características de genitales externos.	34
1.9.3.4- Características craneofaciales de <i>C. latirostris</i> .	36
1.9.3.4.1- Dimorfismo craneal.	36
1.9.3.4.2- Malformaciones orofaciales.	37
1.9.3.5- Perfil hematológico, bioquímico e inmunológico.	38
1.9.3.5.1- Componentes celulares sanguíneos.	39
1.9.3.5.2- Inmunidad humoral innata.	39
1.9.2.5.3- Marcadores bioquímicos.	41
1.10- El yacaré overo como organismo centinela de contaminación ambiental.	41
1.10.1- Descripción general.	42
1.10.2- Distribución geográfica.	44
1.10.3- Reproducción.	46
1.10.4- Razones que justifican la elección del yacaré overo como organismo centinela.	48
<b>2- OBJETIVOS</b>	
2.1- Hipótesis.	50
2.2- Objetivos Específicos	50

### **3- MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1- Diseño experimental.	52
3.2- Incubadoras: Optimización de las condiciones para la eclosión.	53
3.3- Huevos: Recolección en habitats naturales.	54
3.4 - Estadio embrionario.	55
3.5- Variables ecológicas.	57
3.6- Detección de residuos de compuestos organoclorados.	57
3.7- Características morfométricas de los huevos.	60
3.8- Características de la cáscara.	61
3.8.1- Grosor de la cáscara.	61
3.8.2- Densidad de poros de la cáscara.	62
3.9- Éxito reproductivo.	64
3.10- Topicación: Tratamientos <i>in ovo</i> e Incubación.	67
3.11- Eclosión asistida, cría en condiciones ambientales y sanitarias controladas y registro de variables alométricas.	69
3.12- Evaluación del crecimiento de los yacarés overos: ICC e IMC.	71
3.13- Órganos y variables sexualmente dimórficas.	72
3.13.1- Morfometría de genitales externos.	72
3.13.2- Medidas craneofaciales.	73
3.14- Perfil hematológico e inmunológico.	74
3.14.1- Extracción de sangre periférica.	74
3.14.2- Recuento de células sanguíneas.	75
3.14.2.1 Modificación del diluyente de Natt-Herrick.	76
3.14.3- Hematocrito.	77
3.14.4- Hemoglobina e índices hematimétricos	77
3.14.5- Componentes celulares sanguíneos y recuentos.	78
3.14.6- Tinciones Citoquímicas.	79
3.14.7- Morfometría de las células sanguíneas.	82
3.14.8- Evaluación de inmunidad humoral innata.	82
3.14.8.1- Optimización del método.	82
3.14.9- Química de la sangre.	85
3.15- Análisis estadístico.	89

### **4- RESULTADOS**

#### Exposición Natural

4.1- Variables ecológicas de nidos de <i>Caiman latirostris</i> en habitats naturales.	90
4.2- Detección de residuos de compuestos Organoclorados (COCs) en huevos.	91
4.3- Características de la cáscara.	93
4.4- Éxito reproductivo.	98
Exposición Experimental.	
4.5- Evaluación del crecimiento de los yacarés overos.	104
4.6- Morfometría de genitales externos.	108

4.6.1- La exposición a E2 1,4 ppm, prevalece sobre la influencia de la temperatura en la determinación del sexo.	111
4.6.2- La exposición a ATZ y END reduce el <i>phallus</i> de las hembras.	112
4.6.3- El <i>phallus</i> de las hembras tratadas con ATZ o END presenta dimorfismo sexual.	115
4.7- Medidas craneofaciales	118
4.7.1- La morfometría del cráneo de las hembras es modificada por la exposición a ATZ o END.	120
4.8- Perfil hematológico, inmunológico y analitos químicos de la sangre periférica.	121
4.8.1- Recuentos celulares.	124
4.8.2- Morfología, dimensiones y citoquímica de las células sanguíneas.	125
4.8.3- E2 Y ATZ provocan alteraciones en el número de GR y GB.	133
4.8.4- Inmunidad humoral innata.	135
4.8.5- Química de la sangre.	137
<b>5- DISCUSIÓN</b>	
Discusión de los resultados.	140
<b>6- CONCLUSIONES</b>	
Conclusiones.	158
<b>7-RESUMEN</b>	
Resumen en español.	160
Resumen en inglés.	171
<b>7- BIBLIOGRAFIA</b>	
Bibliografía.	181

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AHA	agentes hormonalmente activos
ALD	aldrín
ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
ATZ	atrazina
BCG	bromocresol
BPA	bisfenol A. di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano.
CAT	catalasa
CHCM	concentración media de hemoglobina corpuscular media
CHOD	colesterol oxidasa
CK	creatina quinasa
cm	centímetro
COCs	compuestos organoclorados
col	colaboradores
CW	ancho craneal
DCL	longitud craneal dorsal
DDD	diclorodifenildicloroetano
DDE	diclorodifenildicloroetano
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DES	dietilelbestrol
DLD	dieldrín
DMSO	dimetilsulfóxido
DSH	determinación sexual hormonal
DST	determinación sexual por temperatura
E2	17 $\beta$ -estradiol
ECD	detector de captura electrónico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EE2	ethinil estradiol
END	endosulfán
ENDR	endrina
ENDSULP	sulfato de endosulfán
EPA	Environmental Protection Agency
ERH	elementos de respuesta hormonal
g	gramo
G-6-P	glucosa-6-fosfato.
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GB	glóbulos blancos
GC-MS	sistema de cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masa

GOD	glucosa oxidasa
GPO	glicerolfosfato oxidasa
GPx	glutati3n peroxidasa
GR	gl3bulos rojos
GST	glutati3n-S-transferasa
HCB	hexaclorobenceno
HCH	hexaclorociclohexano
HCM	hemoglobina corpuscular media
Hct	hematocrito
HPLC	cromatograf3a l3quida de alta eficiencia
HPT	heptacloro
HTX	heptacloro ep3xido
IC	intervalos de confianza
ICC	3ndice de condici3n corporal
IMC	3ndice de masa corporal
IOW	Ancho m3nimo interorbital
IUPAC	Uni3n Internacional de Qu3mica Pura y Aplicada
Kg	kilogramo
LC	l3mite de cuantificaci3n
LCR	longitud craneal postorbital-paladar
LD	l3mite de detecci3n
LDH	lactato deshidrogenasa
LDH	lactato deshidrogenasa
LH	hormona luteinizante
LT	largo total
MEB	microscopio electr3nico de barrido
ml	mililitro
ML	longitud de la mand3bula.
mm	mil3metro
MRX	mirex
MTX	metoxicloro
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	nicotinamida adenina dinucle3tido
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
ng	nanogramo
Ni	niquel
NOAEL	nivel en el que no se observan efectos adversos
OCLD	oxiclordano
OCPs	pesticidas organoclorados
OH-PCB	hidroxi-bifenilo policlorado
OL	longitud m3xima orbital
OW	ancho m3ximo orbital

PAS	ácido peryódico de Schiff
PCBs	bifenilos policlorados
PE	perturbadores endocrinos
POD	peroxidasa.
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
Px	peroxidasa
RE	receptores para estrógenos
RE $\alpha$	receptores para estrógenos alfa
RE $\beta$	receptores para estrógenos beta
rpm	revoluciones por minutos
RRE	receptores relacionados a estrógenos
SBB	Sudán Black B
SL	longitud del hocico
SOD	superóxido dismutasa
SPE	cartucho de extracción de fase sólida
SRBCs	eritrocitos de oveja no sensibilizados
stub	porta muestras
SVL	largo desde el hocico hasta la cloaca. snout-vent-length
SW	ancho de la base del hocico
T°C	temperatura
TBT	tributiltin
TDE	tetraclorodifeniletano
TDI	ingesta diaria aceptable
Tpo <sub>inc</sub>	tiempo de incubación
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
UV-B	Luz ultravioleta tipo B
v/v	Volumen sobre volumen
VCM	volumen corpuscular medio
WN	Ancho máximo de las narinas externas
$\alpha$ -CLD	$\alpha$ -clordano
$\alpha$ -END	Alfa endosulfán
$\beta$ -END	Beta endosulfán
$\gamma$ -CLD	$\gamma$ -clordano
$\gamma$ GT	gamma glutamil transpeptidasa
®	Marca registrada
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
3 $\beta$ -OHS	3 beta hidroxio-esteroide deshidrogenada

## ÍNDICE DE FIGURAS

	TÍTULO	PAGINA
TABLA 1	Efectos de la exposición natural o experimental a PE en diferentes especies.	4
TABLA 2	Ejemplos de la acción de END en animales.	16
TABLA 3	Observaciones de la acción de ATZ en diversos modelos animales.	19
TABLA 4	Efectos del BPA en animales.	23
TABLA 5	Ejemplos de reptiles utilizados como organismos centinelas de contaminación.	28
TABLA 6	Etapas de la técnica de detección y cuantificación de COCs.	59
TABLA 7	Sustancias evaluadas mediante ensayos de citotoxicidad clásica.	80
TABLA 8	Sustancias evaluadas y metodologías utilizadas para las determinaciones de bioquímica clínica en suero de <i>Caiman latirostris</i> .	85
TABLA 9	Características de los nidos y grado de intervención antrópica en las diferentes provincias donde se realizan las cosechas.	90
TABLA 10	Concentración de compuestos organoclorados (COCs) en huevos de <i>C. latirostris</i> provenientes de zonas con diferente grado de intervención antrópica.	92
TABLA 11	Características de los nidos: identificación, tamaño de la nidada, peso, dimensiones de los huevos y peso del yacaré overo al nacer provenientes de las diferentes provincias donde se realizan las cosechas.	94
TABLA 12	Características de las nidadas: parámetros reproductivos y concentraciones de COCs.	98
TABLA 13	Características de la cáscara del huevo, parámetros de la viabilidad del nido y concentraciones de COCs en los nidos de <i>C. latirostris</i> .	101
TABLA 14	Análisis de correlación entre variables morfométricas	110

estructurales del *phallus* y parámetros de crecimiento de *C. latirostris*.

TABLA 15	Análisis de correlación entre medidas craneofaciales y parámetros de crecimiento de <i>C. latirostris</i> .	118
TABLA 16	Efecto de la exposición in ovo a compuestos agroindustriales, sobre las medidas cráneo–faciales de yacarés overos machos juveniles.	120
TABLA 17	Efecto de la exposición prenatal a compuestos agroindustriales, sobre las medidas cráneo–faciales de yacarés overos hembras juveniles.	121
TABLA 18	Valores hematológicos y bioquímicos para caimanes juveniles criados en condiciones controladas, tratados con etanol 100% (grupo control).	122
TABLA 19	Valores de referencia para <i>C. latirostris</i> juveniles controles criados en condiciones controladas.	123
TABLA 20	Caracterización citoquímica de las células de sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> juveniles criados en condiciones controladas.	132
TABLA 21	Dimensiones de las células de sangre periférica en caimanes juveniles criados en condiciones controladas.	133
TABLA 22	Evaluación de la inmunidad innata humoral en yacarés overos juveniles criados en condiciones controladas.	137
TABLA 23	Niveles séricos de analitos clínicos y enzimas en animales controles o expuestos in ovo a ATZ, END, BPA o E2.	138

## ÍNDICE DE FIGURAS

	TÍTULO	PAGINA
FIGURA 1	Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas endógenas y algunos de los posibles sitios de alteración de los PE.	10
FIGURA 2	Estructura química de 17 $\beta$ -estradiol.	11
FIGURA 3	Estructura química de compuestos con actividad estrogénica.	13
FIGURA 4	Organismo centinela.	24
FIGURA 5	Cladograma de la clase Reptilia.	27
FIGURA 6	Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad, como parte del proceso continuo de exposición-efecto.	31
FIGURA 7	Phallus de un yacaré overo juvenil.	35
FIGURA 8	Ubicación sistemática de <i>Caiman latirostris</i> .	42
FIGURA 9	Ejemplares neonatos, juveniles y adultos de <i>C. latirostris</i> .	44
FIGURA 10	Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> en Latinoamérica.	45
FIGURA 11	Diagrama del avance de la banda opaca en huevos de <i>Alligator mississippiensis</i> .	47
FIGURA 12	Escala temporal las distintas etapas del desarrollo del plan de trabajo.	52
FIGURA 13	Incubadora con el instrumental requerido para mantener la temperatura y humedad constantes.	54
FIGURA 14	Zonas de cosecha de los nidos de <i>C. latirostris</i> .	55
FIGURA 15	Cosecha de huevos a campo.	56
FIGURA 16	Registro de variables de los huevos.	56
FIGURA 17	Secuencia para la apertura de huevos de <i>C. latirostris</i> para determinar el estadio embrionario	58
FIGURA 18	Obtención de la muestra utilizada para la detección de residuos de COCs.	60
FIGURA 19	Dispositivo para obtener imágenes digitalizadas del	62

	grosor de la cáscara.	
FIGURA 20	Colocación de los fragmentos de cáscara en el porta muestras (stub) del MEB.	63
FIGURA 21	Porosidad de la cáscara de huevos de yacaré overo.	64
FIGURA 22	Avance de la banda opaca y viabilidad embrionaria.	65
FIGURA 23	Estadios embrionarios 13 a 21 de <i>C. latirostris</i> .	66
FIGURA 24	Tratamiento de los huevos.	67
FIGURA 25	Bioterio de cría de reptiles bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, renovación de aire, ciclo luz-oscuridad y administración de luz UV-B.	70
FIGURA 26	Medidas alométricas.	71
FIGURA 27	Imágenes digitalizadas del <i>phallus</i> de un yacaré overo juvenil macho.	73
FIGURA 28	Medidas craneofaciales.	74
FIGURA 29	Método de obtención de sangre entera periférica en <i>C. latirostris</i> .	75
FIGURA 30	Representación esquemática de las cuadrículas dentro de la cámara de Neubauer.	76
FIGURA 31	Fotomicrografía de la cámara de Neubauer.	77
FIGURA 32	Policromasia.	79
FIGURA 33	Patrones de tinción de las células que componen la sangre humana.	81
FIGURA 34	Imágenes digitalizadas de eritrocitos de <i>C. latirostris</i> .	82
FIGURA 35	Ensayo de inmunidad humoral.	84
FIGURA 36	Diferentes concentraciones de suero de yacaré overo (1ml de volumen total) fueron expuestas a SRBCs durante 20 min a 25°C.	84
FIGURA 37	Correlación entre el peso del huevo y el peso del yacaré overo al momento de la eclosión.	91
FIGURA 38	Porcentaje de los pesticidas organoclorados (OCPs) y los bifenilos policlorados (PCBs) que se detectaron en las muestras de huevos de <i>C. latirostris</i> provenientes	93

	de los diferentes lugares de recolección.	
FIGURA 39	Correlación entre el estadio embrionario y el grosor y porosidad de la cáscara.	95
FIGURA 40	Electromicrografías de la cáscara de huevos de <i>C. latirostris</i> obtenidas por MEB.	96
FIGURA 41	Correlación entre el número de poros/cm <sup>2</sup> y el grosor de la cáscara.	97
FIGURA 42	Correlación entre grosor y COCs totales presentes en los huevos de <i>C. latirostris</i> .	98
FIGURA 43	Correlación entre el número de huevos por nido y el contenido de OCPs.	100
FIGURA 44	Correlación entre el porcentaje de nacidos vivos y el contenido de COCs totales.	100
FIGURA 45	Correlación entre la supervivencia a los 10 días del nido y el número de poros de la cáscara.	102
FIGURA 46	Grados de cicatrización abdominal en crías a término de <i>Caiman latirostris</i> .	103
FIGURA 47	Desarrollo orofacial al nacimiento.	104
FIGURA 48	Evaluación del dimorfismo sexual del índice de condición corporal (ICC).	105
FIGURA 49	Efecto de los contaminantes sobre el índice de Masa corporal (IMC).	106
FIGURA 50	Efecto de los contaminantes sobre el índice de Masa corporal (IMC).	107
FIGURA 51	Efecto de los contaminantes sobre el índice de condición corporal (ICC).	108
FIGURA 52	Dimorfismo sexual del <i>phallus</i> en caimanes juveniles controles.	109
FIGURA 53	Dimorfismo sexual del <i>phallus</i> .	111
FIGURA 54	Efecto de E2 1,4ppm sobre el largo del <i>phallus</i> en caimanes juveniles.	112
FIGURA 55	Efecto de los contaminantes sobre el largo del <i>phallus</i> .	113

FIGURA 56	Efecto de los contaminantes sobre el ancho de la cabeza del <i>phallus</i> .	114
FIGURA 57	Efecto de los contaminantes sobre el alto de la cabeza del <i>phallus</i> .	115
FIGURA 58	Efecto de los contaminantes sobre el dimorfismo sexual del <i>phallus</i> .	116
FIGURA 59	Efecto de la exposición <i>in ovo</i> a contaminantes sobre el largo del <i>phallus</i> en caimanes juveniles.	117
FIGURA 60	Dimorfismo sexual en las variables craneofaciales.	119
FIGURA 61	Leucocitos en sangre periférica de <i>C. latirostris</i> .	124
FIGURA 62	Correlación entre el hematocrito y el peso de los caimanes juveniles.	125
FIGURA 63	Patrón de tinción de los eritrocitos que componen la sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> .	126
FIGURA 64	Eritrocitos inmaduros.	126
FIGURA 65	Patrón de tinción de los heterófilos de <i>Caiman latirostris</i> .	127
FIGURA 66	Patrón de tinción de los linfocitos que componen la sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> .	128
FIGURA 67	Patrón de tinción de los eosinófilos que componen la sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> .	128
FIGURA 68	Patrón de tinción de los basófilos que componen la sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> .	129
FIGURA 69	Patrón de tinción de los monocitos que componen la sangre periférica en <i>Caiman latirostris</i> .	130
FIGURA 70	Patrón de tinción de los trombocitos que componen la sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i> .	130
FIGURA 71	Clusters de trombocitos.	131
FIGURA 72	Efecto de los compuestos agroindustriales sobre las variables de referencia para los yacarés overos cuyos pesos corporales se encontraban entre 125-900g.	134
FIGURA 73	Efecto de los compuestos agroindustriales sobre las	135

variables de referencia para los yacarés overos cuyos pesos corporales se encontraban entre 901-3100g.

FIGURA 74	Inmunidad innata humoral en caimanes juveniles.	136
FIGURA 75	Actividad inmune innata.	137

# INTRODUCCION

## 1.1 Perturbadores endocrinos.

### 1.1.1- Generalidades.

En los últimos años se ha incrementado en todo el mundo la preocupación por los efectos adversos que la contaminación ambiental ejerce sobre el ecosistema y la salud humana. El incremento en el uso y desarrollo de nuevos compuestos químicos en la industria y la agricultura produce grandes cantidades de desechos químicos que son vertidos al medio ambiente año tras año. Algunos de estos contaminantes han sido catalogados como “*Endocrine Disruptors*”, **perturbadores endocrinos (PE) o agentes hormonalmente activos (AHA)**. El término “*Endocrine Disruptors*” fue utilizado por primera vez por Theo Colborn y Peter Thomas en 1992 por su capacidad de imitar o inhibir la acción de hormonas endógenas (Colborn y Clements, 1992; Colborn y col., 1993). En 1996, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, *Environmental Protection Agency*) convocó a un grupo de expertos, con el objetivo de hacer recomendaciones a la EPA sobre la regulación de los *endocrine disruptors*. La *European Commission* y la EPA de Estados Unidos, definen a un PE como una “*sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones*” (U.S. EPA, 1997; *European Commission*, 1996; Damstra y col., 2002).

Los compuestos que han sido clasificados como PE poseen un amplio espectro de aplicaciones, tales como pesticidas, herbicidas, suplementos dietarios, plásticos, medicamentos y productos cosméticos o de cuidado personal. Tal diversidad ha aumentado la exposición tanto de los animales como del hombre a PE. Entre los años 1990 y 2007 se estima que la utilización de agroquímicos en la República Argentina aumentó 12 veces (<http://www.ciafa.org.ar/mercado.htm>). De hecho, en el ámbito local, hemos detectado una alta concentración de organoclorados clasificados como PEs en la grasa adyacente a lesiones mamarias de mujeres que habitan el sur del Litoral argentino (Muñoz-de-Toro y col., 2006).

Los efectos que han sido vinculados a la exposición a PE incluyen feminización de los machos en animales acuáticos y en diferentes especies de

aves, disminución de la calidad del esperma, aumento de la incidencia del desarrollo genital anormal o incompleto en los varones, y el aumento de tumores hormonodependientes como el cáncer de mama, de testículo y de próstata (Krieger, 2010). Un aspecto que caracteriza al modo de acción de los PE es que generalmente sus efectos sólo son observados cuando el organismo es expuesto a bajas dosis del PE. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se trataron *in utero* ratas adultas de la cepa Wistar con bisfenol A (BPA) en las dosis de 25 µg, 250 µg y 25 mg de BPA/Kg de peso corporal/día. El tratamiento *in utero* con 25 y 250 µg de BPA adelantó significativamente la edad a la cual ocurre la apertura vaginal, en cambio la dosis más alta utilizada (25 mg) no presentó diferencias con las controles (Durando, 2009). Otro aspecto es que, si bien los químicos ambientales son usualmente menos potentes que las hormonas endógenas, se sabe que pueden actuar de manera aditiva (Markey y col., 2003). Esto proporciona una posible explicación al hecho de que niveles bajos o casi insignificantes de PE, pueden tener un alto impacto cuando son agregados a una cantidad significativa de hormonas endógenas (Silva y col., 2002). Otra posible explicación es que el modo de acción de los PE frecuentemente difiere de la clásica curva dosis-respuesta de tipo monotónica, en la cual se asume que una dosis menor a un cierto umbral es biológicamente segura, mientras que cantidades mayores producirán una respuesta biológica que se incrementa de manera progresiva (Savabieasfahani y col., 2006). Es decir que, en una respuesta monotónica, no es esperable observar a bajas dosis aquellos efectos que no se observaron a dosis intermedias. En cambio, el modo de acción de los PE se refleja en muchos casos en curvas dosis-respuesta no-monotónicas en forma de “U” o de U invertida (“∩”). En este tipo de respuestas, las dosis mínimas y máximas presentan una respuesta que no es directamente proporcional a las dosis intermedias (Wetherill y col., 2007; Vandenberg y col., 2008).

Se han utilizado los conceptos de organización y activación para clasificar el efecto producido por los PE en relación al período de exposición y la persistencia de los cambios observados. Los efectos organizacionales hacen referencia a cambios permanentes en la morfogénesis y en la diferenciación de los órganos y generalmente se producen en un período preciso y crítico del

desarrollo de cada órgano (Willingham y Crews, 1999; Stoker y col., 2003; Milnes y col., 2006;). Frecuentemente los cambios organizacionales se observan a nivel estructural (McLachlan, 2001; Silbergeld y col., 2002). Concretamente, los efectos resultantes de la exposición durante el período de organogénesis (período prenatal y postnatal prepuberal) pueden resultar en modificaciones permanentes de los sistemas afectados, incluso en ausencia de una exposición posterior (Richter y col., 2007). Algunos ejemplos de efectos organizacionales producidos por PE son las anomalías producidas por el diclorodifeniltricloroetano (DDT) en las células testiculares y la mayor incidencia de folículos poliovulares en ovarios de Aligatores (Guillette y col., 1994).

Los efectos resultantes de la exposición durante la vida adulta generalmente son transitorios y reversibles y son denominados activacionales (Richter y col., 2007). Los efectos organizacionales y activacionales frecuentemente se encuentran relacionados: un cambio del tipo activacional puede estar condicionado por exposiciones durante la organización en el desarrollo. De este modo, la exposición a PE puede tener también efectos latentes o tardíos, que se ponen de manifiesto una vez que el organismo se enfrenta a la acción de las hormonas endógenas ya sea en la pubertad o la vida adulta (Herbst y col., 1971; Colborn y col., 1993; Stoker y col., 2003; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Sharpe, 2006;).

### **1.1.2- Consecuencias de la exposición a PE.**

Las alteraciones más frecuentes asociadas con la exposición a PE tanto en animales como en el hombre son los trastornos hormono-dependientes. Algunos ejemplos son: disfunciones tiroideas, cambios en el crecimiento, modificaciones metabólicas, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, pérdida de los caracteres masculinos, feminización y alteraciones del sistema inmune (Tabla 1).

**Tabla 1:** Efectos de la exposición natural o experimental a PE en diferentes especies.

<b>Especie</b>	<b>Efecto</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Referencia</b>
<b>Mamíferos</b>			
Ratas	Lesiones mamarias proliferativas, tumores en tracto reproductivo, infertilidad, alteraciones del ciclo estral, adelantamiento de pubertad, alteraciones en morfogénesis de mama,	DES, isoflavonoides	Hughes, 1988
Ratas	Alteraciones en mecanismos hipotalámicos, en la respuesta a hormonas esteroideas y del número de sitios de implantación uterino	BPA	Ramos y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Durando y col., 2007; Varayoud y col., 2008, 2011; Monje y col., 2009, 2010. Bosquiazzo y col., 2010.
Ratones	Modificaciones en patrón de diferenciación de próstata	BPA	Markey y col., 2001
Conejos	Infertilidad, ovulación e implantación alteradas	Isoflavonoides	Hughes, 1988
Ovejas	Disminución en la población de folículos primordiales y menor estimulación del desarrollo folicular	DES, BPA.	Rivera y col., 2011
Humanos	Ginecomastia, oligospermia, impotencia, hipogonadismo, recuento y motilidad espermática disminuidas, irregularidades en el ciclo menstrual	DDT, kepona, anticonceptivos orales, derivados de estilbena	Degen y Bolt, 2000
Humanos	Alteraciones en el metabolismo lipídico	DES, BPA, Alquifenoles, Fito-estrógenos, Rosiglitazona, Pioglitazona	Grün y Blumberg, 2009; Janesick y Blumberg, 2011
<b>Aves</b>			
Gaviotas	Desarrollo anormal de tejido	DDT	Fry y Toone,

	ovárico y oviductos en embriones machos (feminización)		1981
Aves acuáticas	Disminución del espesor de la cáscara de huevos, incremento en la mortalidad, anomalías en desarrollo, retraso en crecimiento	DDE, PCBs, agonistas de receptores aril-hidrocarbonados	Custer y col., 2001; Martin y col., 2003
Águila Calva	Disminución de la hormona tiroidea T4	PCBs	Cesh y col., 2010
<b>Reptiles</b>			
Aligatores	Alteraciones en genitales internos y externos, alteraciones en los niveles de las hormonas sexuales	DDT, DDE, dicofol	Guillette y col., 1994; 1995a; b; Milnes y col., 2002
Tortugas	Desarrollo reproductivo anómalo	Nonaclor, aroclor 1242, DDE, clordano	Willingam y Crews, 1999
Yacarés	Reversión sexual, alteraciones en órganos reproductores y niveles hormonales. Pérdida de peso de huevos durante la incubación.	BPA, endosulfán, atrazina	Stoker y col., 2003; Beldoménico y col., 2007; Stoker y col., 2008; Rey y col., 2009
<b>Peces-Anfibios</b>			
Pez mosquito	Expresión anormal de caracteres sexuales secundarios, masculinización	Androstenodiona	Howell y col., 1980
Lenguados	Niveles hormonales, desarrollo ovárico, viabilidad de huevo y larvas reducidos	Hidrocarburos poliaromáticos	Safe, 2000
Salmones, Esturiones	Inducción de proteína de la zona radiata y vitelogenina en machos y en hembras inmaduras	nonilfenol	Meucci y Arukwe, 2005; Feist y col., 2005
Mojarras	Alteración de vitelogenina y disminución de testosterona plasmática en hembras.	Mezcla de contaminantes en efluentes de papelera	Fentress y col., 2006
Chanchitas	Alteraciones en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.	Endosulfán	Piazza y col., 2010
Rana	Alteraciones en la	Paracuat	Lajmanovich y

	organización del epitelio branquial y aumento de los espacios intercelulares. Disminución de la supervivencia en las dosis de 30 y 50 mg/l		col., 1998
<b><i>Invertebrados</i></b>			
Caracoles	Masculinización, formación de órganos femeninos adicionales, malformación de oviductos, incremento de la producción de ovocitos	Tributiltin, BPA, octilfenol	Mizunashi y col., 2000; Oehlmann y col., 2000; Vos y col., 2000
Copépodos marinos	Maduración sexual y producción de huevos estimulada	BPA	Andersen y col., 1999b
Moluscos	Eclosión disminuida, aumento de malformaciones y alteración en la metamorfosis de las larvas	BPA	Zhou y col., 2011

Abreviaturas: BPA Bisfenol-A; DDE Diclorodifenildicloroetano; DDT Diclorodifeniltricloroetano; DES Dietilestilbestrol; PCBs Bifenilos policlorados; Paracuat: dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo.

Los primeros efectos asociados a la exposición natural a PE fueron observados en los Estados Unidos en 1947, en aves que se alimentaban de peces de un lago contaminado principalmente con DDT y sus metabolitos. Estas aves mostraron cambios en el comportamiento, infertilidad y mortalidad temprana en comparación con aves de lagos no contaminados (Colborn y col., 1993; Colborn, 1995). En el año 1950 se informó por primera vez que el DDT podría ser catalogado como un xenoestrógeno (Burlington y Lindeman 1950). Posteriormente, en el año 1981 se detectó que el DDT, sus metabolitos y análogos causaban un crecimiento preferencial de tejido oviductal (dosis dependiente) en el proceso de diferenciación sexual de gaviotas macho, alterando las características de comportamiento de dominancia masculina (Fry y col., 1981; Fry, 1995). Más adelante se comprobó su efecto antiandrogénico, causado principalmente por su metabolito diclorodifenildicloroetano (p-p´DDE) (Guillette y col., 1996; Lintelmann y col., 2003; Aubé y col., 2011; Shi y col.,

2011). Por otro lado, también se ha demostrado que la exposición a PE provoca no solo efectos nocivos sobre la reproducción de animales silvestres, domésticos y del hombre (Davis y col., 1993; Sharpe y Skakkebaek 1993; Guillette y col., 1994; Sharpe y col., 1995; Multigner y Oliva, 2001; 2002; Safe, 2002) sino también puede contribuir al incremento en la incidencia de obesidad debido a que los PE son capaces de modular el metabolismo lipídico y la adipogénesis (Tabb y Blumberg, 2006 Grün y Blumberg, 2009; Janesick y Blumberg, 2011).

Los efectos de PE también fueron observados en poblaciones de tortugas y aligatores. En el lago Apopka (Florida, Estados Unidos) se produjo el derrame de un pesticida cuya formulación contenía DDE. Posteriormente, los aligatores machos de este lago presentaron una disminución del largo del *phallus*, lo cual se tradujo en alteraciones del proceso de cortejo/apareamiento que impidieron una reproducción exitosa (Guillette y col., 1994). También las tortugas del lago Apopka fueron afectadas por este derrame, alterándose la relación macho/hembra de la población: sólo se encontraron tortugas hembras o hermafroditas en ausencia de machos funcionalmente normales (Guillette y col., 1994).

No es casualidad que las primeras evidencias fueran halladas en animales como tortugas y reptiles, cuyo hábitat son lagos o ríos. El ambiente acuático funciona como un depósito para la mayoría de los desechos químicos, ya sea que provengan de la naturaleza o de las actividades humanas. Se presume que los organismos acuáticos presentan uno de los más altos niveles de exposición y que, por lo tanto, se verán severamente afectados (Sumpter, 1998). En muchos de estos casos, los efectos observados no pueden ser asignados a un único compuesto químico debido a que hay muchos químicos presentes simultáneamente en el ambiente (Colborn, 1995).

Los efectos de los PEs han sido demostrados también en seres humanos. Una de las primeras evidencias surge, al igual que en el caso de los animales, con el DDT. En el año 1949 se observó una disminución en el recuento espermático como consecuencia de la exposición ocupacional a DDT

(Singer, 1949). Además, entre los años 1938 y 1990 se pudo demostrar una disminución del 50% en el recuento espermático a nivel mundial, (Carlsen y col., 1992). En mujeres también se observaron consecuencias adversas por la exposición a PE. En 1971, Herbst y col. detectaron adenocarcinomas de células claras de vagina en adolescentes cuyas madres habían sido tratadas con dietilestilbestrol (DES) durante el embarazo para evitar abortos espontáneos. El DES es un compuesto sintético estrogénico que entre 1948 y 1991 fue administrado a millones de mujeres desde las primeras semanas del embarazo hasta la semana 35 para evitar posibles abortos (Mittendorf, 1995). El 50% de los casos de adenocarcinoma de vagina registrados en mujeres jóvenes hasta abril de 1995, correspondían a hijas de madres tratadas con DES (Mittendorf, 1995).

Con el transcurso de los años se descubrieron nuevos compuestos sintéticos con actividad estrogénica. Uno de los ejemplos más relevantes es el que tuvo lugar en el laboratorio de los doctores Soto y Sonnenschein, quienes detectaron que determinados tubos de poliestireno liberaban una sustancia con actividad estrogénica, la que luego fue identificada como nonilfenol (Soto y col., 1991). Del mismo modo, Krishnan y col. (1993) identificaron al BPA mientras trataban de identificar una proteína de unión a estrógeno en levaduras. Así, demostraron que el BPA se liberaba durante el autoclavado de los recipientes de policarbonato utilizados para esterilizar los medios de cultivo. Actualmente la lista de sustancias clasificadas como PE incluye pesticidas (aldrin, amitrol, clordano, cipermetrina, dieldrin, heptacloro, etc); metales (arsénico, cadmio, mercurio, plomo, etc) y compuestos organohalogenados (cloroformo, dioxinas, furanos, bifenilos policlorados, polibromobifenilos), etc. Numerosos grupos de investigación están tratando de establecer cuáles son las vías o mecanismos de acción de estos compuestos. Se han usado cuatro modos básicos de acción para clasificar los pesticidas con actividad de PEs (Krieger, 2010):

- (1) la capacidad para interactuar directamente con receptores esteroides.
- (2) la capacidad para modificar las enzimas que intervienen en el metabolismo de las hormonas esteroides;
- (3) la capacidad para alterar la secreción de hipotálamo-hipófisis de hormonas tróficas, y

(4) la capacidad para alterar la expresión de las hormonas tiroideas.

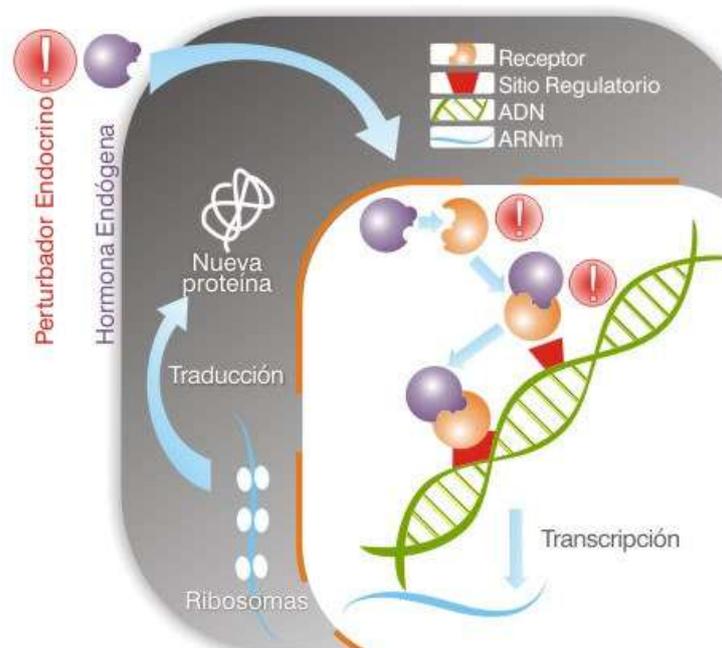
Para algunos PE ya se han podido determinar algunas de sus vías de acción, como el caso del aldrin y dieldrin, que utilizan la vía de los receptores de estrógenos como mecanismo de acción (Soto y col., 1994; Jorgenson, 2001; Briz y col., 2010). Otro mecanismo estudiado es la inhibición de la síntesis de la hormona tiroidea por parte del pesticida amitrol (Hurley y col., 1998; Vismari y col., 2010). Algunos PE afectan la actividad transcripcional de los receptores nucleares mediante la modulación de la degradación del proteosoma mediada por receptores nucleares y sus co-reguladores (Tabb y Blumberg 2006).

## 1.2- Xenoestrógenos.

### 1.2.1- Generalidades.

Entre los PE, se destacan aquellos compuestos de uso agrícola, industrial o doméstico que actúan por la vía estrogénica de manera agonista o antagonista, a los que se denomina **xenoestrógenos** o **estrógenos ambientales**. Los estrógenos son un grupo de hormonas filogenéticamente conservadas que poseen una reconocida capacidad de actuar como reguladores del crecimiento y la diferenciación celular de diversos órganos y tejidos (O'Brien y col., 1999). En el metabolismo de numerosas especies se destacan tres clases de estrógenos,  $17\beta$ -estradiol (E2), considerado el estrógeno más potente, estrona y estriol. En muchas especies animales los estrógenos son esenciales para controlar y regular el desarrollo, la reproducción y los caracteres sexuales secundarios. Los efectos de los estrógenos, también se observan en procesos tales como producción de enzimas, balance de agua y sales, densidad ósea, elasticidad de vasos sanguíneos y funciones cognitivas, entre otros (Damstra y col., 2002). La mayoría de las acciones descritas para los estrógenos son ejercidas a través de la interacción con los receptores para estrógenos (RE), factores de transcripción nucleares activados por ligando. Los receptores actúan por unión a secuencias específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta hormonal (ERH), localizados en la región promotora de los genes sensibles (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996; Evans, 1988). La unión del ligando (ya sea natural o

sintético, por ejemplo un PE) al receptor genera la traducción de señales provenientes del medio extracelular modificando la expresión génica de las células (Figura 1). Los dos RE más estudiados son el RE $\alpha$  y RE $\beta$  que se diferencian tanto en sus propiedades como en su distribución tisular. Los PE, como el BPA, muestran diferente afinidad por los RE $\alpha$  o RE $\beta$  (Routledge y col., 2000; Wetherill y col., 2007). También existen vías estrogénicas no clásicas, como el receptor de membrana GPR30 y los receptores relacionados a estrógenos (RRE), que también son utilizados por diversos PE (Thomas y Dong, 2006; Takayanagi y col., 2006)



**Figura 1.** Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas endógenas y algunos de los posibles sitios de alteración de los PE. Modificado de <http://e.hormone.tulane.edu/learning/learning.html> 2007

De esta manera, los xenoestrógenos pueden ser definidos con mayor precisión como aquellos compuestos que actúan por vía estrogénica, ya sea en ensayos *in vitro* como *in vivo*, uniéndose a los receptores de estrógenos y modificando la transcripción de genes dependientes de estrógeno (Sonnenschein y Soto, 1998; Burow y col., 1999). Esta vía de acción de los

xenoestrógenos facilita su acceso a los mecanismos de regulación génica fundamentales en las células blanco.

### 1.2.2- Relación estructura-acción estrogénica.

Como todas las hormonas esteroides, el 17 $\beta$ -estradiol contiene los tres anillos del fenantreno. Su estrogénicidad depende de la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo A fenólico (Figura 2).

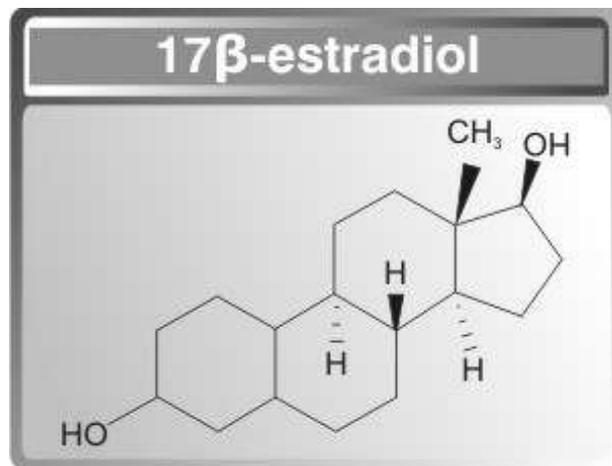
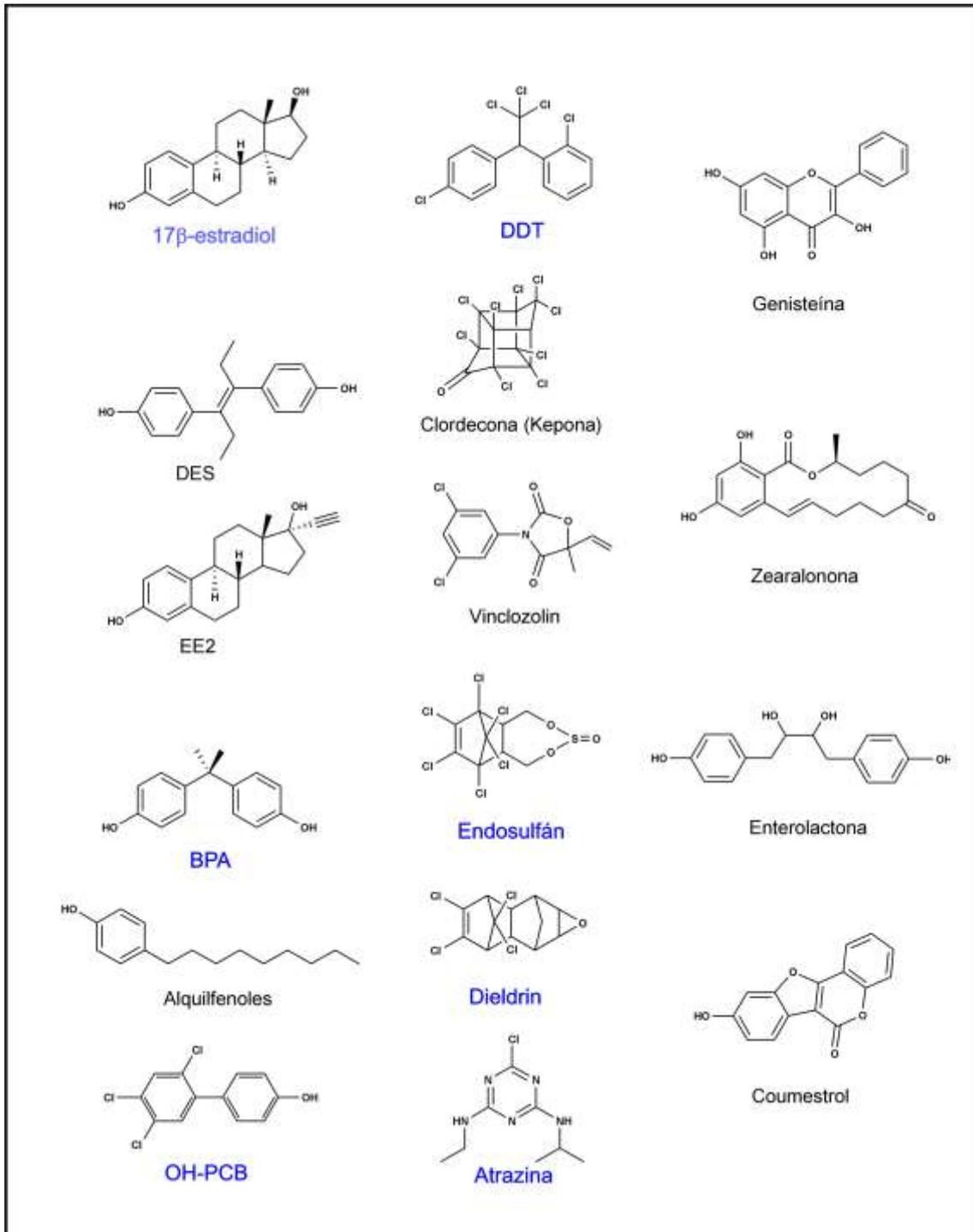


Figura 2. Estructura química de 17 $\beta$ -estradiol.

Numerosos antecedentes demuestran que muchos xenoestrógenos poseen estructuras químicas diversas (Figura 3). Mientras que el estrógeno endógeno 17 $\beta$ -estradiol posee tres anillos fenantreno, en los xenoestrógenos no se ha encontrado una conformación estructural consistente. De hecho, frecuentemente poseen uno o dos anillos aromáticos y algunos pueden presentarse como sustancias halogenadas con átomos de cloro, aunque su función no esté claramente definida (McLachlan, 2001).

La potencia estrogénica de los PE es muy variable, algunos son tan potentes como el mismo estradiol y otros débiles agonistas que tan solo tienen actividad parcial y a muy altas concentraciones (Olea y col., 1996; Olea-

Serrano y col., 2001). Además, la potencia estrogénica de un mismo compuesto puede variar según el organismo, el tejido, la variable analizada y/o el momento de la exposición. Por ejemplo, en estudios *in vitro* se ha demostrado que el BPA, compuesto presente en policarbonatos plásticos y resinas epoxi con comprobada actividad estrogénica (Dodds y Lawson, 1936), es 10.000 veces menos potente que el E2 (Andersen y col., 1999). Sin embargo, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se necesitó una dosis sólo 100 veces mayor de BPA (140ppm) respecto a E2 (1,4ppm) para revertir la determinación sexual por temperatura en caimanes, obteniendo hembras a la temperatura de obtención de machos (33°C) (Stoker y col., 2003).



**Figura 3:** Estructura química de compuestos con actividad estrogénica. En color se destacan compuestos estudiados en esta tesis. Abreviaturas: *DDT*: Dicloro Difenil Tricloroetano; *DES*: Dietilestilbestrol; *EE2*: Ethinil estradiol, *BPA*: Bisfenol-A; *OH-PCB*: hidroxibifenilo policlorado. Modificado de McLachlan, J.A. (2001). *Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals*. *Endocr. Rev.* 22:319-341.

### **1.3- Perturbadores endocrinos seleccionados para esta tesis.**

Uno de los objetivos principales de nuestro grupo es el estudio de los efectos de la exposición durante períodos críticos del desarrollo a contaminantes ambientales de amplia distribución en ecosistemas acuáticos. En este mismo sentido, nos interesa conocer/comprender los efectos deletéreos que los organismos padecen por la exposición a PE en sus hábitats de origen de y aquellos causados por una exposición experimental en condiciones controladas de laboratorio. Para ello, en este trabajo de tesis doctoral se estudiaron efectos de la exposición natural a compuestos organoclorados [pesticidas organoclorados (OCPs) y bifenilos policlorados (PCBs)] y de la exposición experimental a END, ATZ y BPA.

### **1.4- Compuestos organoclorados (COCs): Pesticidas y compuestos de origen industrial.**

Los COCs, como los OCPs y los PCBs, son sustancias lipofílicas, clasificadas como PE que se comportan principalmente como xenoestrógenos (Colborn y col., 1996; Muñoz de Toro y col., 2006; Van de Steen y col., 2010), sin embargo, también se observaron efectos antiandrogénicos. Los organoclorados son contaminantes orgánicos persistentes que se dispersan y acumulan en el medio ambiente y en la cadena alimentaria (Gross y col., 2003). Para los humanos, la principal vía de exposición a estos compuestos es la dieta, fundamentalmente a través de la ingesta de carne vacuna, peces y productos lácteos.

En nuestro país, como resultado de la amplia utilización de semillas transgénicas y de la aplicación de nuevas tecnologías de labranza, las prácticas agrícolas han crecido sustancialmente acompañadas por una deforestación intensiva y por el aumento del uso de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes). Sumado a esto, el creciente desarrollo industrial y el desconocimiento de las normas de protección del medio ambiente son las principales amenazas a la salud de nuestro ecosistema (INTA, 2010). A pesar de la expansión de la frontera agrícola-industrial, se sabe poco sobre los niveles de contaminación que esta creciente actividad está produciendo en los

humedales en Argentina. De esta manera, es altamente probable que los organismos que incluyen en su dieta peces de agua dulce resulten expuestos a altas concentraciones de COCs. En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, Muñoz de Toro y col. (2006) demostraron altas concentraciones y frecuencia de aparición de residuos de COCs en el tejido adiposo de mujeres que habitan una zona urbana adyacente al sistema fluvial del río Paraná. Uno de los aspectos más relevantes de este trabajo fue que los resultados hallados mostraron una asociación positiva entre los niveles de COCs en la grasa mamaria y el consumo de peces de agua dulce.

### **1.5- Endosulfán.**

El endosulfán (END) es un insecticida organoclorado que pertenece al subgrupo de los ciclodienos (Figura 3). Consiste de una mezcla de dos estereoisómeros:  $\alpha$  y  $\beta$ , distribuidos en una proporción aproximada de 70:30 (Goebel y col., 1982; N.R.A., 1998; U.S. EPA, 2002). Posee una baja solubilidad en agua, pero se adhiere fácilmente a partículas de arcilla, de este modo persiste en suelo y agua por varios años (Naqvi y Vaishnavi, 1993). La EPA clasifica al END como un compuesto de Categoría I: "Alta toxicidad aguda" ([http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/endosulfan\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/endosulfan_fs.htm)).

El END fue desarrollado en la década del '50 y es efectivo contra una amplia variedad de insectos y ácaros, y se puede utilizar también como preservativo de la madera. En Argentina está siendo utilizado masivamente desde la prohibición total del monocrotofos en 1999, y es actualmente uno de los insecticidas de elección en cultivos de maíz, soja, trigo, girasol y sorgo, entre otros. Otras evidencias de la amplia exposición de los seres humanos a END fueron reveladas en España, donde se detectó este pesticida en leche materna humana (Campoy y col., 2001), en suero y en tejido adiposo de mujeres (Jiménez y col., 2004). Por otro lado, se detectó  $\beta$ -END en huevos inviables de cocodrilos Morelet, en Belize. En muestras de sedimento de la laguna de donde provenían los nidos de estos huevos se determinaron niveles de 53 a 57 ppb de END (Wu y col., 2000).

En nuestro país existen evidencias de la contaminación de especies silvestres y de interés zootécnico con END y de sus productos derivados (Maitre y col., 1994; Menone y col., 2000; Lajmanovich y col., 2002). Algunos de los efectos encontrados en animales expuestos a END se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Ejemplos de la acción de END en animales.

Efectos	Especie	Dosis/vía	Referencia
Reducción del peso fraccional del huevo durante la incubación: Alteraciones en la dinámica folicular ovárica, histoarquitectura testicular y niveles de testosterona	Yacaré overo	2 y 20 ppm. Topicación <i>in ovo</i> .	Beldoménico y col., 2007; Stoker y col., 2008; Rey y col., 2009
Cambios morfológicos en células esteroideogénicas.	Pez	1 ppm durante 30 días.	Pandey, 1986.
Disminución en la producción de huevos con demoras en la eclosión y en la madurez sexual en hembras	Pez	0,01; 0,10 y 1 µg/l durante 24 hs. <i>in ovo</i>	Gormley y Teather, 2003.
Desorganización testicular. Disminución del diámetro de espermatogonias.	Pez	1,0 µg/L, durante 24, 48, 72 hs. 1 y 2 semanas.	Dutta y col., 2006
Efecto genotóxico en eritrocitos. Aumento de incidencia de micronucleos en las dosis altas	Rana	2,5; 5 y 10 µg/l en el agua durante 48-96 hs	Lajmanovich y col., 2005
Disminución significativa de la hipertrofia compensatoria de ovario, incremento de folículos atrésicos y alteración del ciclo estral.	Ratón	1,5 a 9 mg/kg/día durante 15 días, vía oral.	Hiremath y Kaliwal, 2002.
Disminución de la respuesta inmune humoral	Rata	1 a 5 mg/kg/día en 6 a 22 semanas, vía oral.	Banerjee y Hussain, 1986; 1987.
Reducción significativa de la migración de macrófagos y linfocitos.	Rata	1,2 mg/kg/día, en 22 semanas, vía oral	Banerjee y Hussain, 1986, 1987.
Disminución de los niveles de gonadotropina y testosterona.	Rata	7,5 y 10 mg/kg durante 15 y 30 días, vía oral.	Singh y Pandey, 1990.
Reducción del recuento espermático, elevación de la actividad de las enzimas LDH,	Rata	2,5; 5,0 y 10,0 mg/kg durante 48 días, vía oral.	Sinha y col., 1997

γGT y G6PDH.			
Disminución del porcentaje de túbulos seminíferos con espermatogénesis completa.	Rata	1,5 y 3,0 mg/kg desde día 15 de preñez a 21 de lactancia, vía materna	Dalsenter y col., 1999
Disminución del peso corporal, peso testicular y de órganos accesorios. Disminución de la actividad de 3β-OHSD testicular. Disminución en esteroidogénesis.	Rata	1,0 mg/kg; durante 30 días, vía oral	Chitra y col., 1999
Elevados niveles séricos de LH, demoras en maduración sexual y disminución de testosterona sérica en varones adolescentes.	Humano	Exposición a fumigaciones aéreas durante su vida.	Saiyed y col., 2003.

Abreviaturas: LDH: lactato deshidrogenasa; γGT: gamma glutamil transpeptidasa; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. 3β-OHSD: 3 beta hidroxí-esteroide deshidrogenada; LH hormona luteinizante.

El END ha sido clasificado como PE, en 1994 donde Soto y col. presentaron el primer informe sobre la estrogenicidad del END al demostrar que este ejercía un efecto proliferativo sobre células tumorales de mama mantenidas en cultivo y que este efecto era similar al inducido por el estradiol. Más tarde, se demostró que el END se une al RE $\alpha$  con una afinidad similar al toxafen y al o,p'DDT (Soto y col., 1995) en ratas. Unos años más tarde, por ensayo de competición en fase sólida se pudo establecer que END es capaz de unirse débilmente al receptor de estrógeno  $\beta$  (Kuiper y col., 1998).

La exposición ambiental al END durante el desarrollo embrionario y/o neonatal se ha asociado con anomalías en la reproducción y en el desarrollo (Silva y Gammon, 2009). Se observó que la exposición materna a 3 mg/kg peso corporal/día de END durante la preñez y la lactancia produce una disminución del porcentaje de túbulos seminíferos con espermatogénesis completa en las crías (Dalsenter y col., 1999). En otro trabajo, Singh y col., (2007) administraron 1 mg/kg peso corporal de END a ratas preñadas durante los días 6 a 20 de gestación, y observaron un aumento en la reabsorción fetal y anomalías anatómicas en los fetos. En un experimento realizado por nuestro

grupo de trabajo demostramos que, en ratas adultas ovariectomizadas, el END reproduce las acciones no uterótropas del E2 en dosis similares a la NOAEL (*Non Observed Adverse Effects Level* o nivel en el que no se observan efectos adversos) y a la TDI (ingesta diaria aceptable) (Varayoud y col., 2008). También pudimos demostrar el efecto xenoestrogénico del END en yacaré overo machos, donde observamos alteraciones en la histoarquitectura testicular y una reducción en los niveles de testosterona plasmática, sin efectos neurotóxicos asociados (Rey y col., 2009).

### **1.6- Atrazina.**

La atrazina (ATZ) (Figura 3) es un herbicida cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la fotosíntesis y la interferencia con otros procesos enzimáticos de las plantas (Shimabukuro y Swanson, 1969). Es muy utilizada para el control de malezas en las cosechas de maíz, sorgo y caña de azúcar, entre otros.

ATZ es altamente persistente en suelo, no se adsorbe en gran medida a sedimentos y es moderadamente soluble en agua. No se hidroliza fácilmente a pH neutro. Su adsorción en los suelos determina su biodisponibilidad para la degradación, que es realizada principalmente por microorganismos. Un aspecto muy importante de la capacidad contaminante de la ATZ es que se puede transportar a más de 1000 km desde el punto de aplicación, a través de las precipitaciones y, en consecuencia, es capaz de contaminar hábitats prístinos (Thurman y Cromwell, 2000; Mast y col., 2007).

La ATZ se clasifica como un compuesto clase III, "ligeramente tóxico", según la EPA (<http://www.epa.gov/ogwdw000/pdfs/factsheets/soc/tech/altrazine.htm>). Su actividad como PE que incluye no sólo acciones como xenoestrógeno han sido puestos en evidencia en diferentes modelos de animales (Tabla 3).

**Tabla 3:** Observaciones de la acción de ATZ en diversos modelos animales.

<b>Efectos</b>	<b>Especie</b>	<b>Dosis/vía</b>	<b>Referencia</b>
Alteraciones en la dinámica folicular ovárica, en la histoarquitectura testicular y niveles hormonales	Yacaré Overo	0,2 ppm. Topicación <i>in ovo</i>	Stoker y col., 2008; Rey y col., 2009
Incremento en la actividad de la enzima aromatasa en el complejo gonadal-adrenal-mesonefros de crías macho.	Alligatores	14 ppm <i>in ovo</i>	Crain y col., 1997.
Hermafroditismo y disminución de los niveles de testosterona.	Sapo	0,1-200 ppb, inmersión durante el desarrollo larvario.	Hayes y col., 2002
Retraso en el desarrollo gonadal, demasculinización y feminización completa.	Rana	0,1; 2,5 y 25 ppb inmersión durante el desarrollo larvario.	Hayes y col., 2003; 2010
En machos: disminución de testosterona plasmática, elevación de $17\beta$ -estradiol tisular, alteración estructural del testículo. En hembras: atresia ovárica.	Pez	100 y 1000 $\mu\text{g/l}$ , inmersión durante 21 días.	Spanó y col., 2004
Aumento de la expresión del gen que codifica para la aromatasa endógena. Aumento de hembras en la proporción Machos/hembras	Pez	2,2 y 22 $\mu\text{g/l}$ durante 17 días post-fertilización	Suzawa y Ingraham, 2008
Disminución del peso ovárico y de la concentración de progesterona circulante en hembras.	Codorniz	504 $\mu\text{g/kg}$ , <i>in ovo</i> .	Wilhelms y col., 2005
Inhibición de la diferenciación sexual del ovario, posiblemente por la inhibición de la aromatasa	Pollo	0,01 a 3 mg/huevo	Matsushita y col., 2006
Alteraciones en el ciclo estral y alta incidencia de tumores de mama.	Rata	400 ppm durante 6 meses.	Eldridge y col., 1999.
Disminución del peso corporal, y del peso relativo de hipófisis y próstata ventral. Disminución en movilidad y número de espermatozoides. Disminución de actividad de $\alpha$ -glucosidasa en epidídimo. Desorganización celular en testículo.	Rata	60 y 120 mg/kg, 2 veces a la semana durante 60 días, vía intraperitoneal	Kniewald y col., 2000
Reducción de la concentración de testosterona sérica e intratesticular y hormona	Rata	100 y 200 mg/kg por día, durante 26 días, vía oral.	Trentacoste y col., 2001

luteinizante sérica. Disminución del peso de órganos dependientes de andrógenos.			
Disminución de la concentración de testosterona sérica e intratesticular <i>in vivo</i> . Disminución de la producción de testosterona por las células de Leydig <i>in vitro</i> .	Rata	50 mg/kg por día, durante 2 días, ingesta oral	Friedmann, 2002
Retraso en apertura vaginal y desarrollo mamario.	Rata	Exposición <i>in utero</i>	Rayner y col., 2004
Aumento en los niveles de SOD, GPx, CAT y GST. Deficiencia en la glucosa-6-P en los eritrocitos	Rata	300 mg/kg/día durante 21 días	Bhatti y col., 2011
Alteraciones y retraso en el crecimiento intrauterino	Humano	Agua contaminada, hasta 2,2 mg/l.	Munger y col., 1997.

Abreviaturas: SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; CAT: catalasa; GST: glutatión-S-transferasa; G-6-P: glucosa-6-fosfato.

La actividad xenoestrogénica de la ATZ quedó establecida al demostrar su capacidad para interactuar con el receptor de estrógenos en oviducto de *Alligator mississippiensis* (Vonier y col., 1996). Sin embargo sus efectos como PE incluyen una amplia gama de alteraciones que involucran otros mecanismos de acción además de los caracterizados como xenoestrogénicos (Hayes y col., 2011).

### 1.7- Bisfenol-A.

El BPA (di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano), fue sintetizado por primera vez en 1891, aunque su actividad estrogénica fue descrita 45 años más tarde por Dodds y Lawson (1936) en ratas ovariectomizadas, quienes observaron que el BPA era el primer estrógeno sintético que carecía del núcleo fenantreno característico del 17 $\beta$ -estradiol (Figura 3). Sin embargo, su uso no fue muy difundido hasta que se descubrió su capacidad de catalizar el proceso de polimerización necesario para la generación de policarbonatos plásticos. El enlace éster que une al BPA con la estructura polimérica del policarbonato no es estable, y el calentamiento o el contacto con compuestos ácidos o alcalinos,

acelera la hidrólisis del enlace éster. Un ejemplo de la labilidad del enlace del BPA a la estructura del policarbonato ocurre en las latas de conserva que presentan en su interior un recubrimiento a base de BPA. El calentamiento de las mismas durante la esterilización de los alimentos o la presencia de bebidas o alimentos ácidos o alcalinos aceleran la velocidad de liberación de BPA; lo mismo sucede cuando se realizan lavados sucesivos de los recipientes de policarbonatos (Brotons y col., 1995, Howdeshell y col., 2003; Olea y col., 1996).

En la actualidad el BPA se utiliza no sólo en la industria de los policarbonatos, sino también en resinas epoxi y otros plásticos que incluyen polisulfonas, alquifenoles, poliéster, poliestirenos y ciertas resinas de estireno. También se lo ha utilizado en la formulación de pesticidas (fungicidas), antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi, 2000; Vom Saal y Hughes, 2005).

Debido a este amplio uso en distintas actividades económicas, el BPA representa una fuente de exposición de extraordinaria magnitud, debido a que se encuentra presente en selladores dentales, en el recubrimiento de latas de conserva, recipientes plásticos para alimentos y bebidas, mamaderas y utensilios para usos en horno microondas. Otras exposiciones resultan del uso de BPA en láminas *films*, tuberías reforzadas, filtros de agua, esmaltes y barnices, adhesivos, dentaduras artificiales, discos compactos, aislantes eléctricos, repuestos de automóviles y electrodomésticos (Takahashi y Oishi, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, no resulta extraño que se haya detectado BPA en ríos y estuarios, en concentraciones desde 5 a 1900 ng/l, siendo más significativo el contenido en sedimentos, observándose entre 5 a 100 µg/kg. En el ambiente el BPA es persistente y no se degrada fácilmente bajo condiciones normales (Rippen, 1999). Una clara evidencia de la exposición humana al BPA se desprende de un estudio realizado en la población estadounidense por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Calafat y col., 2008), en el cual se demostró que el 92,5% de

las muestras de orina de una población de personas no expuestas laboralmente a BPA alcanzaba niveles detectables (entre 0,4 y 149  $\mu\text{g}$  BPA/l). Si se tiene en cuenta que la tasa de metabolización del BPA es rápida (Volkel y col., 2002), estos datos sugieren que la exposición humana a cantidades significativas de BPA es continua y proveniente de múltiples vías. Se estima que la dosis ingerida de BPA a través del consumo de alimentos enlatados es de 6,3  $\mu\text{g}/\text{día}$  (Howe y Borodinsky, 1998); 0,75  $\mu\text{g}/\text{día}$  por ingerir bebidas contenidas en envases plásticos (Brotons y col., 1995) y 90-931  $\mu\text{g}/\text{día}$  en el transcurso de la primera hora posterior a la colocación de un sellador dental (Olea y col., 1996).

En un trabajo reciente, Tharp y col. (2012) evaluaron los efectos del BPA en el desarrollo fetal de la glándula mamaria en primates no humanos, los cuales fueron expuestos por vía oral a 400  $\mu\text{g}$  de BPA por kg de peso corporal por día, desde el día 100 de la gestación hasta el momento del parto. Al momento del parto, los niveles de BPA no conjugado fueron  $0,68 \pm 0,312$  ng/ml de suero, un nivel similar a los medidos en suero de seres humanos. La relevancia de este trabajo radica en que, para que BPA alcance niveles similares a los medidos en la población humana, fue necesario administrar una dosis mucho mayor a las calculadas para los seres humanos. Estos resultados agregan evidencias a la idea de que la exposición real de los seres humanos al BPA es mucho mayor de la estimada. La densidad de yemas mamarias fue significativamente mayor en hijas de hembras expuestas, y el desarrollo general de la glándula mamaria fue más avanzado en comparación con los monos controles. Estos resultados fueron comparables a los observados en roedores (Tharp y col., 2012).

La Tabla 4 resume los resultados de estudios que demuestran las consecuencias de la exposición a BPA en diferentes modelos animales.

**Tabla 4:** Efectos del BPA en animales.

Efectos	Especie	Dosis/vía	Referencia
Reversión sexual y alteraciones en la histoarquitectura gonadal, dinámica folicular ovárica y niveles hormonales	Yacaré overo	1,4 y 140 ppm. Topicación <i>in ovo</i>	Stoker y col., 2003; 2008
Alteraciones morfológicas en embriones	Sapo	20 µM por inmersión	Sone y col., 2004.
Feminización de renacuajos.	Sapo	0,01 a 1 µM por inmersión	Levy y col., 2004.
Incremento del crecimiento postnatal y comienzo temprano de la maduración sexual.	Ratón	2; 10 y 500 µg/kg/día (vía materna).	Honma y col., 2002; Howdeshell y col., 1999; Nikaido y col., 2004.
Incremento en el tamaño de la próstata.	Ratón	2 y 50 µg/kg/día (vía materna)	Gupta 2000; Nagel y col., 1999; Timms y col., 2005
Fertilidad y producción espermática reducidas	Ratón	0,2 a 20 µg/kg/día (vía materna)	Al-Hiyasat y col., 2002; Chitra y col., 2003; vom Saal y col., 1998.
Estimulación del desarrollo de la glándula mamaria.	Ratón	0,025; 25 y 250 µg/kg/día (vía materna)	Markey y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005.
Perturbación del ciclo estral y alteraciones en la implantación y preñez.	Ratón	25 a 500 µg/kg/día (vía materna)	Al-Hiyasat y col., 2004; Nikaido y col., 2004.
Inhibición de esteroidogénesis testicular.	Rata	2,4 µg/kg/día (vía materna)	Akingbemi y col., 2004.
Incremento en el ARNm del RP, de REβ y en la expresión del REα en cerebro.	Rata	400, 40 y 25 µg/kg/día. (vía materna)	Aloisi y col., 2001; Funabashi y col., 2003; 2004; Ramos y col., 2003.
Apertura vaginal temprana y desbalance de proliferación-apoptosis en glándula mamaria.	Rata	25 µg/kg/día (vía materna)	Durando y col., 2007.
Alteración de los mecanismos hipotalámicos dependientes de estrógeno	Rata	0,05 y 20 mg/kg/día. (subcutánea, postnatal temprano)	Monje y col., 2009, 2010.
Respuesta uterina a hormonas esteroideas alterada. Menor número de sitios de implantación	Rata	0,05 y 20 mg/kg/día. (subcutánea, postnatal temprano)	Varayoud y col., 2008, 2011; Bosquiazzo y col., 2010.

Lo expuesto anteriormente fundamenta la elección de END, ATZ y BPA para el desarrollo de este trabajo de tesis. Los tres compuestos son de uso masivo, tienen además una amplia distribución y presencia en diversos ambientes con la consecuente potencial contaminación de especies con las cuales entran en contacto mediante diferentes vías. Tal como se explicó anteriormente, los ecosistemas acuáticos adquieren especial relevancia como sistemas de alerta temprana de contaminación, por lo que consideramos que es sumamente importante conocer el efecto de estos contaminantes sobre la flora y fauna autóctonas de estos ecosistemas, sustentando su posterior selección y caracterización como organismos centinelas.

## 1.8- Organismos Centinelas.

### 1.8.1- Generalidades.

El concepto de organismo centinela fue definido por Stahl (1997) como “cualquier organismo no-humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que el contaminante impacte sobre los humanos”. De este modo las respuestas endógenas del organismo proveen una señal de alerta temprana sobre potenciales riesgos para la salud humana y de los ecosistemas (Figura 4).



**Figura 4.** Organismo centinela. *C. latirostris*, potencial centinela de contaminación por xenoestrógenos. Tomado de González, M. 2007.

Los animales silvestres no sólo proporcionan información acerca de tipos, características, cantidades y biodisponibilidad de contaminantes del medioambiente, sino que también proveen importante información de los efectos interactivos de estos agentes medioambientales y el rol de otros factores del ambiente en la respuesta toxicológica final (Fox, 2001).

En base a estos conceptos se define que una especie centinela debe reunir ciertas características (van der Schalie y col., 1999):

- Poseer una respuesta capaz de ser medida en el agente a monitorear. Esta respuesta suele ser característica en la especie centinela cuando la comparamos con las otras especies.
- Habitar en un territorio que se encuentre incluido en el área a monitorear. Es de especial interés la movilidad del animal, por esto se prefieren animales con territorios pequeños o con fidelidad a su hábitat.
- Tener una población suficiente que permita trabajar con un número adecuado de individuos.
- Tener una relación íntima con la fuente de exposición (agua, aire, plantas, suelo, etc.).

Las especies centinelas se aplican, por ejemplo, al monitoreo del medioambiente y a la identificación de exposiciones a nuevas sustancias evidenciadas por cambios en poblaciones de animales silvestres. A pesar de que los datos obtenidos en especies centinelas no son factores determinantes en la evaluación del riesgo para los seres humanos, pueden ser tomadas como evidencias significativas frente a decisiones de evaluación de riesgo; proveyendo alertas tempranas de situaciones que requieren más estudio, o sugiriendo potenciales causas y efectos (Van der Schalie y col., 1999).

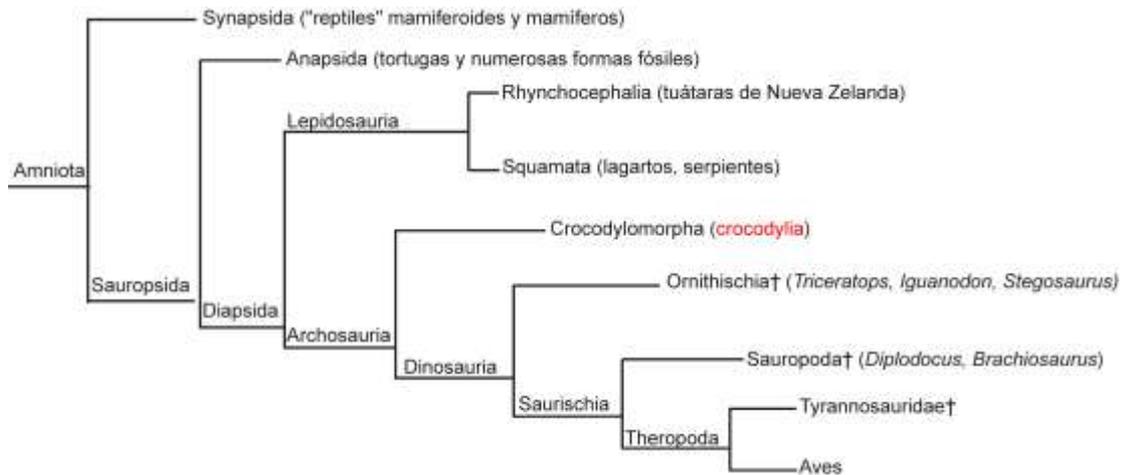
El uso de animales como especies centinelas presenta varias ventajas para proveer una advertencia temprana sobre potenciales riesgos para la población humana antes de que la misma resulte afectada. Por ejemplo, los períodos de latencia de las enfermedades son generalmente más cortos en los animales que en los humanos o los animales pueden exponerse a concentraciones mayores a los umbrales de toxicidad establecidos para

humanos. Para algunos compuestos tóxicos, los biomarcadores de exposición y de efectos tóxicos son similares en humanos y en animales centinelas (ej.: inhibición de la acetilcolinesterasa causada por los insecticidas organofosforados). Además, las condiciones de exposición pueden ser comparables bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo en el caso de las personas y sus animales domésticos (Van der Schalie y col., 1999).

De esta manera, los organismos centinelas se seleccionan para realizar monitoreos ambientales con el objeto de controlar y preservar la salud del medioambiente y de las especies que lo habitan. Las investigaciones que se realizan con animales en condiciones de laboratorio no brindan información acerca de acciones biológicas integradas debido a exposiciones crónicas a concentraciones reales de contaminantes ambientales. Sin embargo, su utilidad reside en la posibilidad de determinar relaciones dosis-respuesta y poder de estudiar los mecanismos de acción de los contaminantes elegidos.

### **1.8.2- Reptiles como centinelas de contaminación ambiental.**

Los saurópsidos (Sauropsida) o reptiles (Reptilia) son un clado de vertebrados amniotas al que pertenecen los animales tradicionalmente clasificados como reptiles, y también incluyen las aves (Figura 5). Tienen en común la posesión de escamas epidérmicas de queratina y un huevo amniótico.



**Figura 5.** Cladograma de la clase Reptilia. En color se marca el orden crocodylia, al que pertenece la especie utilizada en esta tesis. La cruz marca los órdenes extintos. *Modificado de Tree of life (<http://www.tolweb.org/Amniota/14990>)*

Algunos reptiles se han adaptado a la vida terrestre, siendo una piel resistente y escamosa es una de sus principales adaptaciones para este fin. Otras de las adaptaciones que han contribuido al éxito de los reptiles en tierra firme incluyen pulmones bien desarrollados, un sistema circulatorio de doble circuito, un sistema excretor que minimiza las pérdidas de agua, fuertes extremidades, fertilización interna y huevos con cáscara resistente (Grigg y Carl, 1993).

Históricamente, los reptiles han sido utilizados como centinelas de contaminación ambiental debido a las siguientes características:

- Se encuentran presentes en una amplia variedad de hábitats
- Su distribución geográfica es extensa
- Son mayoritariamente longevos
- Algunos ocupan una posición superior dentro de la red trófica
- En muchos casos, son fieles al sitio
- Presentan una sensibilidad a los contaminantes similar a la reportada para otras especies, como por ejemplo, aves y mamíferos (Hall y Clark, 1982)
- Poseen la característica de bioacumular\* y biomagnificar\*\* los contaminantes debido a su longevidad y a su alta posición dentro de la

red trófica, a niveles equivalentes o aún mayores que los descritos para aves y mamíferos (Olafsson y col., 1983; Bryan y col., 1987; Hall y Henry, 1992; Crain y Guillette, 1998).

Los reptiles han sido propuestos como especies centinelas en varios trabajos, algunos de los cuales se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Ejemplos de reptiles utilizados como organismos centinelas de contaminación.

<b>Organismo Centinela</b>	<b>Efecto observado</b>	<b>Referencia</b>
Cocodrilos	Presencia de organoclorados en membranas corioalantoideas	Pepper y col., 2004
Aligatores	Alteraciones en morfología gonadal y concentración de hormonas sexuales	Guillette y col., 1994; 1995a; b; Milnes y col., 2002 Guillette, 1994
Caimanes	Reversión sexual, pérdida de peso de huevos en la incubación. Inducción de vitelogenina. Alteraciones en la dinámica folicular ovárica, en la histoarquitectura ovárica y testicular y en los niveles hormonales.	Stoker y col., 2003; Rey y col., 2006; Beldoménico y col., 2007; Stoker y col., 2008; Rey y col., 2009
Serpientes	Aumento de la concentración de enzimas detoxificantes	Stafford y col., 1976
Tortugas	Alteración de los perfiles hormonales, inducción de reversión sexual y estimulación de la producción vitelogenina sérica. Desarrollo reproductivo anómalo	Bergeron y col., 1994; Willingham y col., 2000; Tada y col., 2004

\*Bioacumulación: aumento progresivo de la cantidad de una sustancia en un organismo o parte de un organismo, debido a que la tasa de incorporación (dieta, vías respiratorias, absorción dérmica) supera la capacidad de eliminar dicha sustancia del cuerpo por parte del organismo (*Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC, 1993*).

\*\*Biomagnificación: la concentración en tejidos de compuestos químicos en organismos a un nivel trófico determinado excede las concentraciones en un organismo en el siguiente nivel trófico inferior de una cadena alimenticia como resultado del proceso de bioacumulación y transferencia (*Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, EPA, 2010*).

## 1.9.- Biomarcadores de exposición y de efecto de PE.

### 1.9.1- Generalidades.

Diversos marcadores biológicos funcionales o también llamados **biomarcadores** pueden ser usados para monitorear la exposición a PE en poblaciones silvestres y en humanos.

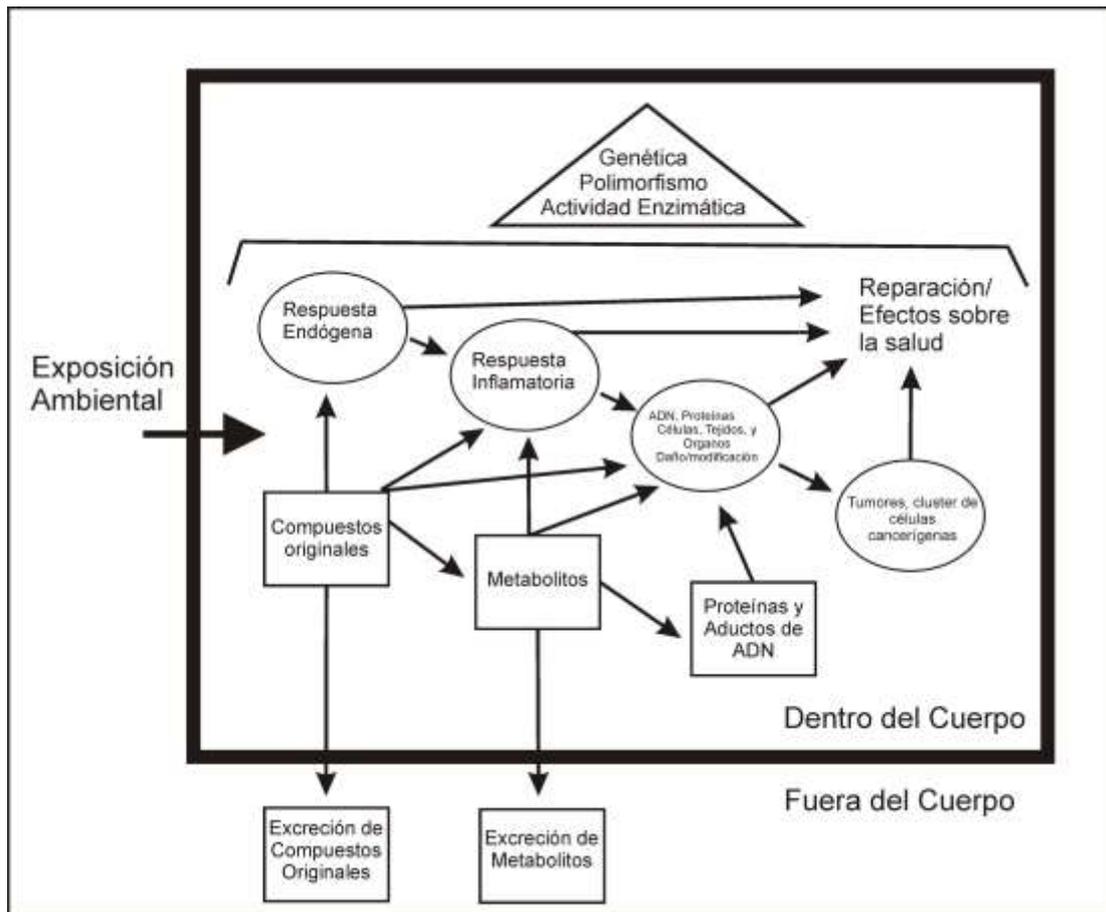
Los biomarcadores se manifiestan en diferentes niveles de organización: subcelular, celular, tisular y organismos completos. En primer lugar ocurren los efectos a nivel molecular, seguido por las respuestas celulares (bioquímica), tisulares u orgánicas, llegando a manifestarse en el individuo y su progenie. Estas respuestas tienen relevancia ecológica y tienden a ser permanentes. Los biomarcadores son especialmente útiles como una señal de alerta temprana de los problemas ambientales emergentes ([www.unep.org/stapgef](http://www.unep.org/stapgef)).

Los biomarcadores son definidos como “variables bioquímicas, fisiológicas, y/o histológicas, cuyo cambio, presencia y/o ausencia permiten determinar la exposición del animal a algún contaminante particular” (Hugget y col., 1992; Munkittrick y McCarty, 1995). Dado que un biomarcador no siempre puede predecir la respuesta total de un organismo (Cormier y Daniel, 1994), un conjunto de biomarcadores puede proveer una visión más integral del grado de exposición a contaminantes.

Para que una variable sea considerada biomarcador debería preferentemente ser **específica** (no modificarse por otros factores) y **sensible** (alterarse a bajas concentraciones de contaminante).

Los biomarcadores pueden ser de exposición, de efecto o susceptibilidad. Los biomarcadores de **exposición** incluyen las mediciones de los compuestos y sus metabolitos, y las células o moléculas modificadas (por ejemplo, aductos de ADN y de proteína) en los tejidos biológicos / líquidos (por ejemplo, sangre) o las excreciones (por ejemplo, orina). Estas mediciones biológicas están directamente relacionadas con la dosis de un pesticida y son una función de la exposición a los mismos. Los biomarcadores de **efecto**

incluyen mediciones de cambios bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento que resultan como consecuencia de la exposición a los contaminantes. Algunos ejemplos de biomarcadores de efecto incluyen mediciones biológicas de las respuestas inflamatorias endógenas, mediciones de ADN, proteínas, daño de la célula, tejido u órgano. Estas mediciones biológicas a menudo son difíciles de atribuir a un evento de exposición a compuestos específicos. Los biomarcadores de **susceptibilidad** incluyen las mediciones de la capacidad inherente de un individuo para responder a la exposición a determinados compuestos. Estas mediciones incluyen observaciones de funciones y propiedades moleculares, tales como los polimorfismos genéticos y la actividad de las enzimas, que pueden afectar las tasas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un compuesto, junto con la disposición bioquímica de un individuo hacia la progresión de la enfermedad o la reparación. Los biomarcadores de susceptibilidad se ven afectados por una serie de fuentes exógenas y endógenas, y por lo tanto es difícil vincularlos a un evento de exposición a compuestos específicos. La Figura 6 muestra de manera gráfica estos conceptos referidos a los diferentes tipos de biomarcadores.



**Figura 6.** Biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad, como parte del proceso continuo de exposición-efecto. Los cuadrados representan los biomarcadores de exposición; óvalos representan los biomarcadores de efecto, y triángulo representa biomarcadores de susceptibilidad; las flechas representan las interacciones potenciales entre las medidas y procesos biológicos. *Modificado de: Krieger, (2010).*

La evaluación de los efectos provocados por la exposición a determinados agroquímicos y desechos urbano-industriales, clasificados como PE, son de especial interés para la caracterización de *Caiman latirostris* como centinela de contaminación y monitor de la salud del ecosistema. A tal fin la identificación y caracterización de biomarcadores de exposición y acción/efecto de PE es fundamental. Entre los biomarcadores de interés se incluyen: cambios en las características sexuales secundarias, alteraciones en los niveles circulantes de hormonas esteroides sexuales, cambios en actividades enzimáticas y modificaciones histológicas en el sistema endocrino, y malformaciones. Estas respuestas selectivas medidas en ciertos organismos

pueden actuar como sistemas de advertencia temprana y proveer índices de potenciales efectos de los contaminantes sobre el ecosistema (Knobil, 1999).

Cuando un organismo vivo aporta información sobre las condiciones ambientales de su hábitat mediante su presencia, ausencia y comportamiento, se lo denomina Bioindicador. Por ejemplo, la presencia de bacterias coliformes identifica agua contaminada con materia fecal humana.

En conclusión, el análisis de biomarcadores de exposición y de efecto es un instrumento clave para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los individuos dentro de los ecosistemas, normalmente en combinación con otros enfoques para la evaluación de la calidad del medio, como los análisis químicos convencionales, los bioensayos y los estudios ecológicos a largo plazo.

## **1.9.2- Biomarcadores de exposición a PE.**

### **1.9.2.1- Concentración de COCs.**

Los COCs y sus metabolitos son lipofílicos. La exposición de la fauna silvestre está principalmente relacionada con la acumulación y la persistencia de estos contaminantes tanto en la cadena alimentaria acuática como terrestre. De esta manera, la dieta es una fuente importante de exposición a compuestos lipofílicos, que son absorbidos por el tracto digestivo después de la ingestión. Posteriormente los contaminantes son transportados a otros tejidos en donde son absorbidos y permanecen depositados (Bargar y col., 1999). En las especies ovíparas, el huevo tiene un alto contenido de lípidos (Ashpole y col., 1999; Rauschenberger y col., 2007) por lo que los compuestos lipofílicos como los pesticidas organoclorados y los PCBs llegan al huevo principalmente por transferencia materna y permanecen almacenados (Rauschenberger y col., 2007; Russell y col., 1999). De esta manera, la concentración de COCs en el huevo reflejaría su disponibilidad biológica en el hábitat, proveyendo una herramienta útil para su monitoreo (de Solla y Fernie, 2004).

El análisis de contaminantes en huevos de animales silvestres ha demostrado su utilidad como indicador de contaminación con xenobióticos en hábitats naturales. Se ha estudiado el contenido de distintos organoclorados en huevos de diferentes especies como: azor (*Accipiter gentilis*), águila (*Buteo buteo*), mirlo (*Cinclus cinclus*), gallo (*Gallus domesticus*), charrán (*Sterna hirundo*), tortuga (*Chelydra serpentina serpentina*), gaviota (*Larus fuscus*) (Mañosa y col., 2003; O'Halloran y col., 2003; Bargar y col., 2001; French y col., 2001; De Solla y col., 2000; Bustnes y col., 2006). En un interesante trabajo, se midieron las concentraciones de 16 insecticidas organoclorados en la yema de huevo en una población de la pequeña garza *Egretta garzetta*, en Tailandia (Keithmaleesatti y col., 2007). Estos autores pudieron comprobar que los contaminantes organoclorados evaluados persisten en el tiempo, se bioacumulan y se transfieren desde la madre

Wu y col., (2006) examinaron en huevos de cocodrilo Morelet's (*Crocodylus moreletii*) residuos de compuestos organoclorados. El compuesto predominante fue p,p DDE, y también se encontraron: p,p DDT, p,p-DDD, methoxychlor, aldrin, y  $\alpha$ -END. Las concentraciones individuales estuvieron en el rango de 4 ppb (ng del químico/ gramo húmedo de huevo) con un máximo de 500 ppb. Cobb y col. (2002) analizaron la presencia de policlorados bifenilicos (PCBs) en huevos de *Alligator mississippiensis* y compararon tres lugares del sudoeste de Estados Unidos (333 ng/g para isla Bear; 218 ng/g en Rockefeller y 3176 ng/g en bahía Winyah). Por otro lado, Rauschenberger y col. (2004) suministraron a hembras de *Alligator mississippiensis* una mezcla que contenía p,p-DDE, toxafeno, dieldrin, y chlordano en una dosis de  $0,2 \pm 0,01$  mg/kg/día por  $274 \pm 8$  días, encontrando que las hembras tratadas producían huevos con un alto contenido de organoclorados y menor viabilidad con respecto a las controles.

### **1.9.3- Biomarcadores de Efecto a PE.**

#### **1.9.3.1- Características de la cáscara del huevo: grosor y densidad de poros.**

En patos domésticos adultos (*Anas platyrhynchos domesticus*) expuestos a lindano (7-hexaclorociclohexano) se observó que los huevos eran

más delgados, con una densidad y área de los poros/cm<sup>2</sup> disminuida. Esta reducción se debió presumiblemente a la ausencia total de poros “largos” en estas cáscaras. Este cambio en la porosidad de la cáscara implica una reducción en la conductividad, lo que se traduce en una alteración en el porcentaje de eclosiones exitosas. (Chakravarty, y Lahiri, 1986; Lundholm,, 1997). Además, estas alteraciones en el grosor y número de poros/cm<sup>2</sup> podrían comprometer el intercambio gaseoso y afectar la viabilidad del embrión (Ar, A. y Rahn H., 1985). En este sentido, se ha demostrado que la porosidad de la cáscara de huevos de cocodrilos está relacionada con la viabilidad fetal (Wink y col., 1990).

#### **1.9.3.2- Parámetros de éxito reproductivo.**

El número de huevos por nido y el éxito en la eclosión son medidas de performance reproductiva de las especies ovíparas. Los estudios de campo y de laboratorio sugieren que la exposición materna a COCs pueden contribuir a la disminución del número de huevos en la nidada, de la viabilidad del embrión y de la sobrevivencia postnatal (de Solla y col., 2008, Lundholm, 1997, Rauschenberger y col., 2004, 2007, Sepúlveda y col., 2006, van de Merwe y col., 2010). En este contexto, es necesario estimar la concentración de COCs presentes en los huevos de *C. latirostris* y determinar la relación entre las concentraciones de COCs y parámetros asociados a performance reproductiva.

#### **1.9.3.3- Características de genitales externos.**

El *phallus* es una estructura sexualmente dimórfica\* (Allsteadt y Lang, 1995). Tanto en machos como en hembras se presenta como una estructura asimétrica y móvil que en estado relajado descansa sobre la hendidura (cloaca) y en estado tenso se yergue separándose de la misma. Presenta un sector redondeado (cabeza, Figura 7) sostenido, desde la base de la cloaca, por una estructura alargada (cuello). La cabeza posee una hendidura en el extremo opuesto a su unión con el cuello. La hendidura está cubierta por una estructura piramidal a la que denominamos punta (Guillette y col., 1996; 1999 a, b; Stoker C., 2004; Ziegler y Olbort, 2007).



**Figura 7.** *Phallus* de un yacaré overo juvenil. Imágen digitalizada del *phallus* de un yacaré overo juvenil macho (vista dorsal) *Modificado de Stoker, C. (2004).*

El desarrollo embrionario y postnatal que imprime características sexualmente dimórficas a los genitales externos depende del ambiente endocrino, y por lo tanto puede ser afectado por la exposición a PE (Miyagawa y col., 2011). En las últimas décadas, se ha informado un aumento creciente en la frecuencia de anomalías del desarrollo del pene y/o clítoris-pene en diferentes especies (Davis y Bortone, 1992; Guillette y col., 1996; 1999 a, b; Sharpe y Skakkebaek, 1993; Tillmann y col., 2001). A partir de varios trabajos, se ha propuesto que este incremento podría deberse a la presencia de sustancias químicas con actividad antiandrogénica que contaminan el medio ambiente. En aligatores que habitaban un lago contaminado (lago Apopka, FL-USA), la población de animales juveniles presentó una reducción del tamaño del *phallus* y menores concentraciones plasmáticas de testosterona en comparación con animales similares de un lago prístino (lago Woodruff, FL-USA) (Guillette y col., 1996). Esta andrógeno-dependencia fue observada por Gunderson y col., (2004) en la misma especie años más tarde y sentó las bases tanto para estudiar animales que viven en sitios contaminados (Guillette y col., 1999; Gunderson y col., 2004) como para establecer si una sustancia

\* Inicialmente, el concepto de **dimorfismo sexual** hacía referencia a las variaciones en la fisonomía externa (forma, coloración o tamaño) entre machos y hembras de una misma especie (Grigg, 1993). Actualmente, el concepto es mucho más amplio y se refiere no sólo a las formas sino al conjunto de diferencias biológicas (mecanismos subcelulares, niveles hormonales, etc.) que presentan los machos y las hembras de una especie (Huchzermeyer, 2003).

tiene actividad agonista o antagonista de los andrógenos (Milnes y col., 2005).

En ratas, el fungicida vinclozolín inhibe la diferenciación sexual como consecuencia de su acción antiandrogénica. Cuando el tratamiento se realiza durante la gestación tardía y la lactancia temprana, reduce la distancia ano-genital de los machos a una medida similar a la de las hembras (Gray y col., 1994a). Se observó además una mayor frecuencia de hipospadias, criptorquidia y agenesia de la próstata (Gray y col., 1994 y 2001; Kelce y col., 1994; Shono y col., 2004). También en caracoles marinos y de agua dulce se describieron efectos antiandrogénicos por exposición a vinclozolin y acetato de ciproterona, tales como alteraciones en los genitales externos con una significativa disminución del tamaño del pene y de los órganos sexuales secundarios (Tillmann y col., 2001). Como contrapartida, se han encontrado que algunas sustancias con actividad androgénica provocaron alteraciones en hembras de más 150 especies de moluscos. Tal es el caso de los compuestos del tributiltin (TBT) usados en pinturas de barcos para actuar como biocidas. El TBT induce “*imposex*” en caracoles, observándose la formación adicional de caracteres sexuales masculinos en hembras que se vuelven infértiles (Oehlmann y col., 1996; Tillmann y col., 2001). Actualmente, el uso del TBT está prohibido y se utilizan bioensayos con caracoles como especies centinelas para monitorear su presencia (Axiak y col., 2003).

#### **1.9.3.4- Características craneofaciales de *C. latirostris*.**

##### **1.9.3.4.1- Dimorfismo craneal.**

Diversos autores describen un dimorfismo sexual en las cabezas de cocodrilos jóvenes y adultos, de entre 40 y 120 cm de longitud hocico-cloaca (Webb y Messel, 1978; Hall y Portier, 1994; Verdade, 2003). Las características craneofaciales son de especial interés al momento del reconocimiento visual en el período de reproducción, debido a que la región superior del cráneo, que es la parte de la cabeza expuesta cuando descansan en la superficie del agua, es diferente entre machos y hembras (Anderson y Vitt, 1990; Cooper y Vitt, 1993; Verdade, 2000). En general, los reptiles machos presentan una cabeza más grande que las hembras (Smith, y col., 1997).

Las hormonas sexuales han sido consideradas tradicionalmente como el principal mediador del dimorfismo sexual en el tamaño y fortaleza de los huesos del esqueleto. Esta consideración surge a partir de la observación de una reducción en el crecimiento del perímetro del periostio en ratas machos castradas en comparación con un aumento del perímetro del periostio en ratas hembras ovariectomizadas (Turner y col., 1990). Este importante estudio condujo a la hipótesis de que los andrógenos estimulan y los estrógenos inhiben el crecimiento del hueso radial en machos y hembras respectivamente. Estudios recientes han redefinido en parte este concepto, con evidencias que apuntan a que los estrógenos tienen acción en el desarrollo óseo en los machos también. En ratones machos, la deficiencia de estrógenos en las primeras etapas de la pubertad produce una reducción en la expansión del hueso radial, sustentando el concepto de que la aromatización de los andrógenos en estrógenos también contribuye a las diferencias de género (Callewaert y col., 2010).

La exposición a PE en general y a estrógenos ambientales en particular podría tener efectos sutiles alterando el desarrollo óseo y enmascarando las diferencias ligadas al sexo, o efectos drásticos dando lugar a malformaciones.

#### **1.9.3.4.2- Malformaciones orofaciales.**

Los cocodrilos, tienen un paladar secundario fusionado, similar al de los mamíferos. Anfibios y otros reptiles como ciertas especies de tortugas y culebras, solo tienen un paladar primario algo más desarrollado, originado de los procesos nasales medios, formando el techo de la boca. El desarrollo del paladar secundario está ausente en vertebrados inferiores, incluyendo peces. Por lo tanto, filogenéticamente la fisura palatina es ancestral al paladar fusionado (Montenegro y Rojas, 2005).

La morfogénesis craneofacial es el resultado de complejas interacciones espacio-temporales entre los diferentes componentes celulares de la cabeza. Diversas señales moleculares son intercambiadas entre el sistema nervioso central, las células del mesodermo y del epitelio endo/ectodérmico de los arcos

faríngeos para proporcionar la información de la posición necesaria para dar la forma correcta a los diferentes componentes óseos y musculares de la cabeza. Ligeras modificaciones espacio-temporales de estas vías de señalización pueden resultar en cambios profundos en el desarrollo craneofacial (Gitton y col., 2010)

Las malformaciones craneofaciales son frecuentes en la especie humana, predominando las fisuras orofaciales, como el labio leporino y paladar hendido, (González y col., 2003). La etiología de las malformaciones orofaciales es compleja y se ha ligado a factores ambientales y genéticos. Los genes homeóticos codifican factores de transcripción críticos para el desarrollo orofacial y la morfogénesis dentaria. Respecto a los factores ambientales, estudios en animales de laboratorio demuestran el efecto teratogénico del herbicida nitrofen y de las dioxinas, observándose alta incidencia de paladar hendido en ratones, ratas y hámster expuestos prenatalmente (Wickman y col., 2007)

#### **1.9.3.5- Perfil hematológico, bioquímico e inmunológico.**

Los valores de referencia hematológicos, inmunológicos y la química de la sangre son necesarios para una correcta valoración de los efectos del estrés ambiental, enfermedades infecciosas, parasitarias o toxicológicas en animales (Campbell, 1986; Merchant, y col., 2006a, b). Aunque los rangos de referencia se han informado para muchas especies de reptiles (Alleman y col., 1999; Dickinson y col., 2002; Casal & Orós, 2007), incluyendo varios cocodrilos (Glassman y col., 1981; Mateo y col., 1984; Millan y col., 1997; Stacy & Whitaker 2000; Schoeb y col., 2002), la información disponible sobre los valores basales de *C. latirostris* es escasa (ISIS, 1999). Los marcadores hematológicos, inmunológicos y bioquímicos en la evaluación del estado de salud-enfermedad, tanto en animales mantenidos bajo condiciones controladas como en programas de cría o capturados en la naturaleza, poseen gran utilidad y aplicabilidad.

#### **1.9.3.5.1- Componentes celulares sanguíneos.**

La evaluación de los componentes celulares en sangre periférica abarca el examen de extendidos sanguíneos, el recuento de eritrocitos, leucocitos y trombocitos, la determinación de la concentración de hemoglobina y la lectura del hematocrito (Campbell, 2004). Los eritrocitos policromáticos e inmaduros en ocasiones se presentan en el frotis de sangre periférica de reptiles, anfibios y peces. Los eritrocitos inmaduros aumentan durante los períodos de ecdisis (muda) y son más frecuentes en los reptiles pequeños. El grado de policromasia en los reptiles normales es generalmente bajo y representa menos del 1% de la población de eritrocitos, esto puede deberse a una tasa lenta de recambio de eritrocitos en comparación con las aves y los mamíferos, Teniendo en cuenta que las células rojas de reptiles presentan una vida media que puede ser de 600 a 800 días en algunas especies (Campbell, 2004), un aumento en el porcentaje de eritrocitos inmaduros podría evidenciar un proceso de recuperación frente a una anemia.

#### **1.9.3.5.2 Inmunidad humoral innata.**

El sistema inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo (Regueiro Gonzáles y col., 2003). Para eliminar un patógeno que haya establecido una infección (atravesando las barreras epiteliales de los vertebrados) lo primero que debe hacer el sistema inmune es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo. Para ello el sistema inmune ha desarrollado dos tipos de mecanismos: innatos y adaptativos, cuya diferencia principal reside en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, ya que los mecanismos efectores de destrucción son esencialmente similares (Regueiro Gonzáles y col., 2003).

La estrategia de la inmunidad innata es reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados que son comunes a un grupo o familia entera de patógenos. Por ello todos los individuos de una misma especie nacen con la capacidad innata e inmediata de reconocer y destruir numerosos

microorganismos con los cuales no han entrado en contacto previamente. Si estos mecanismos no consiguen eliminar la infección, al menos la mantienen bajo control mientras se desarrollan los mecanismos adaptativos, que requieren aproximadamente una semana para desarrollarse (Regueiro Gonzáles y col., 2003).

El sistema del complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la respuesta inmune y, junto a los fagocitos, es el principal responsable de la inmunidad innata. El sistema está formado por varias proteínas plasmáticas. La activación de estas proteínas es una reacción en cascada y da lugar a una serie de respuestas biológicas, dirigidas fundamentalmente hacia la eliminación directa (lisis) o indirectas (fagocitosis) de los microorganismos invasores, la inflamación (que atrae a otras células y moléculas para que ayuden) y la eliminación de los inmunocomplejos de la sangre (Regueiro Gonzáles y col., 2003).

Varios estudios se han centrado en las propiedades antimicrobianas del suero de los cocodrilos. En un trabajo realizado por Shaharabany y col., (1999) los autores observaron que los extractos crudos de tejidos del cocodrilo del Nilo (*Crocodylus niloticus*) presentan propiedades antimicrobianas. Resultados similares se obtuvieron con respecto al suero de *Alligator mississippiensis* (Merchant y col., 2003; 2005) y de yacaré (Siroski y col., 2009; 2010). La actividad antimicrobiana del suero es mediada por vía alternativa del complemento (Merchant y col., 2005). La inmunidad innata en las 23 especies de cocodrilos existentes, entre ellos el yacaré, se ajusta a los distintos linajes taxonómicos (Merchant y col., 2006).

Diversos ensayos en laboratorio y estudios de campo indican que los COCs, PCBs y pesticidas, modulan la respuesta inmune en roedores, fauna y seres humanos. (Harper y col., 1993; Ross y col., 1996; Wu y col., 1999; Segre y col., 2002; Smits y col., 2002). En anfibios se ha sugerido que una supresión directa o indirecta del sistema inmune por parte de los contaminantes podría impedir que el sistema inmunológico desarrolle una respuesta inmune normal y adecuada contra agentes patógenos (Carey, 2000). Hasta el momento, se

desconoce el efecto de la exposición a PE sobre la inmunidad innata del yacaré overo.

#### **1.9.2.5.3- Marcadores bioquímicos.**

La evaluación de marcadores bioquímicos junto a los parámetros hematológicos puede proporcionar información predictiva sobre la salud animal y, por lo tanto, se puede utilizar como una herramienta rápida para el diagnóstico. Concentraciones anormalmente bajas de los marcadores bioquímicos pueden ser debidas a diversos factores, tales como una incorporación disminuida al plasma por deterioro en la síntesis, deficiencia nutricional, absorción pobre, falta de precursores, etc. o bien a un aumento en su eliminación plasmática (demanda excesiva, excreción excesiva, pérdidas patológicas, etc). Al contrario, concentraciones anormalmente altas, pueden ser debidas a un aumento de su incorporación al plasma (aumento de la producción o de la entrada, liberación patológica del compartimento intracelular, etc.) o bien a una disminución de su eliminación plasmática (disminución de su utilización, excreción impedida, etc) (Ganong, 1992).

Para evaluar los efectos a mediano y largo plazo de la exposición a PE es de fundamental importancia conocer los rangos normales de marcadores del metabolismo energético, muscular y óseo, o marcadores que permitan evaluar integridad hepática y renal ya que estos órganos están involucrados en los procesos de biotransformación y detoxificación de xenobióticos.

#### **1.10- El yacaré overo como organismo centinela de contaminación ambiental.**

El yacaré overo es la especie utilizada como modelo animal para esta tesis. Taxonómicamente se encuentra dentro del orden Crocodylia, y según la sistemática cladística (Figura 8) se encuentra dentro de la familia de saurópsidos-arcosaurios, comúnmente conocidos como cocodrilos, la cual incluye a especies actuales de grandes reptiles semiacuáticos. El término "cocodrilo" también es utilizado incorrectamente para denominar a todos los

miembros del orden Crocodylia, el cual incluye a los cocodrilos, aligatores y caimanes (familia Alligatoridae), así como a los gaviales (familia Gavialidae) (Huchzermeyer F.W. 2003).

En la Figura 8 se muestra la ubicación taxonómica del yacaré overo en el Orden Crocodylia.

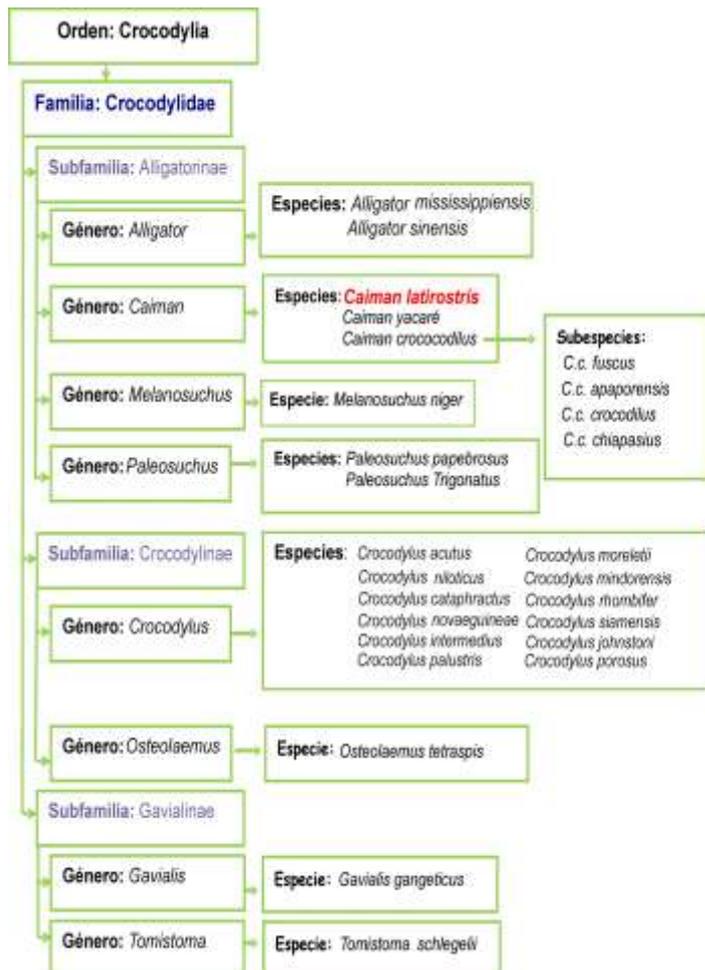


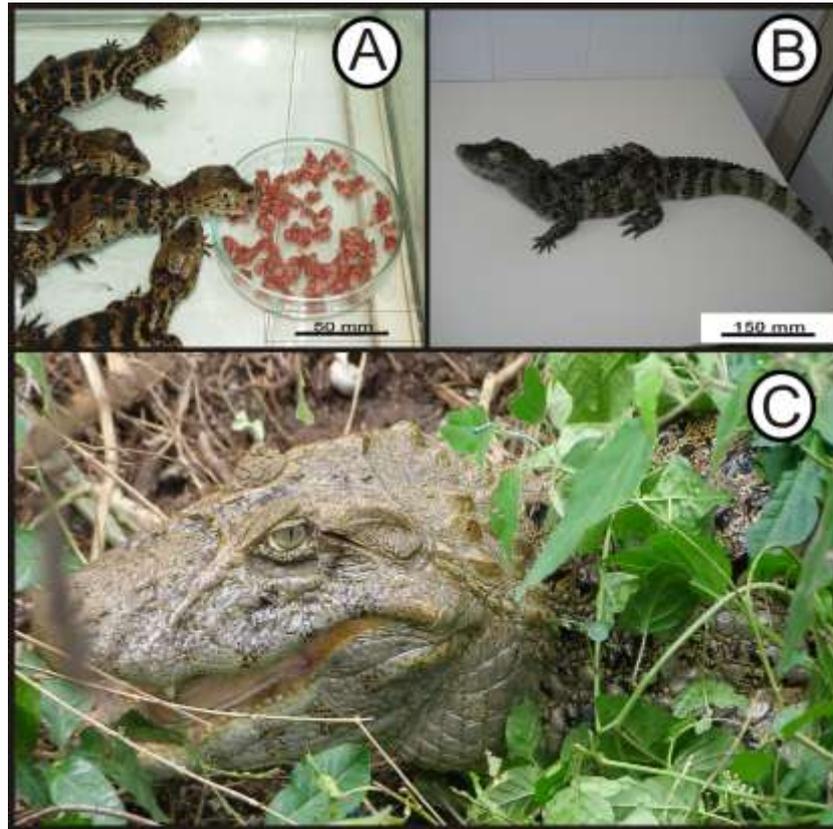
Figura 8: Ubicación sistemática de *Caiman latirostris*. Tomado de NCBI Taxonomy ID: 8493.

### 1.10.1- Descripción general.

*Caiman latirostris* (yacaré overo) es una especie silvestre de amplia distribución en el Litoral argentino y posee numerosas características que lo sitúan en una posición de privilegio a la hora de seleccionar posibles organismos centinelas de exposición a PE, las cuales se describen con más detalle a continuación.

El yacaré overo es un reptil de hábitos anfibios que pasa la mayor parte del tiempo en el agua, donde satisface la mayoría de sus requisitos de vida (Freiberg y Carvalho, 1985). Son vertebrados poiquiloterms que alcanzan una longitud máxima aproximada de 2,5 m con un peso de 80-90kg (Figura 9). Su coloración general es verde-grisácea con el vientre blanco-amarillento, a veces grisáceo. La cabeza es robusta con un hocico corto y ancho (Figura 9C) (de ahí el nombre “yacaré ñato” ó “caimán de hocico ancho”) (Prado, 2003).

Con relación a su dieta, el yacaré overo es depredador oportunista, variando conforme a su crecimiento, época del año y a la oferta de recursos (Santos y col., 1996). Su ingesta alimenticia comienza desde muy temprano, posibilitando de esta manera la exposición a contaminantes en todas las etapas de su vida. Los neonatos, una vez que han reabsorbido los restos del vitelo, se alimentan principalmente de insectos y otros invertebrados que encuentran en las proximidades del nido. Durante la etapa juvenil incorporan a la dieta gasterópodos acuáticos, crustáceos y pequeños vertebrados. Borteiro y col. (2008) estudiaron los hábitos alimenticios del *C. latirostris* en el noroeste de Uruguay, donde las presas más comunes fueron insectos, camarones, caracoles, peces y aves; en cambio fueron menos frecuentes arañas, cangrejos, anfibios, serpientes, tortugas y mamíferos. Peces y aves fueron consumidos por caimanes de todos los tamaños, mientras que la proporción de contenidos estomacales con invertebrados fue menor al aumentar el tamaño de los caimanes, y la de vertebrados fue mayor en los individuos de mayor tamaño.



**Figura 9.** Ejemplares neonatos, juveniles y adultos de *C. latirostris*. A) Crías de 20 días de edad alimentándose en condiciones controladas de laboratorio. B) Características de la cabeza a los 12 meses de edad, se observa el maxilar inferior más corto que el superior. C) Hembra adulta (más de 1,50 m de largo total) custodiando su nido en su hábitat natural; la flecha indica un huevo que fue depredado.

### 1.10.2- Distribución geográfica.

La vasta superficie de humedales y sistemas ribereños de Latinoamérica provee un extenso hábitat y amplia zona de distribución para los cocodrílidos, que representan un recurso de considerable valor económico y ecológico. Esta distribución permite contar con una adecuada disponibilidad de muestras y, gracias al desarrollo de tecnologías de localización satelital, es posible realizar una precisa caracterización geográfica de la procedencia de las muestras.

*Caiman latirostris* habita el norte del país, en una gran diversidad de ambientes relacionados a los sistemas hídricos de las provincias de Misiones,

Corrientes, Chaco, Formosa, Entre Ríos, Santa Fe, Salta y Jujuy (Micucci y Waller, 1995; Prado, 2003) (Figura 10).



**Figura 10:** Distribución geográfica de *Caiman latirostris* en Latinoamérica.

En Santa Fe, se distribuye en la llanura de inundación del río Paraná, la cuenca del Salado y la cuenca de los Saladillos (Larriera, 1995). En Entre Ríos, se radica en el centro-norte de la provincia, principalmente en los departamentos de La Paz, Feliciano y Federal. Diferentes programas se desarrollan en nuestro país (Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Chaco y Formosa) para promover el uso sustentable del yacaré a través de programas de rancheo, fomentando la conservación de la especie y su hábitat al otorgarle valor económico. En el marco de estos programas se cosechan huevos en la naturaleza, se identifican los ejemplares al momento del nacimiento y se lleva a cabo la cría de los mismos en cautiverio. Luego, los ejemplares son usados acorde a una estrategia de repoblación de la especie y se realiza un seguimiento de los individuos en su hábitat natural.

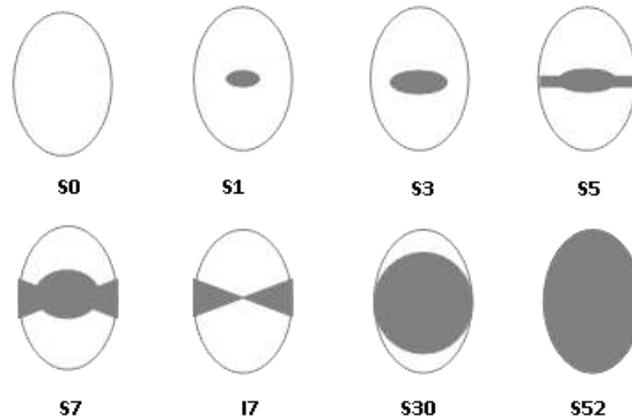
### 1.10.3- Reproducción.

La madurez sexual del yacaré overo ocurre una vez alcanzado un tamaño aproximado de 120-140 cm, lo cual podría tener lugar entre los 6 y 10 años de edad en función del ambiente y su estado nutricional (Micucci y Waller, 1995; Prado, 2003; Verdade, 1995), siendo su expectativa de vida semejante a la del ser humano. Presentan un ciclo reproductivo estacional: el cortejo y la cópula durante la primavera (octubre-diciembre); la construcción del nido y la postura durante el verano (diciembre-febrero) y los nacimientos, a fines del verano y comienzos del otoño (febrero-abril).

Las hembras grávidas construyen un nido en forma de montículo con material característico del lugar, en las proximidades del agua, de manera que las crías puedan acceder fácilmente a la misma (Verdade, 1995; Yanosky y Mercolli, 1995). La oviposición es única, con un tamaño de postura en promedio de 34 huevos (Stoker y col., 2003).

En las 24 horas posteriores a la postura, se produce la adhesión del embrión de yacaré overo a la cara interna de la cáscara del huevo. El lugar de la adhesión se visualiza desde el exterior como un punto opaco al transiluminar el huevo. La opacidad va avanzando conforme prosigue el desarrollo del embrión hasta formar un anillo alrededor del eje menor del huevo, el que se completa alrededor del séptimo día posterior a la postura, al igual que lo descrito por Ferguson, (1985) para *A. mississippiensis*. Una vez completo, este anillo comienza a extenderse hacia los extremos del eje mayor quedando el huevo completamente opaco al finalizar el período de incubación (Figura 10). El avance de la banda opaca se utiliza para verificar la viabilidad embrionaria. Los huevos con embriones que han muerto pero que no están infectados sufren un arresto del desarrollo de la banda al momento de la muerte del embrión. Los huevos infectados tienen bandas pobremente definidas y, generalmente, de forma errática. Los huevos infértiles nunca desarrollan banda permaneciendo siempre totalmente translúcidos (Ferguson, 1985). En la naturaleza, sólo un 10% de los animales que nacen alcanza a cumplir el año de vida, debido a depredaciones y el alto riesgo de muerte por exposición a heladas invernales a una edad temprana (Micucci y Waller, 1995). La estrategia reproductiva de la

especie, como en el caso de la mayoría de los reptiles, es producir una abundante descendencia, lo que garantiza que al menos algunos individuos lleguen a la adultez.



**Figura 11:** Diagrama del avance de la banda opaca en huevos de *Alligator mississippiensis*. **S:** cara del huevo a la que se adhiere el embrión, corresponde a la cara superior en su posición en el nido; **I:** vista desde la cara inferior (la que está apoyada sobre el nido); **números:** indican los días desde la postura. Modificado de Ferguson, M.W.J. (1985).

En *C. latirostris*, como en varias especies de reptiles, la determinación sexual es dependiente de la temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico del desarrollo embrionario (Pieau y col., 1999; Stoker y col., 2003). En las especies de reptiles que presentan determinación sexual por temperatura (DST, o TSD, *temperature-dependent sex determination*), los tejidos embrionarios realizarán su diferenciación hacia un fenotipo femenino o masculino dependiendo de la temperatura a la cual se hayan incubado los huevos (Pieau y col., 1999; Lang y Andrews, 1994). La mayoría de estas especies con DST carecen de cromosomas sexuales distintivos y el sexo se determina durante la organogénesis a partir de las etapas 20-21 del desarrollo embrionario (Ferguson, 1985; Ferguson y Joanen, 1983; Crain y Guillette, 1998). En el caso de *C. latirostris*, hemos verificado que la incubación de los huevos a una temperatura constante de 30°C permite obtener 100% de animales hembras, mientras que, si la incubación se produce a 33°C la totalidad de los embriones se diferenciará a machos (Stoker y col., 2003). También demostramos que la exposición a E2 o BPA de huevos incubados a 33°C (temperatura de producción de machos) durante el período embrionario

termosensible, en dosis de 1,4 y 140 ppm respectivamente, puede superar el efecto de la temperatura sobre la determinación sexual, redireccionando el desarrollo de la gónada hacia ovario (Stoker y col., 2003; 2008). Este fenómeno, denominado determinación sexual hormonal (DSH), se ha observado también en otras especies que poseen DST, como por ejemplo: tortugas, lagartijas y aligatores (Crain y col., 1997; Crews y col., 1996; Milnes y col., 2002).

#### **1.10.4- Razones que justifican la elección del yacaré overo como organismo centinela.**

Las razones que apoyan la elección de *C. latirostris* como centinela de contaminación ambiental por xenoestrógenos pueden ser clasificadas en razones de índole biológica y logística:

##### *Razones de índole biológica:*

- Posible exposición a contaminantes en todas las etapas de su vida
- Fidelidad al hábitat
- Posición superior en la red trófica
- Expectativa de vida semejante a la del hombre (que junto a sus hábitos alimenticios permite la bioacumulación y biomagnificación de contaminantes con consecuentes efectos biológicos)
- Determinación sexual por temperatura, influenciada por la presencia de xenoestrógenos.

##### *Razones de índole logística:*

- Amplia distribución en la región
- Disponibilidad de muestras y caracterización precisa de su distribución geográfica (por estudios satelitales e *in situ*)
- Posibilidad de cría de ejemplares en cautiverio, seguido de identificación y seguimiento en su hábitat natural
- Interés e importancia regional

Los ambientes acuáticos donde habitan los yacarés overos reciben desechos provenientes de la industria y de las prácticas agropecuarias. Por lo tanto, para contribuir a su conservación, se hace necesario proteger las cuencas hídricas, ya que éstas constituyen un depósito de pesticidas, provenientes del lavado de las tierras de cultivo, y de efluentes industriales y urbanos. La selección y validación de modelos biológicos que nos permitan realizar la detección de contaminantes de manera confiable es una herramienta útil para este fin (Petty y col., 2000), siendo muy ventajoso encontrar indicadores que permitan evidenciar los efectos de la exposición.

# OBJETIVOS

## 2.1- Hipótesis

Los ambientes acuáticos donde habitan los yacarés overos reciben desechos provenientes de la industria y de las prácticas agropecuarias (compuestos agroindustriales). De esta manera, ciertos compuestos agroindustriales clasificados como PE contaminan los ecosistemas naturales donde habita el yacaré overo. Nuestra hipótesis general de trabajo es que la exposición del yacaré overo a estos contaminantes con capacidad de modificar el sistema endocrino afecta la microestructura de los huevos y la viabilidad embrionaria, altera el normal desarrollo de variables dimórficas asociadas a sus hábitos reproductivos y deteriora la tasa de crecimiento normal de los individuos de esta especie, resultando en una severa modificación de su dinámica poblacional.

## 2.2-Objetivos Específicos

1- Evaluación de la exposición natural a compuestos agroindustriales.

a) Registrar y evaluar variables ecológicas relacionadas a la especie, su habitat y el éxito reproductivo.

En huevos de *Caiman latirostris*, colectados en zonas con diferente grado de intervención antrópica:

a) Determinar la concentración de distintos compuestos organoclorados (COCs).

b) Establecer características morfométricas, porosidad y grosor de las cáscaras.

c) Evaluar relaciones entre concentración de COCs, características de la cáscara en huevos y variables reproductivas.

d) Documentar y establecer incidencia de malformaciones congénitas.

2- Evaluación de la exposición experimental a compuestos agroindustriales.

Los compuestos agroindustriales utilizados en la presente tesis doctoral fueron el BPA, END y ATZ.

En *C. latirostris* juveniles criados en condiciones controladas:

a) Determinar los efectos de la exposición a PE sobre las curvas de crecimiento, evaluando variables alométricas e índices de masa corporal (IMC)

y de condición corporal (ICC), descartando efectos neurotóxicos de las dosis administradas.

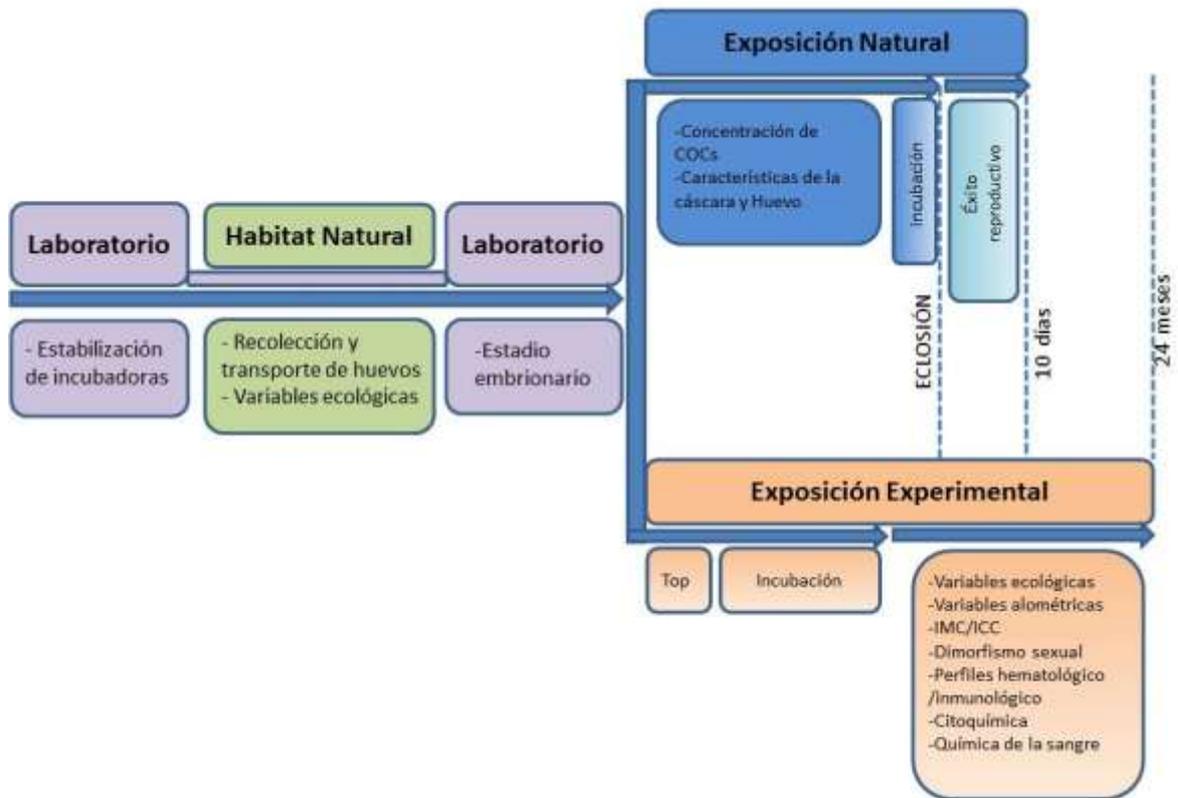
b) Establecer las características que diferencian al *phallus* de machos y hembras y evaluar el efecto de la exposición a PE sobre las mismas.

c) Establecer las características cráneo-faciales en ambos sexos y evaluar el efecto de la exposición a PE sobre las mismas.

d) Determinar los efectos de la exposición a PE sobre los parámetros hematológicos, inmunológicos y bioquímicos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1- Diseño experimental.



**Figura 12.** Esquema que ilustra las acciones realizadas y las variables evaluadas en cada etapa del desarrollo del experimento. Top: topicación; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice de condición corporal; COCs: compuestos organoclorados.

La Figura 12 muestra en una escala temporal las distintas etapas desarrolladas para la evaluación de los efectos de la exposición natural y experimental a PE. El diseño experimental presenta una etapa en común para la evaluación de ambas exposiciones, en la cual se preparan y estabilizan las incubadoras, se cosechan los huevos a campo y se recogen los datos y muestras en el laboratorio. Luego de esta etapa los huevos se colocan en incubadoras separadas y destinadas para la evaluación natural y experimental.

### **3.2- Incubadoras: Optimización de las condiciones para la eclosión.**

Durante los dos meses previos a la fecha estimada de recolección de huevos, se estabilizaron la temperatura y humedad de las incubadoras en los rangos preestablecidos:  $33 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  que es la temperatura a la cual se obtiene el 100% de machos y  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  en la que se obtienen 100% de hembras. La humedad alcanzada en los sistemas de incubación fue adecuada, manteniéndose en el rango de 92-98%. Los huevos no presentaron desarrollo significativo de la cámara de aire, evidenciando ausencia de deshidratación.

Las incubadoras utilizadas fueron diseñadas en nuestro laboratorio. Para su construcción no se utilizaron materiales plásticos ni orgánicos (ej: material de nido), evitando el posible aporte de xenoestrógenos durante la incubación. Las incubadoras consisten en recipientes de vidrio de 80cm x 50cm x 40cm, recubiertos de material aislante. Están cargadas con agua de red hasta cubrir una altura de 20 cm, para otorgar la humedad necesaria al ambiente. Sumergidos en la base de cada incubadora hay tres aclimatadores automáticos regulados por un termostato, cuyo sensor permanece sumergido a dos centímetros por debajo de la superficie del agua (Figura 13). Los huevos son colocados en el interior de la incubadora sobre una bandeja o rejilla de alambre galvanizado con cinco carriles diseñados para separar los huevos correspondientes a los diferentes grupos experimentales. Esta bandeja es sostenida por cuatro pilares de vidrio, quedando aproximadamente unos 5 cm por encima del nivel del agua. La temperatura fue registrada simultáneamente por dos termómetros: un termómetro de lectura externa (Alla®) y un termómetro de registro de datos (Boxcar® for Windows Versión 3.6.0.6 Onset Computer Corp. Copyright 1999). Este último sistema es más sensible que el anterior y fue programado para tomar datos de temperatura cada 10 minutos. La humedad del ambiente interno fue controlada por un sensor (Alla®). Durante los dos meses previos a la fecha estimada de recolección de huevos, se realizó la optimización de las incubadoras, regulando los termostatos de manera tal de alcanzar un régimen estable de todo el sistema de incubación con la temperatura y humedad preestablecidas anteriormente.

En la Figura 13 se muestra una incubadora con todos los elementos necesarios para mantener controladas la temperatura y la humedad.



**Figura 13:** Incubadora con el instrumental requerido para mantener la temperatura y humedad constantes. Los aclimatadores se encuentran sumergidos bajo una columna de agua de 20 cm de alto, la bandeja metálica donde se depositan los huevos es sostenida por pilares de vidrio. Los termómetros o sus sensores (lectura externa, Boxcar® y lectura interna, Alla®) y el sensor de humedad (Alla®) se ubican en la proximidad de los huevos. El sistema se encuentra aislado del exterior por paredes de telgopor de 5cm de espesor.

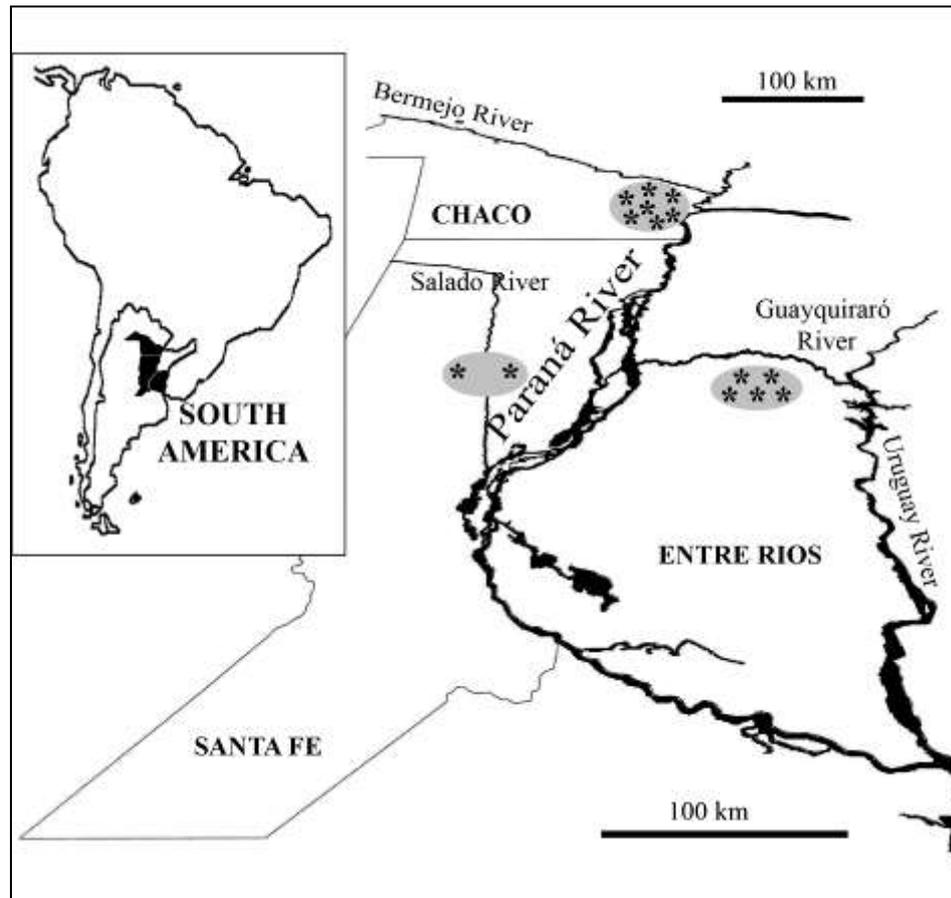
### 3.3- Huevos: Recolección en habitats naturales.

#### EXPOSICIÓN NATURAL:

Durante los meses de diciembre-enero de los años 2002, 2006-2008, se cosecharon los huevos de 14 nidos en zonas con diferente grado de intervención antrópica, **baja a moderada** (situados en reservas naturales, aguas arriba de zonas urbanizadas) en las provincias de Chaco (refugio “El Cachapé”, La Eduvigis) y Santa Fe (en las zonas del Fisco, los Palmares de Paiva, San Javier y San Cristóbal), o con **alta intervención** (linderos a campos con intensa actividad agrícola) en Entre Ríos (San Víctor, Feliciano y Federal). Los huevos procedentes de 14 nidos fueron destinados para la exposición natural a PE.

#### EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL:

Para la evaluación de la exposición experimental a PE durante las estaciones reproductivas de los años 2007 y 2008 se cosecharon 8 nidos de *C. latirostris* (yacaré overo) en humedales del refugio “El Cachapé” de la Fundación Vida Silvestre cercano a la localidad de La Eduvigis, provincia de Chaco.



**Figura 14.** Zonas de cosecha de los nidos de *C. latirostris*. Los asteriscos representan los nidos recolectados para evaluar la exposición natural.

### 3.4- Estadio embrionario.

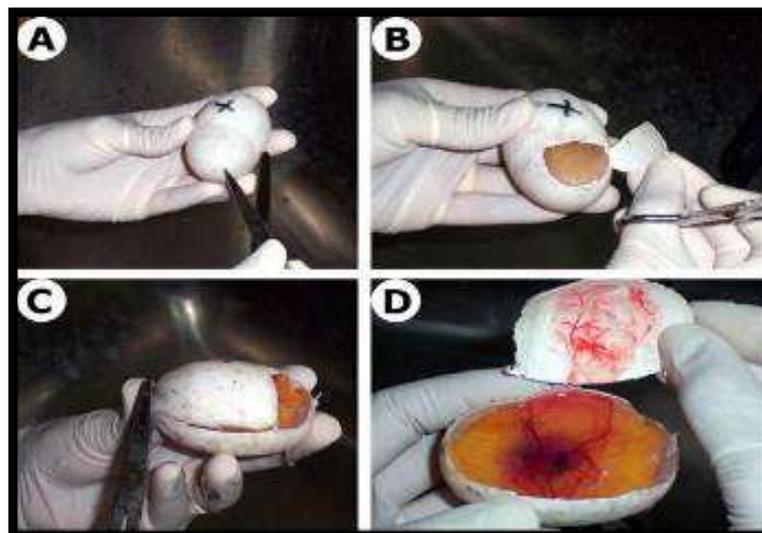
Para ambos experimentos los huevos fueron cosechados inmediatamente después de la oviposura, etapa en la cual el disco embrionario está cubierto por una fina capa de albúmina y flota libremente en la parte superior de la yema. Su localización precisa depende de la posición del huevo en el nido. Si el huevo es movido durante las primeras 24 horas luego de la postura, el disco embrionario se mueve al nuevo punto superior de la yema sin efectos perjudiciales. Por el contrario, si es movido luego de transcurridas 24 horas de la postura, es muy probable que el embrión no sobreviva porque el disco embrionario ya está unido a la parte interior de la membrana de la cáscara, lo que se visualiza como un punto opaco en esta área (Ferguson, 1985). Para evitar la muerte embrionaria provocada por el desprendimiento del embrión de las membranas internas de la cáscara, la superficie superior de los huevos fue marcada con lápiz de grafito antes de ser removidos del nido, de tal manera de

mantener la misma orientación que tenían en el nido durante el traslado y la incubación en condiciones de laboratorio (Figuras 15A y B). Para su traslado, los huevos fueron colocados en un soporte de goma espuma conteniendo material de nido (pasto y follaje) para evitar el exceso de vibraciones y mantener la humedad (Figura 15C).



**Figura 15:** Cosecha de huevos a campo. A) nido de yacaré overo formado de gramíneas, material abundante en el ambiente de nidificación. B) con lápiz de grafito se realiza una cruz en la parte superior del huevo para respetar su orientación dentro del nido. C) traslado al laboratorio en soportes de goma espuma.

Antes de comenzar la incubación en condiciones controladas se procedió a la determinación del estadio embrionario (un huevo por nido) siguiendo los pasos que se ilustran en la Figura 16.



**Figura 16:** Secuencia para la apertura de huevos de *C. latirostris* para determinar el estadio embrionario. A) corte inicial en un extremo de la cáscara B) eliminación de exceso de fluido corioalantoideo. C) apertura completa de la cáscara. D) ubicación del embrión rodeado de una profusa irrigación.

Extraído el embrión del huevo se realizó su caracterización bajo lupa para determinar el estadio de desarrollo embrionario siguiendo los criterios establecidos previamente (Stoker y col., 2003; Stoker, 2004).

### **3.5- Variables ecológicas.**

En el campo, se registró el número de huevos por nido, el tipo de nidificación (material utilizado para la realización del mismo), ubicación topográfica del nido (embalse, vegetación flotante, monte, etc) y el grado de intervención antrópica del lugar (observación de los alrededores, proximidad a un curso de agua, historia del lugar).

En el laboratorio, se seleccionaron al azar 2 a 4 huevos de cada nido para la determinación de residuos de COCs, evaluación de las características de la cáscara (grosor y porosidad) y determinación del estadio embrionario. Los huevos restantes se incubaron en condiciones controladas para evaluar los efectos de la exposición Natural sobre el número de nacidos vivos, supervivencia de los neonatos a los 10 días e incidencia de malformaciones.

### **3.6- Detección de residuos de compuestos organoclorados.**

La detección de los residuos de COCs se realizó a partir de un homogenado del contenido del huevo, excluyendo la cáscara (utilizada para evaluar sus características) y el embrión (utilizado para determinar el estadio embrionario). El homogenado se colocó dentro de un recipiente color caramelo (Figura 17) previamente lavado con acetona/hexano y se almacenó en freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 17.** Obtención de la muestra utilizada para la detección de residuos de COCs.

Se analizaron cuarenta y seis muestras para detectar y cuantificar los siguientes compuestos: hexaclorobenceno (HCB), hexaclorociclohexano (isómeros:  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, y lindano), aldrín (ALD), oxiclordano (OCLD),  $\alpha$ -clordano ( $\alpha$ -CLD),  $\gamma$ -clordano ( $\gamma$ -CLD), heptacloro (HPT), heptacloro epóxido (HTX), dieldrín (DLD), endrina (ENDR), mirex (MRX), metoxicloro (MTX), diclorodifenildicloroetileno ( $p,p'$ -DDE y  $o,p'$ -DDE), tetraclorodifeniletano ( $p,p'$ -TDE,  $o,p'$ -TDE), diclorodifeniltricloroetano ( $p,p'$ -DDT,  $o,p'$ -DDT),  $\alpha$ -endosulfán ( $\alpha$ -END),  $\beta$ -endosulfán ( $\beta$ -END), sulfato de endosulfán (ENDSULP) y catorce congéneres de bifenilos policlorados (PCBs) (*International Union of Pure and Applied Chemistry* numbers 1, 5, 25, 28, 50, 52, 86, 101, 138, 153, 154, 180, 200 y 209). Las concentraciones de COCs fueron medidas siguiendo el método descrito previamente (Muñoz-de-Toro y col., 2006) con algunas modificaciones en las etapas pre-analíticas, debido a las diferencias de la matriz biológica. En la Tabla 6 se resumen los pasos metodológicos.

**Tabla 6.** Etapas de la técnica de detección y cuantificación de COCs.

<b>PROCEDIMIENTO METODOLOGICO</b>	
<b>Extracción de la porción lipídica</b>	El homogenado se deshidrató con sulfato de sodio anhidro y se extrajo (dos veces) con n-hexano/acetona (4/1) <sup>1</sup> . La fase orgánica superior (clara) se separó, se evaporó a sequedad y el porcentaje de grasa extraíble se determinó por gravimetría mediante la utilización de una balanza analítica de precisión <sup>2</sup> .
<b>Extracción con Acetonitrilo</b>	100 mg de grasa se disolvieron en 0,3 ml de n-hexano, se agregaron 8 ml de acetonitrilo saturado en n-hexano + 1% ácido acético, se mezcló con vortex y se centrifugó. Se descartó la fase orgánica y se agregaron 0,5 ml de NaCl saturado, 25 ml de agua y 4 ml de n-hexano y se mezcló. Este paso se realizó dos veces. Se recogió la fase orgánica, se evaporó a sequedad y se re disolvió con 1 ml de n-hexano.
<b>Limpieza del extracto (clean up- Alúmina)</b>	El extracto se transfirió a un cartucho de extracción de fase sólida (SPE) con alúmina (0,5 g), Florisil (1g) y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro. Para la extracción de la fase sólida, se utilizaron tubos SPE de 10 ml Super-clean LC-Alumina-N <sup>3</sup> . El cartucho de SPE se eluyó con 10 ml de n-hexano y 5 ml de éter n-hexano/éter etílico (85/15).
<b>Concentración</b>	El eluato se concentró a 0,5 ml.
<b>Limpieza del extracto (clean up- Florisil)</b>	Se realizó un segundo clean-up con tubos Super-clean Envi-Florisil SPE <sup>3</sup> .
<b>Concentración</b>	El volumen de disolvente se redujo a sequedad con una corriente de nitrógeno y se re disolvió con 1 ml de iso-octano
<b>Determinación cromatográfica (Gas-líquido)</b>	El concentrado de 1 ml se inyectó en el cromatógrafo gaseoso con detector de captura electrónico (ECD Ni 63) <sup>4-5</sup> . Las columnas para la cromatografía gaseosa fueron: Columna: Pas 5 (25 m; 0,32mm ID, film th. 0,52 mm) y Pas 1701 (25 m; 0,32mm ID, film th. 0,25 mm).
<b>Confirmación por espectrometría de masa</b>	En muestras seleccionadas al azar se confirmó la identidad y concentración de COCs mediante el sistema de cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masa GC-MS <sup>6</sup> .

<sup>1</sup> Todos los solventes usados fueron de calidad HPLC, Merck, Darmstadt, Germany.<sup>2</sup> Mettler Toledo AB 204, Barcelona, España.<sup>3</sup> Supelco, Bellefonte, PA-USA

<sup>4</sup> Hewlett Packard Modelo 5890

<sup>5</sup> Se utilizaron estándares de pesticidas organoclorados (Pestanal, Honeywell Riedel-de Haen Fine Chemicals, Seelze, Germany) y estándares de congéneres de PCB (Ultra Scientific, North Kingstown, RI-USA)

<sup>6</sup> GC-MS: cromatografía gaseosa-espectrometría de masa, Sistema GS-MS VG – TRIO – 2, columna capilar Ultra-2, 25 m x 0,2 mm d.i., filtro de masa cuadrupolar

Se prepararon muestras testigo utilizando huevos de gallina (*Gallus gallus*), a las que se les agregaron concentraciones conocidas de los plaguicidas organoclorados y los PCB. Las recuperaciones porcentuales se encontraron en el rango de 70 a 120% (n=7), aunque para  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, OCLD y LDN el rango fue de 60 a 70% (n=7). El desvío estándar relativo fue inferior al 20% para todos los residuos. El límite de detección (LD) fue de 10 ng/g de lípido para  $\alpha$ -HCH, CLD, p,p'-DDT y ENDSULP; 2 ng/g para BZ 1, 5, 25, 86, 101, 138, 154, 180, 200 y 209; y 5 ng/g para el resto de los plaguicidas clorados y congéneres de PCB evaluados, establecido en base a 3,3 veces el desvío estándar de réplicas del blanco. El límite de cuantificación (LC) se calculó como 6 veces el desvío estándar de réplicas del blanco, para los compuestos con LDs de 5 y 10 ng/g y 7,5 veces para aquellos con LDs de 2 ng/g.

### 3.7- Características morfométricas de los huevos.

A cada uno de los huevos, evitando movimientos bruscos y rotaciones, conservando siempre la posición de la marca hacia arriba (Figura 18), se les registraron el peso, ejes mayor y menor. Para pesar los huevos se utilizó una balanza (Precisión TH2000; Figura 18A). Para la determinación del eje mayor y menor del huevo se utilizó un calibre digital (Digital Caliper 150 x 0,01mm; Figura 18B y C).



**Figura 18.** Registro de variables de los huevos. A) peso del huevo en gramos; B) medida del eje menor en milímetros del huevo; C) medida del eje mayor en milímetros del huevo.

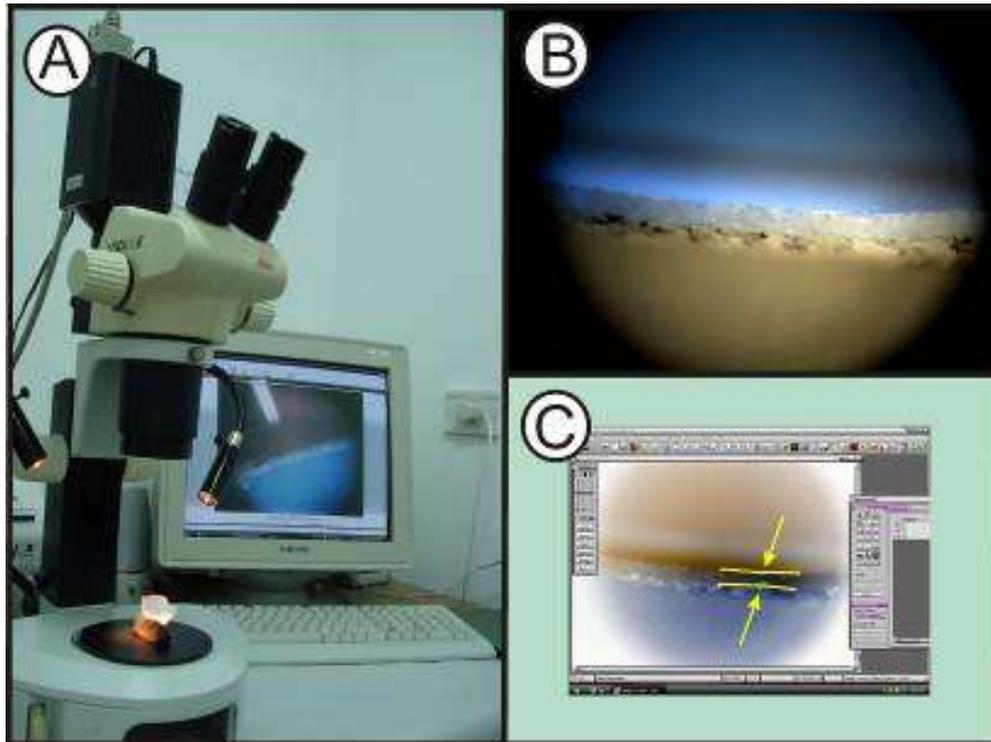
### **3.8- Características de la cáscara.**

La cáscara del huevo es un reservorio de calcio para el embrión, por esta razón sus características cambian a medida que el desarrollo del embrión avanza y en consecuencia podría ser un factor de confusión a tener en cuenta en el análisis de los resultados. Todas las muestras de este trabajo doctoral fueron recolectadas en estadios tempranos del desarrollo embrionario.

A las cáscaras se les extrajo la membrana corioalantoidea y se les realizó un lavado para retirar los residuos externos provenientes del nido e internos del contenido del huevo. Luego del lavado y deshidratación, se realizó una primera división de la cáscara en región medial y polos. Mediante una segunda partición se generaron fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> de cada región. Estos fragmentos fueron destinados a la cuantificación del grosor y densidad de poros de la cáscara correspondientes a cada región (medial y polar).

#### **3.8.1- Grosor de la cáscara.**

Los fragmentos polares y mediales de las cáscaras fueron montados sobre un soporte de material flexible para obtener fotografías digitales de cada uno, mediante una cámara color Spot Insight QE (USA) acoplada a una lupa estereoscópica de disección Leica GZ6 (Leica Inc., Buffalo, NY; Figura 17A y B). La medición del grosor de las cáscaras se realizó con las herramientas de análisis disponibles en el software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (media Cybernetics, USA). Se trazaron dos líneas para delimitar el grosor de la cáscara, obteniéndose un promedio de la totalidad de las mediciones entre ambas marcas (Figura 19C).



**Figura 19.** A) dispositivo para obtener imágenes digitalizadas del grosor de la cáscara. B) Imagen obtenida por la cámara Spot Insigth en un aumento de 2X. C) Ejemplo de una imagen obtenida software Image Pro-Plus 4.1.0.1 para la medición del grosor (las flechas indican las líneas usadas como referencia para medir el grosor).

### 3.8.2- Densidad de poros de la cáscara.

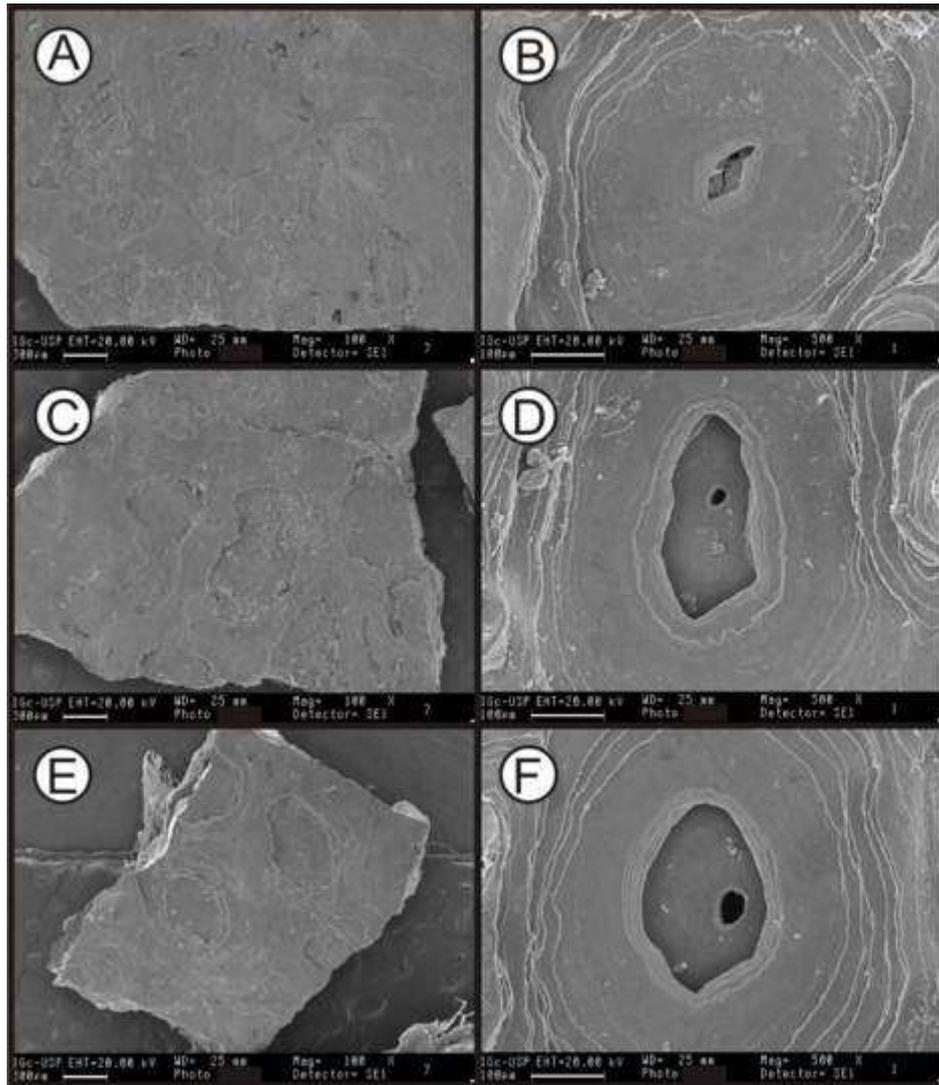
Esta etapa experimental se realizó en colaboración con el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo (Brasil). Para establecer el número de poros por unidad de superficie y sus características se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca LEO 440i. Este microscopio permite barrer con un haz de electrones la superficie de la muestra y obtener imágenes en tres dimensiones de alta resolución.



**Figura 20.** Colocación de los fragmentos de cáscara en el portamuestras (*stub*) del MEB. El portamuestra es un soporte metálico en el cual van adheridas las porciones de cáscara a las cuales, luego se las baña con oro coloidal antes de ser ingresadas al MEB. En el inset se pueden observar a mayor aumento los portamuestras.

Los fragmentos de las cáscaras ( $2-7 \text{ mm}^2$ ) fueron sujetos en el portamuestras (*stub*) bajo lupa estereoscópica (Figura 20). Antes de ser ingresados al MEB se realizó un baño de oro sobre las muestras. Este baño de oro es necesario para permitir que el haz de electrones primario choque contra la muestra recubierta con un material conductor que emita partículas eléctricamente conductoras. El recubrimiento se realizó con un rociador o *Sputter coater*, donde se coloca la muestra dentro de una cámara con vacío. Se programó el tiempo de recubrimiento en 2 minutos, tiempo suficiente para que el oro cubra uniformemente la muestra. Una vez finalizado este proceso, se produce el ingreso lento de aire a la cámara, dejando la muestra lista para colocarla en el MEB.

Las imágenes fueron tomadas en aumentos de 100 y 500X (Figura 21). Las mediciones de la cantidad de poros y la superficie de cada fragmento se llevaron a cabo en las electromicrográficas utilizando el programa de procesamiento de imágenes Image J (NIH, Bethesda, USA). El resultado se expresó como número de poros / unidad de superficie.



**Figura 21:** Porosidad de la cáscara de huevos de yacaré overo. Imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido. A, C y E (100X), B, D y F (500X). Las imágenes obtenidas a mayor aumento nos permiten verificar la apertura del poro.

### 3.9- Éxito reproductivo.

Para evaluar el éxito reproductivo del *C. latirostris*, la recolección de datos comienza en el campo, donde se registra el número total de huevos en el nido. Una vez llegados al laboratorio se examina el estado general de los huevos, prestando atención a abolladuras en la cáscara, presencia de insectos, color extraño y si se encuentra putrefacto o no. El resto de los huevos se distribuye uniformemente en las incubadoras. Para evaluar el desarrollo del embrión, los huevos se trans-iluminan para constatar el normal avance de la banda opaca y el desarrollo embrionario (Figura 22). Entre los 60 y 70 días de incubación, cuando

se produce la vocalización o ruptura de la cáscara por parte del neonato, se procede a asistir la eclosión de los huevos. Durante la eclosión se registran los nacimientos vivos para evaluar el éxito de la eclosión (número de crias nacidas vivas/ número de huevos incubados). Una vez asistidos, los neonatos se examinan y se verifica la cicatrización abdominal y si hay o no presencia de malformaciones.



**Figura 22.** Avance de la banda opaca y viabilidad embrionaria. Los huevos se trans-iluminan para evaluar el avance de la banda opaca (el avance de la banda opaca se detiene cuando hay muerte embrionaria).

## Exposición experimental

Una vez en la incubadora y previamente a la aplicación de los tratamientos, se verificó el estadio de desarrollo embrionario, ya que la aplicación de los tratamientos (topicación de los huevos) debe realizarse en el estadio 20, que corresponde al “período crítico” sensible a la temperatura para la determinación del sexo y de sensibilidad elevada a la acción de PE (Stoker y col., 2003, 2008; Rey y col., 2009). Para estimar el tiempo necesario para que los embriones alcancen el estadio 20 de desarrollo en las diferentes temperaturas de incubación, se utilizaron los datos recogidos previamente (Stoker, 2004).

En la Figura 23 se observan embriones en los estadios previos e inmediato posterior al estadio 20. A modo de ejemplo los embriones en estadio 20 de desarrollo, presentan las siguientes características:

Miembros: se observan uñas primordiales en los tres dígitos del medio de manos y pies. La secuencia de aparición de las uñas permite identificar estadios previos, en primer término aparecen en el dígito mayor del pie, posteriormente y de manera secuencial en los otros dos dedos del pie, en el dedo mayor de la mano y finalmente en los tres dígitos de la mano. Las aperturas interdigitales se extienden aproximadamente 1/4 a lo largo de los dedos. Los dos dedos de los extremos de manos y pies nunca desarrollan uñas.

Maxilar inferior: completa su desarrollo en la etapa 20, siendo este maxilar más corto que el superior y conservando esta relación en la vida adulta.

Genitales externos: el primordio de los genitales externos aparece como una elevación en forma de punta, siendo en esta etapa más visible.

Paladar: se encuentra completamente cerrado pero la valva basal aún no está presente.

Cola: tiene su punta enroscada.

Coloración: manchas blancas de osificación están presentes a lo largo de los márgenes de ambos maxilares (inferior y superior), alrededor de los meatos auditivos externos y dentro de los elementos proximales y distales de los miembros.

Escamas y escudillos: la formación de escamas es marcada en el dorso y los escudillos están comenzando a aparecer en la región del cuello detrás del cráneo.



**Figura 23:** Estadios embrionarios 13 a 21 de *C. latirostris*. Marcado con un asterisco (\*) se resalta un embrión en estadio 20 de desarrollo embrionario.

Para verificar la viabilidad de los huevos durante el proceso de incubación, se controló el avance de la banda opaca como se mostró anteriormente en la Figura 22.

### 3.10- Topicación: Tratamientos *in ovo* e Incubación.

Las sustancias en estudio se aplicaron por topicación (Figura 24) sobre la cáscara del huevo, depositando en la zona donde se inicia la “banda opaca” una única dosis de la droga o vehículo, a la concentración correspondiente de acuerdo con el grupo experimental al cual fue asignado el huevo. La aplicación se realiza en esta zona porque es el sitio donde se encuentra adosado el embrión y está caracterizada por poseer mayor irrigación. Para respetar la dosis en cada uno de los tratamientos, fue necesario tener en cuenta el peso de cada huevo, por lo tanto el volumen de topicación fue variable, con un promedio de 50  $\mu$ l/huevo, utilizándose etanol absoluto como vehículo.



**Figura 24:** Tratamiento de los huevos. Durante la topicación se deposita la sustancia a evaluar sobre la cáscara del huevo, en el lugar de mayor irrigación del embrión.

Los huevos de cada nido, fueron distribuidos en partes iguales entre los siguientes grupos experimentales, para evitar un posible efecto nido.

Control negativo: huevos tratados con vehículo (50 µl de etanol absoluto). En experiencias previas demostramos que la topicación con etanol absoluto puede utilizarse como control negativo, ya que no existen diferencias entre éstos y los animales nacidos de huevos que no recibieron tratamiento (Stoker, 2004).

17-β estradiol (E<sub>2</sub>) 1,4 ppm (Control positivo): huevos tratados con 1,4 ppm de E<sub>2</sub> (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). En estudios previos observamos que, cuando se administra esta dosis de estradiol, nacen hembras de huevos incubados a 33°C (temperatura de obtención de machos), demostrando que esta dosis anula la influencia de la temperatura en la determinación del sexo (Crain y col, 1999; Stoker y col., 2003).

E<sub>2</sub> 0,014 ppm: huevos tratados con 0,014 ppm de 17-β estradiol (Sigma). Esta dosis es cien veces menor a la del control positivo, y previamente observamos que no anula la influencia de la temperatura en la determinación del sexo (Stoker y col., 2003; 2008) y que en la hembra altera la dinámica folicular (Stoker y col., 2008).

Endosulfán (END): huevos tratados con endosulfán 20 ppm (Icona S.A., Buenos Aires, ARG). Se eligió esta dosis porque la misma produjo modificaciones en la histoarquitectura gonadal y en el perfil hormonal de yacarés overos de 10 días (Stoker y col., 2008; Rey y col., 2009).

Atrazina (ATZ): huevos tratados con 0,20 ppm de atrazina (Icona). Esta dosis fue considerada ambientalmente relevante y se demostró que causa hermafroditismo y alteraciones en las gónadas de anfibios (Hayes y col., 2002; 2003). Además en yacarés overos juveniles expuestos *in ovo* a ATZ 0,20 ppm, observamos alteraciones en la histoarquitectura gonadal, exhibiendo túbulos seminíferos tortuosos con aumento del perímetro tubular, disminución del porcentaje de células mioides peritubulares y desequilibrio en el balance proliferación/apoptosis (Rey y col., 2009). En hembras neonatales expuestas *in ovo* a ATZ 0,20 ppm, demostramos que los niveles séricos de testosterona están disminuidos y que se modificó la dinámica folicular produciendo un incremento de folículos en estadios más diferenciados (Stoker y col., 2008).

Bisfenol A (BPA): La dosis aplicada, 1,4 ppm de BPA (Aldrich, Milwaukee, WI), corresponde a la concentración más baja que hemos utilizado en trabajos previos (Stoker y col., 2003). Establecimos que esta dosis no alcanza a anular la influencia de la temperatura en la determinación del sexo pero que, sin embargo,

es capaz de alterar la histoarquitectura gonadal en machos y hembras de 10 días de edad.

Concluida la topicación, se continuó con la incubación manteniendo el control estricto de temperatura y humedad hasta el nacimiento de los yacarés overos, controlando cada dos días el avance de la banda opaca, para evaluar la viabilidad embrionaria.

### **3.11- Eclosión asistida, cría en condiciones ambientales y sanitarias controladas y registro de variables alométricas.**

Los nacimientos espontáneos fueron poco frecuentes, ya que en la última semana de incubación la presencia de señales del embrión (movimiento y/o llamado de la cría) se evaluó dos veces por día. Cuando se detectó alguna de las señales mencionadas, se verificó la presencia de cámara de aire, se pesó el huevo y se asistió el nacimiento (eclosión asistida). En los casos en que se produjo el nacimiento espontáneo de una cría, se procedió a realizar el nacimiento asistido de los restantes huevos del mismo nido.

Luego de su nacimiento, los neonatos fueron identificados utilizando tres sistemas: a) con un collar conteniendo la numeración correspondiente al nido y huevo, b) mediante cortes con bisturí en los verticilos de la cola y c) mediante un anillo metálico numerado (Tag; National Band & Tag Co, USA), colocado en la membrana interdigital de una de las patas traseras. Luego de la identificación, los neonatos fueron pesados y medidos. Se registraron las siguientes variables alométricas: peso corporal, largo total (LT: desde la punta del hocico hasta la punta de la cola) y largo desde el hocico hasta la cloaca (SVL: *snout-vent-length*). Para detectar posibles acciones neurotóxicas del END y/o del resto de los compuestos topicados, se evaluaron la postura, locomoción, recuperación de la postura y reflejo ocular fotomotor (Kamijima y Casida, 2000).



**Figura 25:** Bioterio de cría de reptiles bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, renovación de aire, ciclo luz-oscuridad y administración de luz UV-B.

Los neonatos se criaron en un bioterio con condiciones controladas de temperatura, humedad, renovación de aire y ciclo luz-oscuridad (Figura 25). Las piletas de cría poseen áreas secas (donde se alimentan) y de inmersión (donde nadan), conservando la temperatura ambiente en  $28,2 \pm 0,6$  °C y la del agua en  $30 \pm 0,5$  °C. Estas temperaturas son generadas y reguladas por un sistema de radiador de agua, loza radiante y aire acondicionado. La renovación de aire es automatizada, extrayendo aire 15 minutos cada media hora y el ciclo luz-oscuridad es de 14/10 hs, respectivamente.



**Figura 26:** Medidas alométricas. Todos los meses se registra el peso (g), largo total (cm) y la longitud hocico cloaca, para confeccionar las curvas de crecimiento y desarrollo.

A partir de los 10 días de edad, los caimanes se alimentaron con una mezcla de carne bovina desgrasada y carcasa de pollo (proporción 70:30 respectivamente) con el agregado de un 1% de un complejo de minerales y vitaminas (Vionate-S, Novartis). El suministro semanal de alimento fue equivalente al 20% del peso de los animales durante el primer año de vida y luego del 15% hasta el sacrificio (Joanen & McNeasen, 1987). Para favorecer la síntesis de vitamina D necesaria para la absorción del calcio (Dixon y Mason, 2009), se suministró diariamente luz UV-B durante 30 minutos (lámpara Reptistar, Sylvania, Alemania). Los animales se pesaron y midieron mensualmente para evaluar su crecimiento y desarrollo (Figura 26).

### **3.12- Evaluación del crecimiento de los yacarés overos: ICC e IMC.**

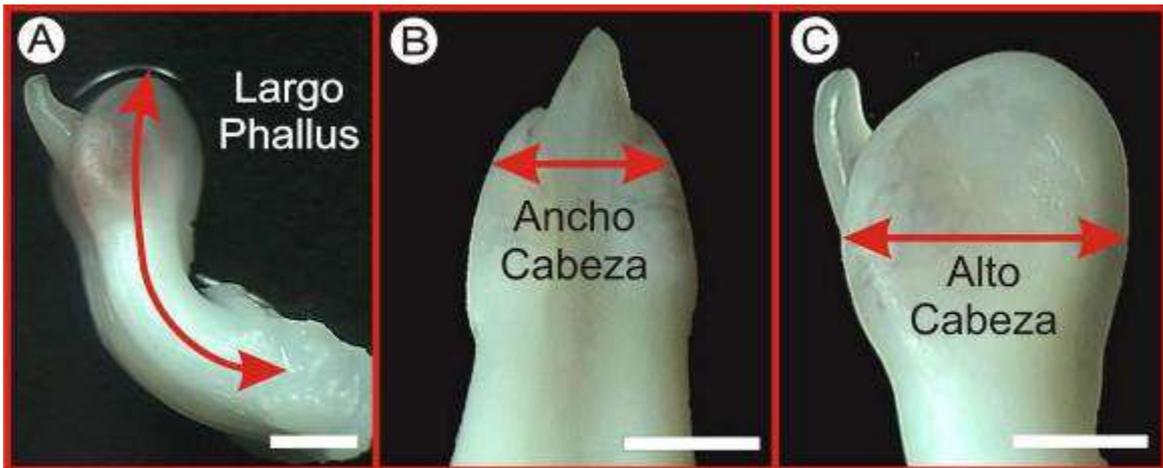
A los 6, 12, 18 y 24 meses de edad, utilizando los datos de las variables alométricas, determinamos índice de masa corporal (IMC) y el índice de condición corporal (ICC). El IMC y el ICC se utilizaron para establecer curvas de

crecimiento en condiciones controladas de cría para luego detectar alteraciones (aumentos o disminuciones) debidas a la exposición a PE. Si bien el IMC ha sido caracterizado fundamentalmente en humanos, también ha sido aplicado en otras especies tales como peces (Oka y col., 2010) y ratas (Jeyakumar y col., 2009). El IMC se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: peso del animal expresado en kilogramos / (largo total expresado en metros)<sup>2</sup>. El ICC es un indicador de las reservas de energía en cada animal, utilizado en varias especies para estimar si los individuos poseen una condición física óptima para la reproducción (Waye y Mason, 2008). El ICC de cada individuo se calculó como el resultado residual de la regresión lineal del logaritmo neperiano del peso (g) / logaritmo neperiano de la longitud hocico-cloaca (cm) (Waye y col., 2007).

### **3.13- Órganos y variables sexualmente dimórficas.**

#### **3.13.1- Morfometría de genitales externos.**

En animales de 12, 18 y 24 meses de edad se extrajo la estructura clítoris-pene (*phallus*), que fue fijada en formol buffer al 10% (pH 7.4) durante 24hs a temperatura ambiente, lavada en buffer de fosfatos (PBS; 2 veces durante 10 min c/u), y conservada en alcohol 70%, hasta su evaluación. Se obtuvieron imágenes digitalizadas del *phallus* disponiéndolo en forma plana respecto a la cámara (para evitar los errores por proyección) y se colocó un calibre en cada imagen como referencia para establecer la unidad de medida. El dispositivo para la obtención de imágenes digitalizadas fue el mismo que se utilizó para el grosor de la cáscara (Figura 20). Se obtuvo un mínimo de 3 imágenes por animal, en 0,67X y 2X con una cámara color Spot Insigth QE (Diagnostic Instruments, USA) acoplada a una lupa estereoscópica de disección Leica GZ6 (Leica Inc., Buffalo, NY). Mediante el uso del software Image-Pro-plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, USA) se obtuvieron las siguientes medidas: largo del *phallus*, alto y ancho de la cabeza del *phallus*, tal como se ilustra en la Figura 27.

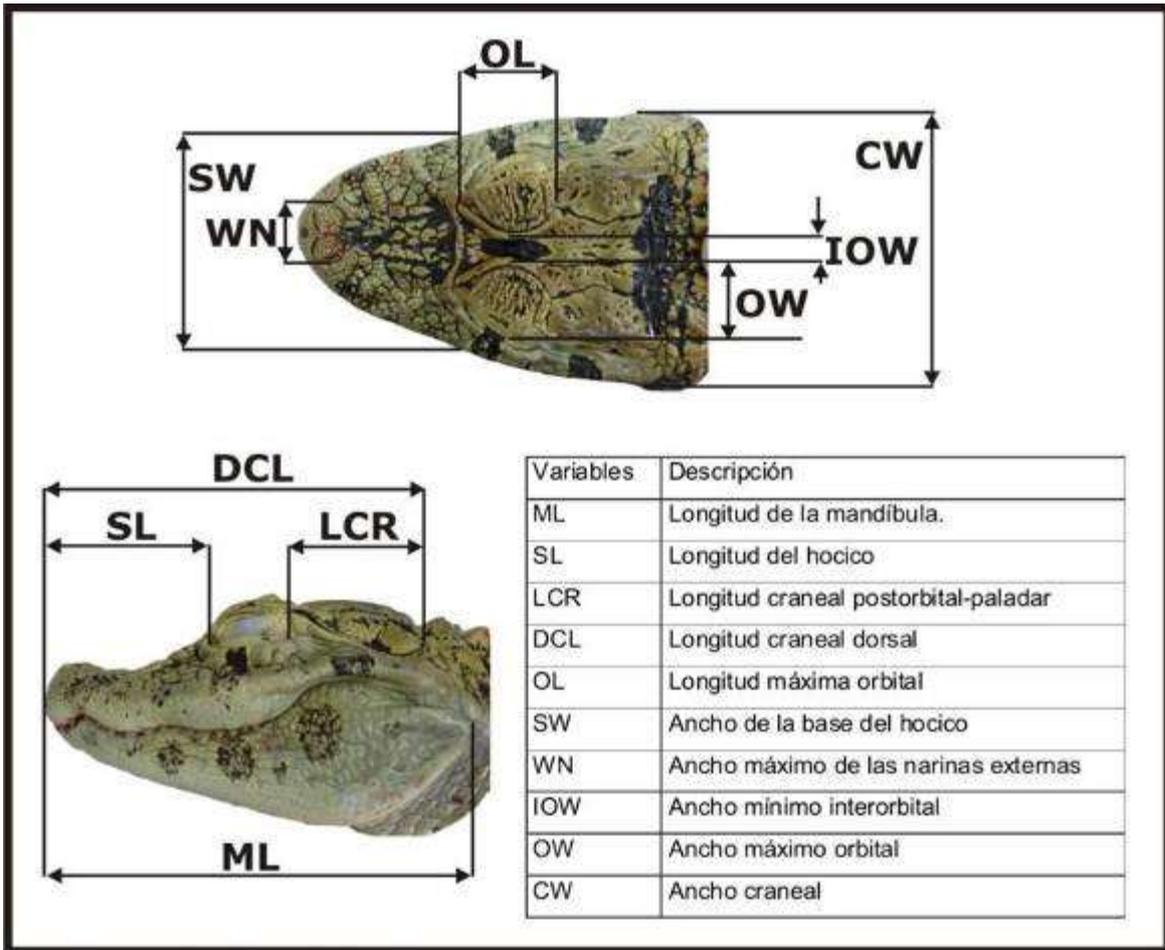


**Figura 27.** Imágenes digitalizadas del *phallus* de un yacaré overo juvenil macho. A), B) y C) descripción de los parámetros registrados. (Barra = 2 mm).

Estas medidas, luego fueron correlacionadas con el peso, LT y SVL del animal, para elegir normalizadores que eviten diferencias inherentes al crecimiento de los animales.

### 3.13.2- Medidas craneofaciales.

Basándonos en los parámetros craneofaciales propuestos por Verdade (2000), se registraron diez medidas craneofaciales en yacarés overos juveniles de 12 meses de edad, las cuales se muestran en la Figura 28. Las medidas registradas corresponden a diferentes longitudes y anchos del cráneo del yacaré overo tomadas en centímetros. Concretamente, las longitudes medidas son de mandíbula, hocico, craneal (postorbital-paladar y dorsal), orbital; mientras que los anchos registrados son de hocico, narinas, craneal (orbital e interorbital). Estas medidas, luego fueron correlacionadas por el peso corporal, LT y SVL del animal para seleccionar normalizadores para evitar diferencias inherentes al crecimiento de los animales. Para la obtención de las imágenes se utilizó una cámara digital SONY SW 50 (Sony Electronics Inc., Park-Ridge, NJ) montada sobre un trípode. La cámara se dispuso de forma perpendicular a la cabeza, para evitar errores de proyección. Para realizar la calibración de las imágenes se colocó, a la misma altura y en el mismo plano de proyección, una regla graduada. Las medidas de las distintas variables descritas fueron obtenidas utilizando el programa Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, USA).



**Figura 28:** Medidas craneofaciales. Vista dorsal y lateral de una cabeza de *C. latirostris* donde se muestran las variables registradas. En la tabla se describe el significado de cada una de ellas.

### 3.14- Perfil hematológico e inmunológico.

#### 3.14.1- Extracción de sangre periférica.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción supra vertebral del seno venoso occipital (Figura 29), con agujas 25G x 5/8" (0,5 x 16 mm) de calibre y jeringas de 5 ml. Con el fin de reducir al mínimo el tiempo de manipulación y el estrés, no se utilizaron anestésicos para la extracción de sangre. La extracción se realizó después de cumplirse 24 horas de ayuno. Los extendidos sanguíneos (frotis) se realizaron con sangre entera y se dejaron secar al aire, para luego realizar el recuento diferencial de leucocitos, y la caracterización morfológica y citoquímica. Para la evaluación de hemoglobina, hematocrito y recuento en cámara de Neubauer se utilizó sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 0,342 mol / l, pH 7,2; Wiener Lab,

Argentina). A los 12, 18 y 24 meses de edad se obtuvo suero a partir de 1 ml de sangre entera. Las muestras de suero fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior evaluación de la actividad inmune innata y la determinación de parámetros de química sanguínea.

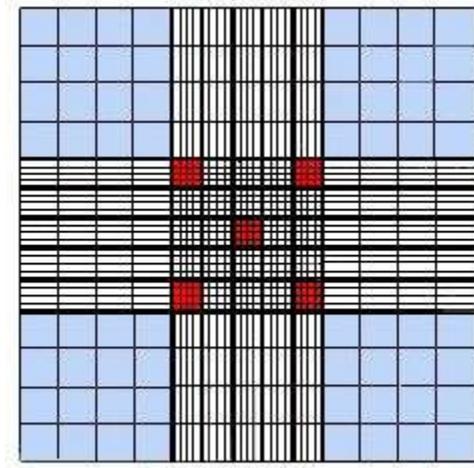


**Figura 29:** Método de obtención de sangre entera periférica en *C. latirostris*. Utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja de 25G x 5/8 "(0,5 x 16 mm), se extrae sangre periférica del seno occipital.

### 3.14.2- Recuento de células sanguíneas.

Para establecer el número de glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB) y de trombocitos se cargó la cámara de Neubauer con una dilución 1:100 de sangre anticoagulada con EDTA en una solución de Natt-Herrick modificada (ver más adelante, 3.10.2.1). El método utilizado para el recuento de GR y GB es el utilizado en exámenes de rutina en humanos (Iovine y Selva, 1985; McPherson y Pincus, 2007). Para los GB y trombocitos se usaron los 4 cuadrantes externos de la cámara, donde cada uno está dividido en 16 cuadrados más pequeños (Figura 30, recuadros en celeste). Para contar GR se utiliza el cuadrante central, que se encuentra dividido en 25 cuadrados más pequeños, de los cuales se cuentan los GR ubicados en los 4 cuadrantes externos y el central (Figura 30, recuadros en rojo). Los recuentos se hicieron por duplicado. Las fórmulas aplicadas consideran

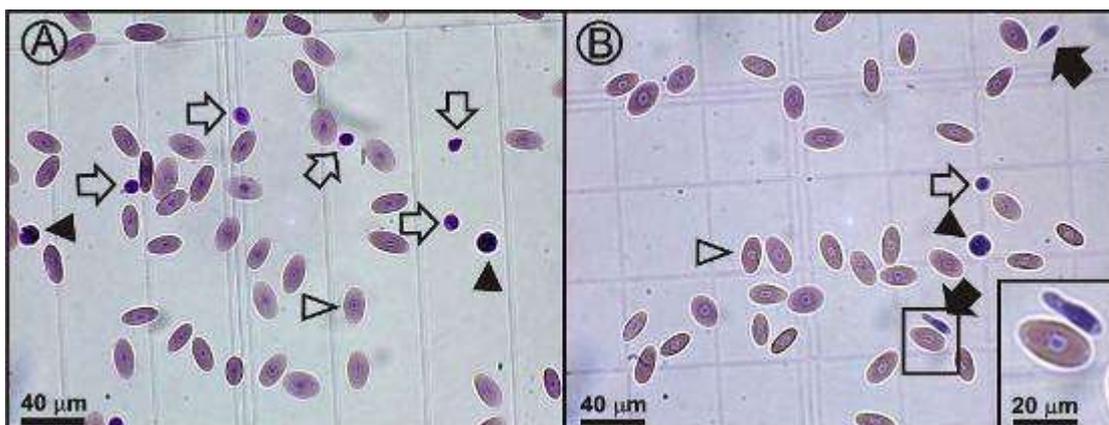
el número promedio de células contadas, el factor de dilución y el volumen de la cámara (área contada x profundidad).



**Figura 30.** Representación esquemática de las cuadrículas dentro de la cámara de Neubauer.

#### **3.14.2.1 Modificación del diluyente de Natt-Herrick.**

En las primeras determinaciones observamos que la composición original de la solución de Natt-Herrick no nos permitía distinguir claramente linfocitos de trombocitos, dado que presentaban similar morfología y tinción. Ensayamos entonces varias modificaciones a la composición original de la solución de Natt-Herrick, para poder hacer el recuento de trombocitos en cámara de Neubauer. El agregado de 1 ml de bicarbonato de sodio (0,1% p / v,  $\text{NaHCO}_3$ ) a 3 ml de solución de tinción Natt-Herrick (sulfato de sodio 2,50 g, cloruro de sodio 3,88 g; fosfato de sodio monobásico 2,91 g; fosfato de potasio dibásico 0,25 g; formol 37% 7,50 ml; Violeta de metilo 2B 0,10 g) nos permitió conservar las diferencias, observadas en los frotis, entre los linfocitos y trombocitos, permitiendo un recuento diferencial confiable de células (Figura 31). Todos los reactivos se prepararon con químicos de calidad pro-análisis (Merck, Argentina).



**Figura 31:** Fotomicrografía de la cámara de Neubauer. A) la tinción con la solución original de Natt-Herrick cambia significativamente la forma de los trombocitos, de ovoide a esférico, tornándose similares a los linfocitos. B) una solución de Natt-Herrick modificada permitió mantener las diferencias morfológicas entre los linfocitos y trombocitos, facilitando el recuento confiable de células. Recuadro: imagen a mayor aumento de un eritrocito y trombocito. Trombocitos, células con núcleo oval, elíptico con citoplasma en los extremos en forma de bandera. Punta de flecha hueca: eritrocitos, punta de flecha rellena: granulocitos, flecha hueca: linfocitos, flecha rellena: trombocitos.

### 3.14.3- Hematocrito.

El hematocrito (Hct) es el porcentaje de masa globular en una muestra de sangre entera. Para su determinación, tubos capilares de microhematocrito se llenaron por capilaridad con sangre entera utilizando EDTA como anticoagulante, los extremos se sellaron con plastilina y se centrifugaron durante 5 min a 10.000 rpm (Cavour VT-1224, Cavour, Argentina). El porcentaje de masa globular fue determinado en un ábaco con escala para lectura de microhematocrito. El procedimiento fue realizado por duplicado para cada muestra de sangre.

### 3.14.4- Hemoglobina e índices hematimétricos.

La concentración de hemoglobina (Hb) se determinó por el método de cianometahemoglobina modificado (Campbell, 2004), utilizando un kit comercial (HemogloWiener, Wiener Lab, Argentina.). Se mezclan 5 ml del reactivo de lisis (provisto por el kit) y 20  $\mu$ l de la muestra (sangre conservada en EDTA) en tubos de ensayo de vidrio, y se deja reaccionar por 5 min a temperatura ambiente. Como los eritrocitos de *C. latirostris* son nucleados, una vez completada la lisis se

centrifuga la muestra durante 5 min a 2500 rpm y se extrae el sobrenadante. Finalmente, se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA) a una longitud de onda de 540nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado, y en cada ensayo se calculó el factor. Se realizó curva de calibrado con el estándar provisto por el kit (Solución de hemoglobina de 15,6 g/dl).

Aplicando las fórmulas descriptas por Henry (1993), se calcularon los índices hematimétricos: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración media de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

$VCM = \text{Hematocrito} \times 1000 / \text{Eritrocitos (en millones por } \mu\text{l)}$

$HCM = \text{Hemoglobina (g/l)} / \text{Eritrocitos (en millones por } \mu\text{l)}$

$CHCM = \text{Hemoglobina (g/l)} / \text{Hematocrito}$

### **3.14.5- Componentes celulares sanguíneos y recuentos.**

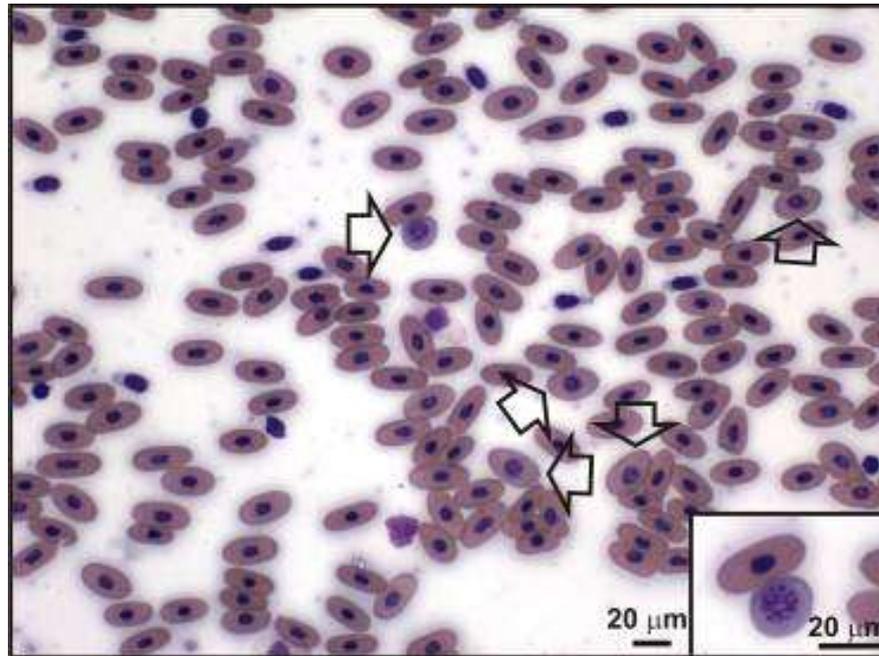
En el frotis de un yacaré overo normal se pueden distinguir tres grupos celulares: leucocitos (glóbulos blancos), eritrocitos (glóbulos rojos) y trombocitos.

El recuento diferencial de leucocitos se realizó en frotis de sangre periférica teñidos con May-Grumwald Giemsa (Biopur, Argentina), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para la tinción. Se realizó el recuento en dos frotis por animal, evaluando un total de 250 leucocitos por frotis. Los leucocitos se clasificaron dentro de las siguientes categorías: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, siguiendo la clasificación propuesta por Mateo y col., (1984).

Los glóbulos rojos y los trombocitos en *C. latirostris* son células nucleadas. Los trombocitos pueden presentarse aislados o en grupos (clusters).

Los eritrocitos inmaduros son células de forma redonda o irregular, con núcleo grande, redondo y citoplasma policromático o basófilo. Se evaluó el grado

de policromasia de los GR en frotis de sangre periférica teñidos con May-Grumwald Giemsa (Figura 32), estableciéndose el porcentaje de células inmaduras sobre un total de 1000 eritrocitos. El grado de policromasia en los GR es un buen indicador de la respuesta regenerativa en casos de anemia.



**Figura 32.** Policromasia. Las flechas indican diferentes grados de policromasia en los eritrocitos de *C. latirostris*. Los eritrocitos inmaduros se presentaron como células de forma redonda o irregular, con núcleo grande, redondo y citoplasma policromático o basófilo. En el inserto se puede observar a mayor aumento un eritrocito inmaduro.

#### 3.14.6- Tinciones Citoquímicas.

La composición química de las células sanguíneas fue estudiada mediante reacciones de citoquímica clásica, evaluándose la presencia y distribución celular de las enzimas y componentes celulares que se enumeran en la Tabla 7.

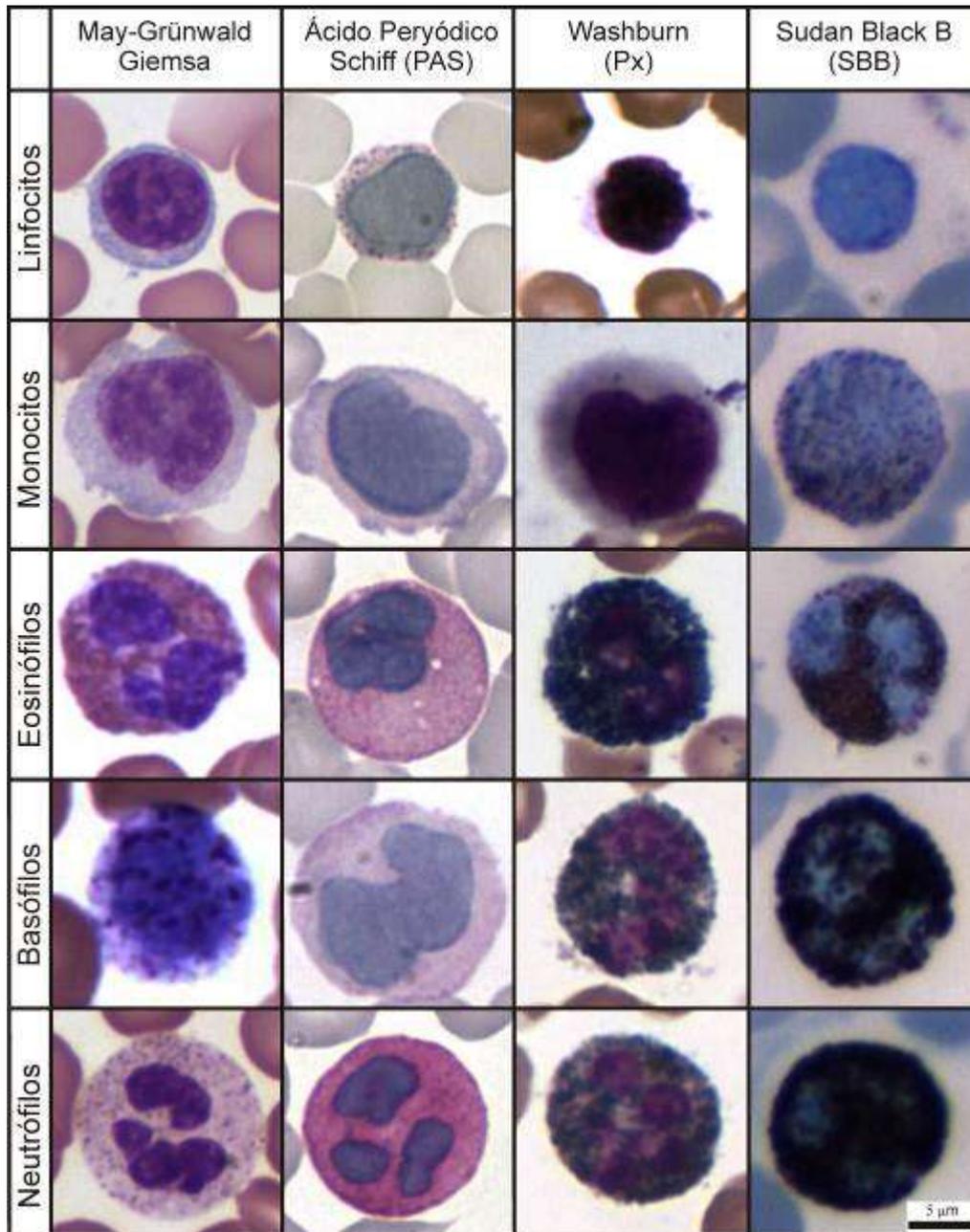
**Tabla 7.** Sustancias evaluadas mediante ensayos de citoquímica clásica.

Sustancia Evaluada	Método de Determinación	Fundamento del Método*
Peroxidasa	Washburn	Este método nos permite detectar la presencia de la enzima peroxidasa que actúa oxidando a la bencidina en presencia de agua oxigenada, tomando un color pardo. Emplea como catalizador metálico el nitroprusiato de Sodio.
Polisacáridos	PAS	La reacción se basa en la rotura de los enlaces -C-C- presentes en los carbohidratos por la acción del ácido peryódico, potente agente oxidante, liberándose grupos aldehído que al combinarse con el reactivo de Schiff dan un compuesto de color rojo púrpura intenso.
Mucopolisacáridos	PAS	
Glicoproteínas	PAS	
Glicolípidos	PAS	
Lípidos	Sudán Black B	Es un colorante liposoluble que se combina con los grupos ácidos de los compuestos. Tiñe los lípidos, esteroides, fosfolípidos y grasas neutras.

\*Tomado de Junqueira y Junqueira 1983.

PAS: Ácido Peryódico de Schiff

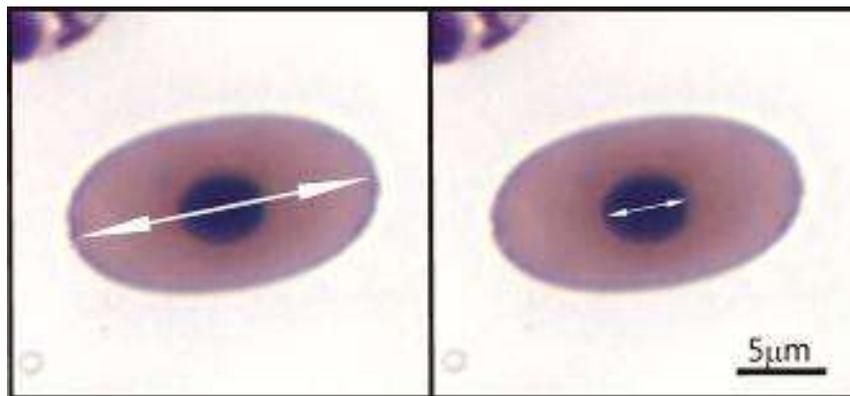
Para la preparación de los reactivos se utilizaron drogas de calidad pro-análisis (Merck, Argentina), excepto para la determinación de PAS donde se utilizó un kit (Biopur, Argentina) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para cada ensayo se caracterizaron la presencia y el patrón de tinción en los componentes celulares de sangre periférica de yacaré overo. Como controles positivos, se utilizaron muestras de sangre humana cuyo patrón de tinción ya ha sido definido previamente en la literatura (Grignaschi, 1991; Figura 33).



**Figura 33:** Patrones de tinción de las células que componen la sangre humana. Los componentes de la sangre humana se utilizaron como controles positivos para las diferentes tinciones citoquímicas ensayadas. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa. Los carbohidratos se tiñeron con PAS, siendo intensamente positivos los eosinófilos y neutrófilos, débilmente positivos los linfocitos y basófilos, mientras que los monocitos fueron negativos para la presencia de carbohidratos. El patrón de tinción fue similar entre la determinación de peroxidasa (método de Washburn) y lípidos (tinción con Sudán Black B), evidenciándose una fuerte marcación en los eosinófilos, basófilos y neutrófilos, mientras que los monocitos fueron levemente positivos y la ausencia de peroxidasa y lípidos se registró en los linfocitos.

### 3.14.7- Morfometría de las células sanguíneas.

El análisis morfométrico de células sanguíneas periféricas se realizó en imágenes digitalizadas de extendidos de sangre periférica teñidos con May-Grumwald Giemsa. Para obtener las imágenes se utilizó un microscopio Olympus BH2 con una objetiva Dplan x 100 (apertura numérica = 1,25) y una cámara Spot Insight QE (Diagnostic Instruments, USA). Con el programa informático Image Pro Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, USA) se determinó el área, el perímetro y el diámetro máximo del citoplasma y del núcleo para cada tipo de célula sanguínea, siguiendo metodologías descritas previamente en trabajos de nuestro grupo (Ramos y col., 2002; Rodríguez y col., 2003). A modo de ejemplo, en la Figura 34 se muestra el uso del programa Image Pro Plus para medir los diámetros celular y nuclear de un eritrocito.



**Figura 34:** Imágenes digitalizadas de eritrocitos de *C. latirostris*. Las flechas indican las dimensiones cuantificadas (diámetro celular y nuclear). La misma metodología fue aplicada a todos los componentes presentes en la sangre.

### 3.14.8- Evaluación de inmunidad humoral innata.

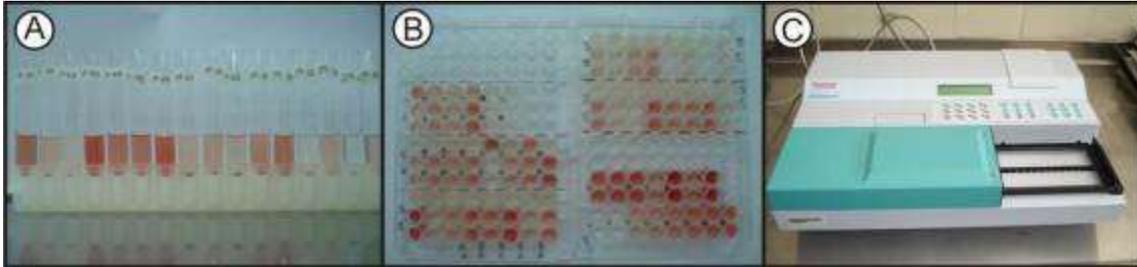
#### 3.14.8.1- Optimización del método.

La inmunidad humoral innata fue evaluada mediante el método recientemente descrito por Merchant y col (2006b), basado en la lisis de eritrocitos de oveja no sensibilizados (SRBCs) mediada por complemento. En primer lugar se llevó a cabo la optimización del ensayo, para determinar la concentración de suero a utilizar, la temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) y el tiempo de incubación ( $\text{Tpo}_{\text{inc.}}$ ) óptimos. Realizamos ensayos en los que se emplearon las condiciones

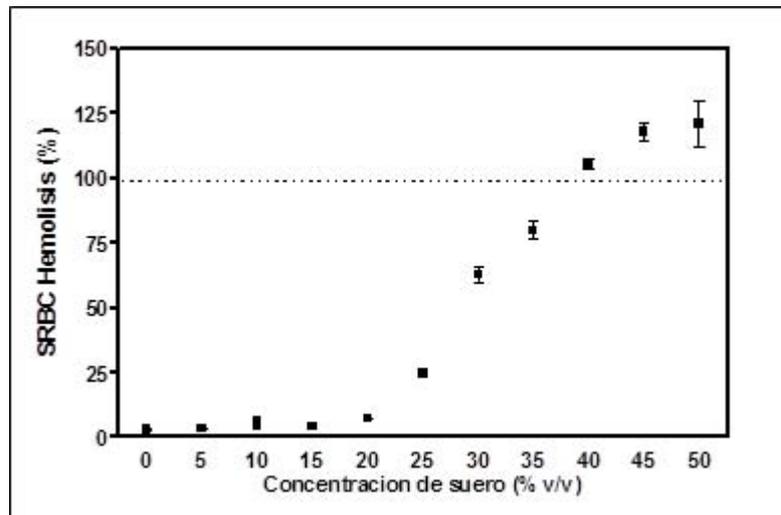
de  $T_{po_{inc}}$  y  $T^{\circ}C$  referidas por Merchant y col (2006a), evaluando la capacidad de hemólisis de un rango amplio de concentraciones de suero (de 0 a 50% v/v), con un  $T_{po_{inc}}$  de 20 min y una  $T^{\circ}C$  de  $25^{\circ}C$  (Figura 36). En base a este ensayo, seleccionamos las concentraciones de suero de 35, 40 y 45% para el análisis cinético de la hemólisis: se prepararon tubos con 2 ml de una solución de CINA 0,9% p/v y de suero de yacaré overo al 35%, 40% y 45%; a cada tubo se le adicionaron 2ml de SRBCs (Hemo-G, Argentina) al 2% en solución fisiológica. Se extrajeron 500  $\mu$ l del sobrenadante en diferentes tiempos (0, 5, 10, 15 y 20 minutos), y se centrifugaron a 3525 rpm para sedimentar los materiales de membrana insolubles y las células lisadas. Se sembraron 200  $\mu$ l del sobrenadante resultante en una placa de 96 pocillos de microtitulación y se midió la absorbancia a 540 nm. Para evaluar los efectos de la temperatura sobre la hemólisis de SRBCs, se expuso durante 20 minutos suero de caimanes al 40%v/v en solución fisiológica a diferentes temperaturas ( $25^{\circ}$ ,  $30^{\circ}$  y  $37^{\circ}C$ ). Las muestras se centrifugaron a 3525 rpm y se determinó la absorbancia en el sobrenadante. Luego de establecer los valores óptimos para  $T^{\circ}C$  y  $T_{po_{inc}}$  ( $37^{\circ}C$  y 20 minutos respectivamente), se procedió a realizar una curva de calibrado. Diferentes concentraciones de un *pool* de suero de animales controles (volumen total de 1 ml) fueron expuestas a 1 ml de 2% de SRBCs a  $37^{\circ}C$ . Las muestras fueron incubadas durante 20 minutos y luego se centrifugaron a 3525 rpm (2000 G) durante 2 min. El sobrenadante (Figura 35A) se transfirió a una placa de microtitulación (ELISA) de 96 pocillos (Figura 35B), y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Thermo Ex Multieskan, UE. Figura 35C). De esta forma se estableció la concentración de suero a la cual se llega al 100% de hemólisis.

En cada ensayo de hemólisis se incluyeron controles positivos de hemólisis. Este control de máxima hemólisis se obtuvo mediante la mezcla por medio de dos jeringas interconectadas, con 1 ml de la solución de SRBCs 2% y 1ml al 1% v/v del detergente Tritón X-100 (Sigma, EE.UU.). También se realizó un control de máxima hemólisis con SRBCs al 1%, el cual nos permitirá establecer el 100% de hemólisis en la curva de calibrado. Las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis con respecto al control máximo de hemólisis al 1% de SRBCs. Los

parámetros óptimos para la evaluación de los sueros de los diferentes grupos experimentales fueron 40% de concentración de suero de yacaré overo, incubados durante 20 min a 37°C.



**Figura 35.** Ensayo de inmunidad humoral. A) Tubos de ensayo donde se realizó la hemólisis, se observan diferentes coloraciones en el sobrenadante producto de la lisis del suero del yacaré overo. B) Placa de ELISA sembrada con el sobrenadante del ensayo. C) Lector de placas de ELISA.



**Figura 36:** Diferentes concentraciones de suero de yacaré overo (1ml de volumen total) fueron expuestas a SRBCs durante 20 min a 25°C. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 xg por 1 min, y se determinaron las absorbancias a 540 nm usando un lector de microplacas.

### 3.14.9- Química de la sangre.

Los niveles séricos de glucosa, urea, colesterol, ácido úrico, triglicéridos, creatinina, bilirrubina total, proteínas totales, albúmina y las globulinas y la actividad sérica de las enzimas fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH) y creatina quinasa (CK) fueron medidos usando un analizador automatizado Vitalab Selectra E Mod. 6002-160 (Vital Scientific, UE). Este auto-analizador espectrofotométrico es multiparamétrico y bidireccional, posibilitando la realización de todas las prácticas de bioquímica clínica seleccionadas para ser evaluadas en *Caiman latirostris*. En la Tabla 8 se enumeran los métodos utilizados y se detallan sus fundamentos.

**Tabla 8.** Sustancias evaluadas y metodologías utilizadas para las determinaciones de bioquímica clínica en suero de *Caiman latirostris*.

Sustancia Evaluada	Método de Determinación	Fundamento del Método*
Glucosa	Enzimático (GOD/POD) colorimétrico	La glucosa es transformada por la glucosa oxidasa (GOD), en presencia de oxígeno y agua, en ácido glucónico y agua oxigenada; ésta última genera una quinona coloreada en presencia de peroxidasa (POD)
Urea	Cinético Ultra Violeta	La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco y anhídrido carbónico. El amoníaco formado se incorporan al D-cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa con oxidación paralela de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH a NAD+). La disminución de la concentración de NAD+ en el medio es proporcional a la concentración de urea de

		la muestra ensayada.
Colesterol	CHOD-PAP	El Colesterol es oxidado enzimáticamente por colesterol oxidasa (CHOD), previa hidrólisis enzimática de los ésteres mediante una lipasa. El peróxido de hidrógeno generado en la oxidación permite la unión oxidativa del fenol con la 4-aminoantipirina mediante una reacción catalizada por la peroxidasa (PAP). El indicador final es la quinoneimina.
Ácido úrico	Enzimático colorimétrico	El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno que en presencia de peroxidasa y 4 aminofenazona y 2,4,diclorofenol sulfonato forma un compuesto rosáceo.
Triglicéridos	GPO-PAP	Los triglicéridos se determinan a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas y la oxidación con la glicerolfosfato oxidasa (GPO). El indicador es una quinoneimina formada por hidrógeno-peróxido, 4-aminofenazono y 4-clorofenol, bajo la influencia catalítica de peroxidasa (PAP).
Creatinina	Cinético Jaffe	La creatinina reacciona con el picrato alcalino (reacción de Jaffe) produciendo un cromógeno rojo. La velocidad de esta reacción, bajo condiciones controladas, es una medida de la concentración de creatinina de la muestra puesto que se comporta como una reacción cinética de primer orden para la creatinina.
Bilirrubina total	Colorimétrico DMSO	La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente.

		De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, solo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta) el resultado correspondiendo a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente.
Proteínas totales	Colorimétrico Biuret	Los enlaces peptídicos de la proteína reaccionan con los iones de cobre II en solución alcalina para formar un complejo azul-violeta (la llamada reacción del Biuret), Se añade tartrato como estabilizante, mientras que se utiliza yoduro a fin de prevenir la autoreducción del complejo de cobre alcalino. El color formado es proporcional a la concentración de proteínas
Albúmina	Colorimétrico BCG	A pH ácido, la albúmina se fija al verde bromocresol (BCG) produciendo un aumento en la absorbancia. El incremento en la absorbancia a 630nm debido a la formación del complejo albúmina-BCG es directamente proporcional a la concentración de albúmina de la muestra.
Globulinas	Colorimétrico	Se obtiene por diferencia entre Proteínas totales y Albúmina
Fosfatasa alcalina	Cinético	La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de

		formación del p-nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada.
Alanina aminotransferasa (ALT)	Enzimático Colorimétrico	La ALT cataliza la conversión de L-alanina y D-cetoglutarato a piruvato y L-glutamato. La lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación del cofactor reducido a cofactor. El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm debido a la oxidación del cofactor reducido es directamente proporcional a la actividad de la ALT.
Aspartato aminotransferasa (AST)	Enzimático Colorimétrico	La reacción es catalizada por la TGO (AST), ésta desplaza la reacción hacia la formación de Oxaloacetato que reacciona con la malato deshidrogenasa, de modo que la velocidad de oxidación del NADH medida a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de TGO en la muestra.
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Cinético Ultra violeta	La lactato-deshidrogenasa cataliza la conversión de L-lactato a piruvato. nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) se reduce a NADH. La velocidad de la formación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la LDH y se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm.
Creatina quinasa (CK)	Cinético enzimático	En la reacción, la CK cataliza la transferencia de un grupo fosfato del sustrato fosfato de creatina al difosfato de adenosina. La subsiguiente formación de

		<p>trifosfato de adenosina se mide mediante el uso de dos reacciones asociadas, catalizadas por la hexocinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que produce dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH) a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD).</p>
--	--	---

\* Los fundamentos de los métodos están avalados por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), Asociación Norteamericana de Química Clínica (AFCC) y la Sociedad Alemana de Química Clínica (DGKC).

### 3.15-Análisis estadístico.

Todos los valores referidos a los nidos se expresaron como media  $\pm$  SEM. Para determinar las diferencias estadísticas entre los nidos, las concentraciones de COCs, contenido de lípidos, grosor y porosidad de la cáscara, se usó una prueba t-test (Student), y en el caso de no cumplir con los supuestos de normalidad se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney.

Los valores de COCs se transformaron en logaritmos neperianos para que adquieran una distribución normal. Las concentraciones de COCs por debajo del límite de detección (LD) fueron reemplazados por el valor que representa la mitad de la detección límite para ese compuesto, mientras que los valores por debajo de la cuantificación límite (LC) fueron consideradas como la mitad de la cuantificación límite del ensayo.

Se evaluó la distribución normal de los datos mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En base al test de normalidad, se analizaron las distribuciones de los datos para poder establecer el tipo de prueba a aplicar (paramétrica o no) y evaluar las posibles diferencias entre los datos. Las correlaciones se realizaron utilizando el test de Pearson cuando los valores se distribuyeron de forma paramétrica o el test de Spearman cuando se distribuyan de forma no paramétrica (Siegel, 1956).

El test de Mann-Whitney se utilizó para evaluar las diferencias entre los sexos o entre cada uno de los contaminantes seleccionados y el grupo control.

Se realizó un análisis de distribución de frecuencia de los datos referidos a los parámetros de crecimiento y al perfil hematológico, detectándose la existencia de dos subpoblaciones, divididas en rangos de pesos: 125-900 y 901-3100 g. Cuando se fijaron valores de referencia, se hizo en base a los intervalos de confianza (IC) del 95% con respecto a la media, siguiendo la metodología descrita previamente (Oliveira-Junior y col., 2009). Cuando se analizaron datos apareados, se utilizó el test de Wilcoxon. Para el análisis de proporciones se utilizó el test de probabilidad exacta de Fisher.

En todos los casos un  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

# RESULTADOS

## Exposición Natural

### 4.1- Variables ecológicas de nidos de *Caiman latirostris* en hábitats naturales.

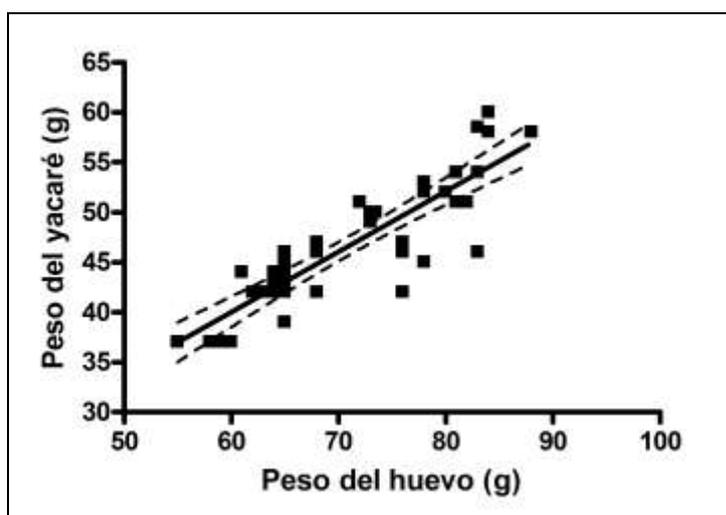
Como se explicó detalladamente en Materiales y Métodos (sección 3.2), los huevos fueron recolectados de zonas con distinto grado de intervención antrópica, de acuerdo a las características del entorno de los lugares donde se hallaron los nidos. En la Tabla 9 se detallan los parámetros ecológicos de los nidos usados en este estudio.

**Tabla 9.** Características de los nidos y grado de intervención antrópica en las diferentes provincias donde se realizan las cosechas.

Nido	Ubicación geográfica	Número de huevos <sup>1</sup>	Lugar de nidificación	Grado de intervención antrópica
SF1	Santa Fe S30°15' W60°50'	39	Bosque	Baja
SF2	Santa Fe S30°11' W61°00'	35	Monte	Baja
ER1	Entre Ríos S30°26' W59°01'	30	Sobre vegetación flotante	Moderada
ER2	Entre Ríos S30°26' W59°01'	34	Sobre vegetación flotante	Moderada
ER3	Entre Ríos S30°36' W58°46'	33	Cercano a un estanque	Moderada
ER4	Entre Ríos S30°34' W58°54'	28	A menos de 100 metros de un sembradío	Alta
ER5	Entre Ríos S30°33' W59°00'	18	Cercano a un sembradío	Alta
CH1	Chaco S26°51' W58°56'	37	Sobre vegetación flotante	Moderada-Baja
CH2	Chaco S26°51' W58°55'	33	Sobre vegetación flotante	Moderada-Baja
CH3	Chaco S26°51' W59°02'	39	Sobre vegetación flotante (próximo a camino rural)	Moderada
CH4	Chaco S26°48' W59°03'	36	Monte	Moderada
CH5	Chaco S26°57' W 8°58'	31	Vegetación flotante en embalse	Moderada
CH6	Chaco S27°04' W58°57'	30	Monte	Moderada
CH7	Chaco S26°47' W59°15'	40	Vegetación flotante en embalse	Baja

<sup>1</sup> Establecido en la cosecha a campo.

A partir de los datos recogidos al momento de la incubación y en la eclosión de los huevos, se pudo establecer que existe una correlación positiva (test Pearson  $r=0,87$ ;  $p<0,0001$ ) entre el peso del huevo y el peso del yacaré overo al momento de la eclosión (Figura 37). Por lo tanto, los yacaré overos más pesados al momento de la eclosión, provenían de los huevos con mayor peso al inicio de la incubación.



**Figura 37.** Correlación entre el peso del huevo y el peso del yacaré overo al momento de la eclosión (test Pearson  $r = 0,87$ ;  $p<0,0001$ ). Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.

#### **4.2- Detección de residuos de compuestos Organoclorados (COCs) en huevos.**

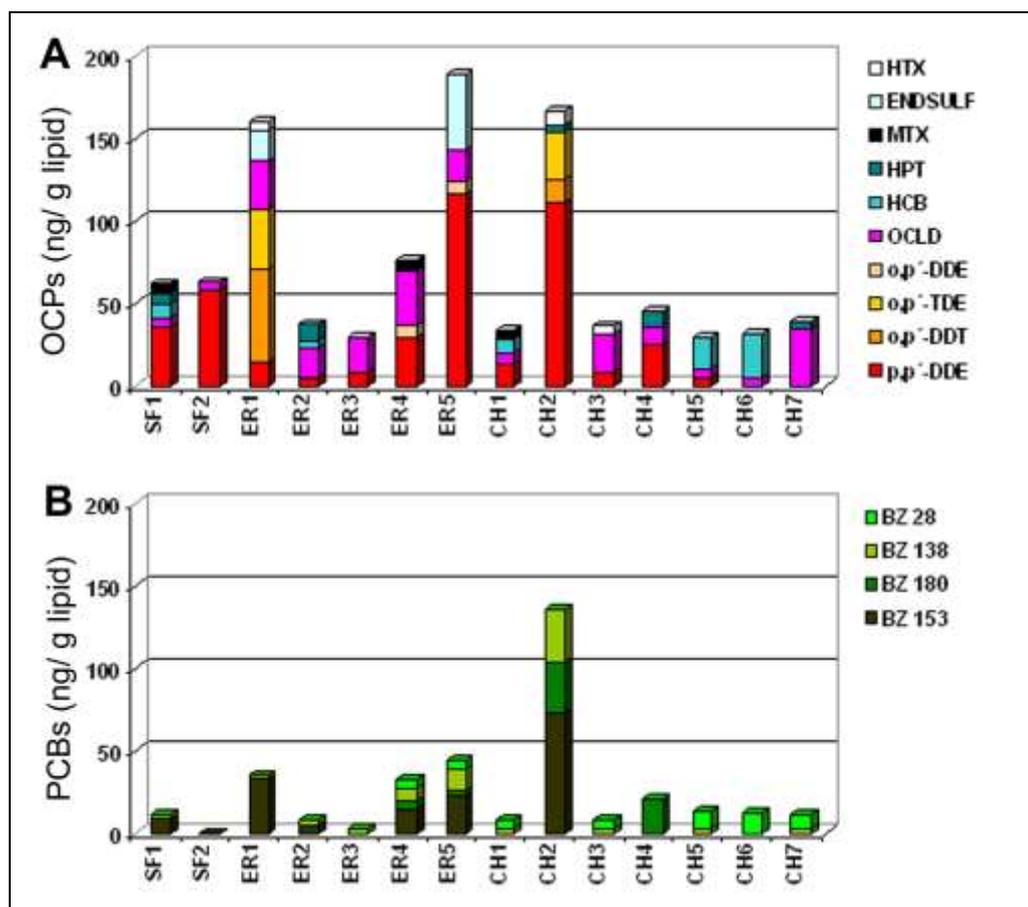
Tal como se explicó en Materiales y Métodos, se evaluó la concentración de distintos COCs en los huevos provenientes de los diferentes lugares de recolección. Todas las muestras analizadas presentaron niveles detectables de COCs, aún los huevos que fueron recogidos en reservas naturales (CH) o aguas arriba de zonas urbanizadas o dedicadas a la agricultura (SF), indicando que todos los sitios de cosecha de huevos presentaron algún grado de contaminación. Los resultados se expresaron en diferentes formas (media, mediana y media geométrica) para facilitar la comparación con los datos de la literatura (Tabla 10)

**Tabla 10.** Concentración de compuestos organoclorados (COCs) en huevos de *C. latirostris* provenientes de zonas con diferente grado de intervención antrópica.

Lugar de nidificación		$\Sigma$ OCPs ng/g de lípido	$\Sigma$ PCBs ng/ g de lípido
<b>SANTA FE</b>	Media $\pm$ SEM (rango)	78,9 $\pm$ 8,1 (29-119)	12,6 $\pm$ 3,6 (LD-32)
	Mediana (25-75%)	73 (65,5-95)	8,5 (7-18)
	Media geométrica (95% de IC)	76,7 (60,6-97,1)	10,5 (6,1-18,2)
<b>ENTRE RÍOS</b>	Media $\pm$ SEM (rango)	107,8 $\pm$ 17,6	37,3 $\pm$ 14,4
	Mediana (25-75%)	(LD-264)	(LD-294)
	Media geométrica (95% de IC)	78 (50-166)	12,75 (7-44)
<b>CHACO</b>	Media $\pm$ SEM (rango)	84,2 (60,0-118,2)	18 (11,3-30,9)
	Mediana (25-75%)	84,2 $\pm$ 15,8	43,5 $\pm$ 13,2
	Media geométrica (95% de IC)	(LD-324)	(LD-203)

OCPs: pesticidas organoclorados, PCBs: bifenilos policlorados, LD: debajo del límite de cuantificación. IC: intervalo de confianza.

Además de que se detectaron residuos de COCs en todos los nidos, en la mayoría de los mismos se observó una gran heterogeneidad de dichos residuos (Figura 38). Se detectaron en mayor porcentaje: p, p'-DDE (78%), OCLD (58,7%); o, p'-TDE (15,2%); o, p'-DDE (13,0%); HPT, HTX y o, p'-DDT (10,9% cada uno); y MTX, HCB y ENDSULF en el 6,5% de las muestras. Los niveles de los isómeros del HCH, ALD, CLD, DLD, ENDR, MRX, p, p'-TDE, p, p'-DDT y los isómeros del END, se encontraron por debajo de los límites de cuantificación en todas las muestras. Los PCB se encontraron presentes en un 73,9% de las muestras. De los 14 congéneres de PCB analizados, sólo BZ 138 (60,9%), BZ 153 (41,3%), BZ 28 (23,9%) y 180 (15,2%) fueron cuantificados. En base a los resultados obtenidos, podemos observar que las familias del DDT y Clordano son los compuestos que representan un mayor aporte a la sumatoria de pesticidas.



**Figura 38.** Porcentaje de los pesticidas organoclorados (OCPs) y los bifenilos policlorados (PCBs) que se detectaron en las muestras de huevos de *C. latirostris* provenientes de los diferentes lugares de recolección. En A) se grafican los porcentajes de OCPs y en B) los congéneres de PCBs. Abreviaturas: SF: Santa Fe; ER: Entre Ríos; CH: Chaco; HTX: heptacloro epóxido; ENDSULF: endosulfán sulfato; MTX: metoxicloro; HPT: heptacloro; HCB: hexaclorobenceno; OCLD: oxiclordano; o,p'-DDE: diclorodifenildicloroetileno; o,p'-TDE: tetraclorodifeniletano; o,p'-DDT: diclorodifeniltricloroetano; p,p'-DDE: diclorodifenildicloroetileno

#### 4.3- Características de la cáscara.

Como mencionamos en Materiales y Métodos, la cáscara del huevo es un reservorio de calcio para el embrión, por esta razón sus características cambian a medida que el desarrollo del embrión avanza y en consecuencia el momento de recolección de las muestras es crítico y podría ser un factor de confusión a tener en cuenta en el análisis de los resultados. Todas las muestras de cáscaras fueron recolectadas en estadios tempranos del desarrollo embrionario (rango: estadios 12-23), comprobándose que el grosor y la porosidad no son afectados por el

avance del desarrollo del embrión en el rango de estadios embrionarios utilizados (Figura 39A y B). En la tabla 11 se detallan los parámetros de los nidos usados en este estudio.

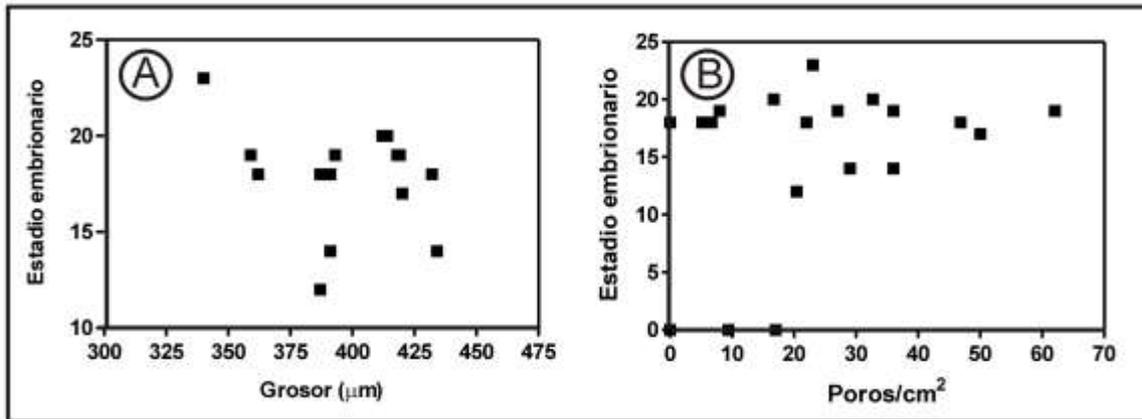
**Tabla 11.** Características de los nidos. Identificación, tamaño de la nidada, peso, dimensiones de los huevos y peso del yacaré overo al nacer provenientes de las diferentes provincias donde se realizan las cosechas.

Nido	Ubicación geográfica	Número de huevos <sup>1</sup>	Peso <sup>2</sup>	Eje mayor <sup>2</sup>	Eje menor <sup>2</sup>	Peso al nacer
			Media ± SEM <sup>3</sup>			
SF1	Santa Fe S30°15' W60°50'	39	75,1 ± 2,4	69,3 ± 2,0	42,2 ± 1,7	50,0 ± 0,3
SF2	Santa Fe S30°11' W61°00'	35	60,2 ± 1,5	64,4 ± 2,1	39,9 ± 1,4	35,0 ± 0,6
ER1	Entre Ríos S30°26' W59°01'	30	71,9 ± 2,8	69,6 ± 2,8	41,2 ± 1,2	47,6 ± 0,7
ER2	Entre Ríos S30°26' W59°01'	34	65,5 ± 1,5	68,5 ± 2,5	39,9 ± 0,7	44,0 ± 0,6
ER3	Entre Ríos S30°36' W58°46'	33	72,0 ± 2,6	69,6 ± 1,0	41,2 ± 0,8	50,3 ± 0,4
ER4	Entre Ríos S30°34' W58°54'	28	65,5 ± 2,5	67,4 ± 1,4	39,9 ± 0,6	43,7 ± 1,7
ER5	Entre Ríos S30°33' W59°00'	18	64,3 ± 2,0	67,5 ± 2,2	39,8 ± 0,7	39,0 ± 1,0
CH1	Chaco S26°51' W58°56'	37	78,5 ± 3,5	6,7 ± 0,2	4,5 ± 0,1	51,1 ± 0,6
CH2	Chaco S26°51' W58°55'	33	84,2 ± 2,3	7,3 ± 0,2	4,5 ± 0,1	57,2 ± 0,5
CH3	Chaco S26°51' W59°02'	39	67,4 ± 2,6	6,6 ± 0,1	4,2 ± 0,1	44,4 ± 0,5
CH4	Chaco S26°48' W59°03'	36	64,3 ± 1,7	64,1 ± 1,1	41,8 ± 0,9	43,9 ± 0,5
CH5	Chaco S26°57' W 8°58'	31	73,2 ± 3,1	71,3 ± 3,2	42,5 ± 2,5	44,5 ± 1,7
CH6	Chaco S27°04' W58°57'	30	59,9 ± 2,6	61,6 ± 2,6	41,5 ± 2,0	38,0 ± 1,0
CH7	Chaco S26°47' W59°15'	40	78,6 ± 4,4	69,4 ± 4,4	44,8 ± 2,4	49,5 ± 1,3

<sup>1</sup> Establecido en la cosecha a campo.

<sup>2</sup> Ver detalles metodológicos en Materiales y Métodos, sección 3.7.

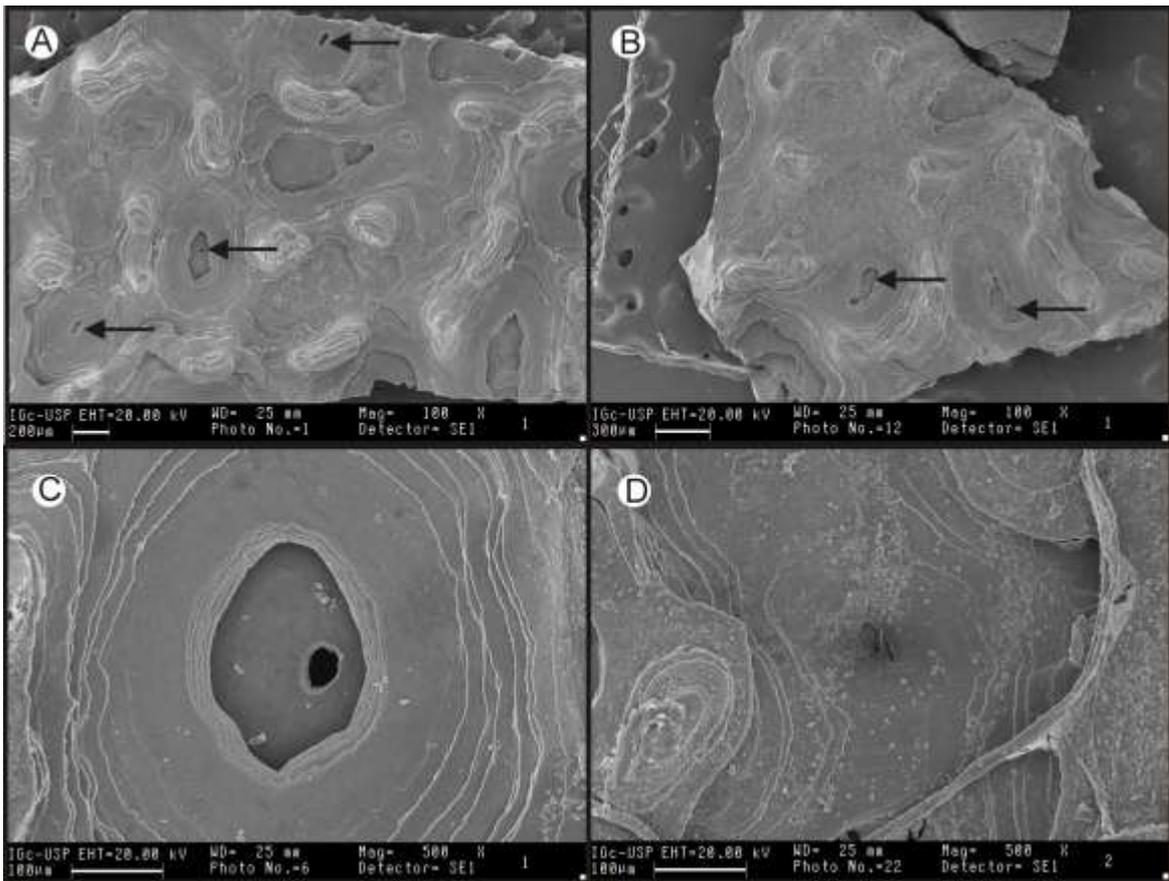
<sup>3</sup> La media para el peso se expresa en gramos y para los ejes en milímetros.



**Figura 39.** Correlación entre el estadio embrionario y el grosor y porosidad de la cáscara. El grosor y la porosidad de las cáscaras no se modificaron con el estadio embrionario (test Pearson).

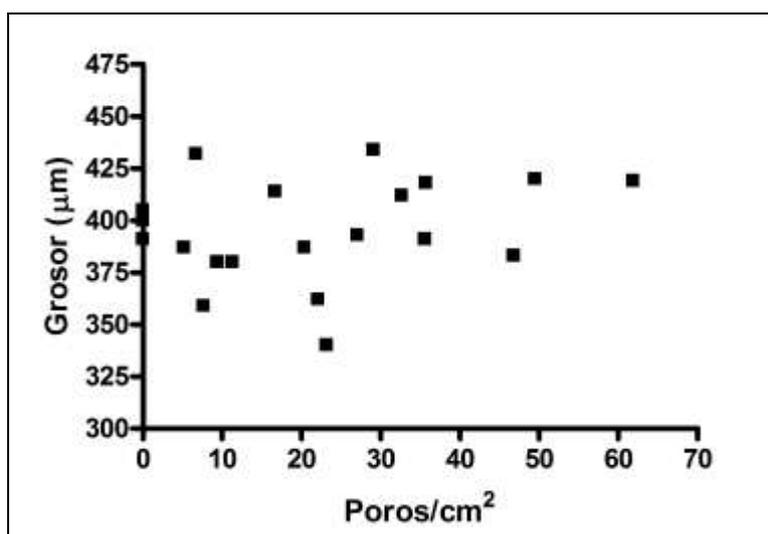
El grosor promedio de las cáscaras fue de  $400,9 \pm 6,0 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  SEM), con un rango de 339,8 a 433,8  $\mu\text{m}$ , sin observarse diferencias entre la zona apical y medial de la cáscara del huevo (test Mann Whitney,  $p > 0,05$ ).

La utilización del microscopio electrónico de barrido nos permitió cuantificar el número de poros abiertos por  $\text{cm}^2$  de cáscara en imágenes tridimensionales de las superficies de las cáscaras (Figura 40). En la Figura 40 se pueden observar poros abiertos (Figura 40A) o cerrados (Figura 40B) en un fragmento de cáscara. A mayor aumento se puede observar la diferencia entre ambos tipos de poros (Figura 40C y D). Del análisis de las imágenes pudimos determinar que el número de poros abiertos/ $\text{cm}^2$  es  $25,3 \pm 4,3$  (media  $\pm$  SEM), con un rango de 5,2 a 61,9 poros/ $\text{cm}^2$ .



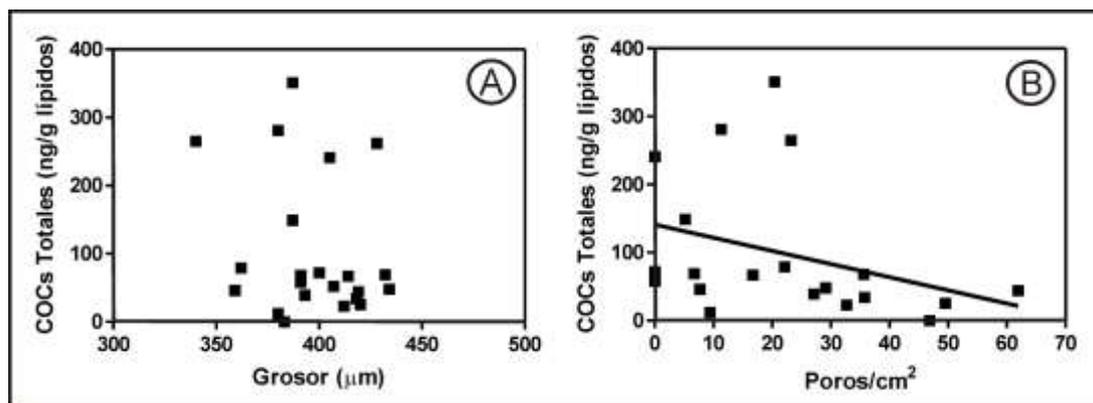
**Figura 40.** Electromicrografías de la cáscara de huevos de *C. latirostris* obtenidas por MEB. En A) se observan 3 poros abiertos (flechas) en el fragmento de la cáscara y en B) los poros se encuentran cerrados (flechas). Magnificación 100X. A mayor aumento puede distinguirse fácilmente entre el poro abierto (C) o cerrado (D). Magnificación 500X.

Tal como se observa en la Figura 41, no observamos correlación entre el grosor y el número de poros en las cáscaras analizadas.



**Figura 41.** Correlación entre el número de poros/cm<sup>2</sup> y el grosor de la cáscara (test Pearson).

Los niveles de residuos de COCs que hallamos en los huevos evidencian un proceso de transferencia materna. Teniendo en cuenta que un número importante de COCs ha sido clasificado como PE y que el oviducto materno es un órgano blanco de acción hormonal, nos preguntamos si la calidad de la cáscara de los huevos (grosor y porosidad) fue afectada por las concentraciones de COCs presentes en los mismos. Para contestarnos esta pregunta, realizamos ensayos de correlación para pesticidas y PCBs de manera individual y combinada. No observamos correlación significativa entre el grosor de la cáscara y las concentraciones de COCs (Figura 42A). En cambio, el número de poros/cm<sup>2</sup> se correlacionó negativamente con el contenido de organoclorados, sugiriendo que una mayor concentración de COCs causa una reducción en el número de poros/cm<sup>2</sup> de la cáscara (Figura 42B).



**Figura 42.** A) Correlación entre grosor y COCs totales presentes en los huevos de *C. latirostris*. Estas variables no presentan correlación significativa (test Spearman  $r$ :-0,20 y  $p$ : 0,37). B) Correlación entre porosidad y COCs totales presentes en los huevos de *C. latirostris*. Se observa una correlación negativa entre el número de poros de la cáscara y el contenido de COCs totales (test Spearman  $r$ :-0,51 y  $p$ : 0,02).

#### 4.4-Éxito reproductivo.

En la tabla 12 se resumen los datos de las variables reproductivas de cada nido. Para evaluar si la exposición a COCs podría afectar la fertilidad de la hembra, se correlacionó el número de huevos por nido y la concentración de COCs. Como se muestra en la Figura 43, solo observamos una correlación negativa entre el número de huevos por nido y el contenido de pesticidas organoclorados (test Pearson  $r$ = -0,57,  $p$ = 0,017). No observamos correlación respecto al porcentaje de nacidos vivos o la supervivencia a los 10 días (Figura 44).

**Tabla 12.** Características de las nidadas: parámetros reproductivos y concentraciones de COCs.

Nido	Número de huevos <sup>1</sup>	Nacidos vivos (%) <sup>2</sup>	Supervivencia a los 10 días (%)	$\Sigma$ OCPs (ng/g lípido)	$\Sigma$ PCBs (ng/g lípido)
SF1	39	91,9	91,9	61,9	11,6
SF2	35	85,2	85,2	63,0	LD
media $\pm$ SEM	37 $\pm$ 2	88,5 $\pm$ 3,3	88,5 $\pm$ 3,3	62,5 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 4,6
rango	35-39	85,2-91,9	85,2-91,9	61,9-63,0	LD-11,6

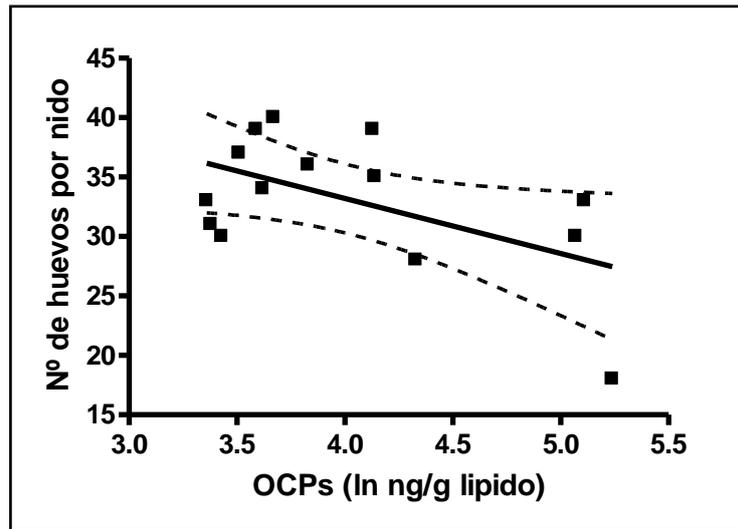
ER1	30	92,6	92,6	159,5	35,5
ER2	34	96,6	93,1	37,2	7,7
ER3	33	82,7	79,3	28,9	LC
ER4	28	76	44	75,8	32,0
ER5	18	0	0	189,0	44,5
<b>media ± SEM</b>	<b>28,6 ± 2,9</b>	<b>69,6 ± 17,8</b>	<b>61,8 ± 17,9</b>	<b>98,1 ± 32,4</b>	<b>24,4 ± 8,2</b>
<b>rango</b>	<b>18-34</b>	<b>0-96,6</b>	<b>0-93,1</b>	<b>28,9-189,0</b>	<b>LC-44,5</b>
CH1	37	5,8	0,7	33,5	LC
CH2	33	100	100	166,4	136,6
CH3	39	94,6	94,6	36,3	LC
CH4	36	91,2	91,2	46,0	21,0
CH5	31	82,1	78,6	29,3	13,5
CH6	30	82,1	82,1	31,0	13,0
CH7	40	86,5	86,5	39,3	11,5
<b>media ± SEM</b>	<b>35,1 ± 1,5</b>	<b>78,7 ± 10,6</b>	<b>76,2 ± 12,9</b>	<b>54,5 ± 18,8</b>	<b>30,1 ± 17,8</b>
<b>Rango</b>	<b>30-40</b>	<b>5,8-100</b>	<b>0,7-100</b>	<b>29,3-166,4</b>	<b>LC-136,6</b>

SF: Santa Fe; ER: Entre Ríos y CH: Chaco.

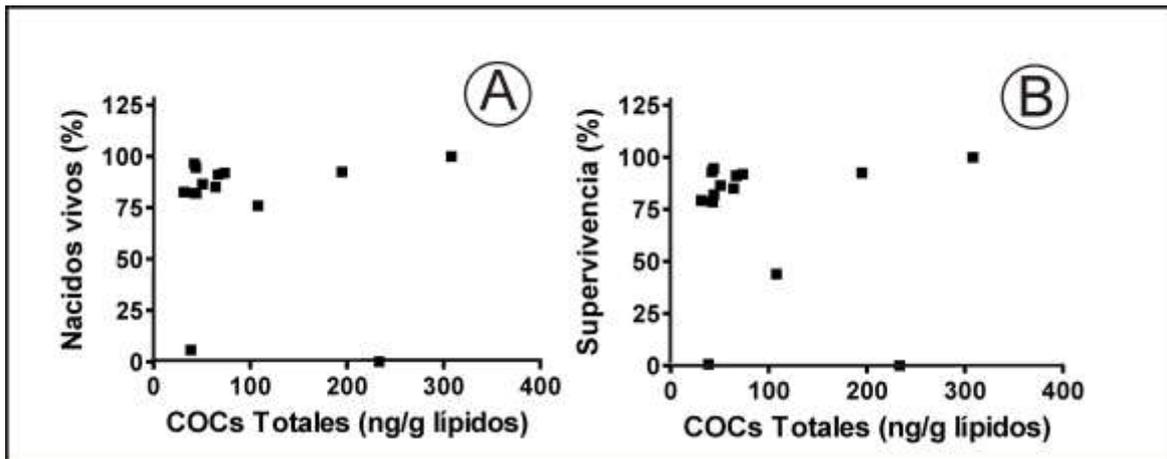
<sup>1</sup> Establecido a campo en el momento de la cosecha.

<sup>2</sup> Número de crías nacidas vivas/ número de huevos incubados.

OCPs: pesticidas organoclorados; PCBs: bifenilos policlorados; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación.



**Figura 43.** Correlación entre el número de huevos por nido y el contenido de OCPs (test Pearson  $r = -0,57$ ,  $p = 0,017$ ). Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.



**Figura 44.** A- Correlación entre el porcentaje de nacidos vivos y el contenido de COCs totales (test Pearson  $r = -0,12$ ,  $p = 0,673$ ). B- Correlación entre el porcentaje de supervivencia a los 10 días y el contenido de COCs totales (test Pearson  $r = -0,10$ ,  $p = 0,723$ ).

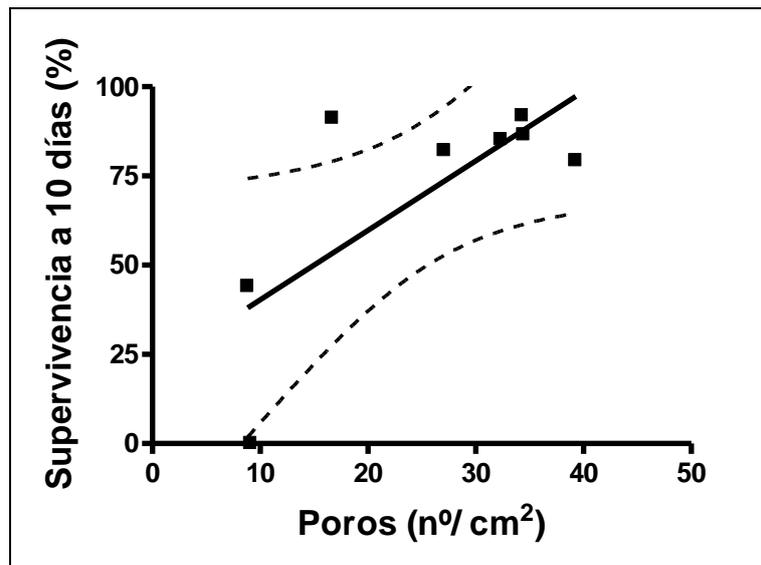
En la tabla 13 se resumen y agrupan los datos correspondientes a grosor y porosidad de la cáscara del huevo, % de nacidos vivos, % de supervivencia a los 10 días de edad y concentraciones de COCs.

**Tabla 13:** Características de la cáscara del huevo, parámetros de la viabilidad del nido y concentraciones de COCs en los nidos de *C. latirostris*.

<b>Nido</b>	<b>Nacidos vivos (%)</b>	<b>Supervivencia a los 10 días (%)</b>	<b>Grosor de la cáscara (µm)</b>	<b>Poros de la cáscara (poros/cm<sup>2</sup>)</b>
SF1	91,9	91,9	419,3	34,3
SF2	85,2	85,2	412,5	32,4
ER3	82,7	79,3	416,7	39,3
ER4	76,0	44,0	388,3	8,9
ER5	0,0	0,0	390,6	9,1
CH4	91,2	91,2	414,0	16,7
CH6	82,1	82,1	393,0	27,1
CH7	86,5	86,5	372,0	34,5

SF: Santa Fe; ER: Entre Ríos y CH: Chaco.

Como se menciona en la introducción, el grosor de la cáscara del huevo y la porosidad pueden afectar la viabilidad embrionaria. Nuestros resultados muestran que, el grosor (Pearson  $r$ : 0,03;  $p=0,45$ ) y la porosidad (Pearson  $r$ : 0,59;  $p=0,13$ ) no afectaron el porcentaje de nacidos vivos. Sin embargo, como se muestra en la Figura 45, un menor número de poros/cm<sup>2</sup> se correlaciona con una menor supervivencia del neonato a los 10 días.



**Figura 45:** Correlación entre la supervivencia a los 10 días del nido y el número de poros de la cáscara (test Pearson  $r = 0,73$ ;  $p=0,04$ ). Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.

Considerando que la exposición del embrión a concentraciones de COCs podría alterar la señalización que conduce a un correcto desarrollo embrionario, evaluamos la presencia de malformaciones congénitas y la incorporación del vitelo remanente. El vitelo remanente es la fuente de energía para el desarrollo de los neonatos.

Malformaciones congénitas y una incorporación alterada del saco vitelino remanente podría comprometer la sobrevivencia de los neonatos. En la Figura 46A se observa un abdomen completamente cerrado correspondiente a una **cicatrización "normal"**, mientras que en las Figuras 46B-C se muestran ejemplos de **"cicatrización parcial"**, evidenciado por un menor grado de desarrollo del tejido de cicatrización en la zona de ingreso del saco vitelino a la cavidad abdominal. Tanto en cicatrización completa como parcial se observa la correcta incorporación del vitelo remanente. En la Figura 46D se observa la incompleta incorporación del saco vitelino a la cavidad abdominal, denominada

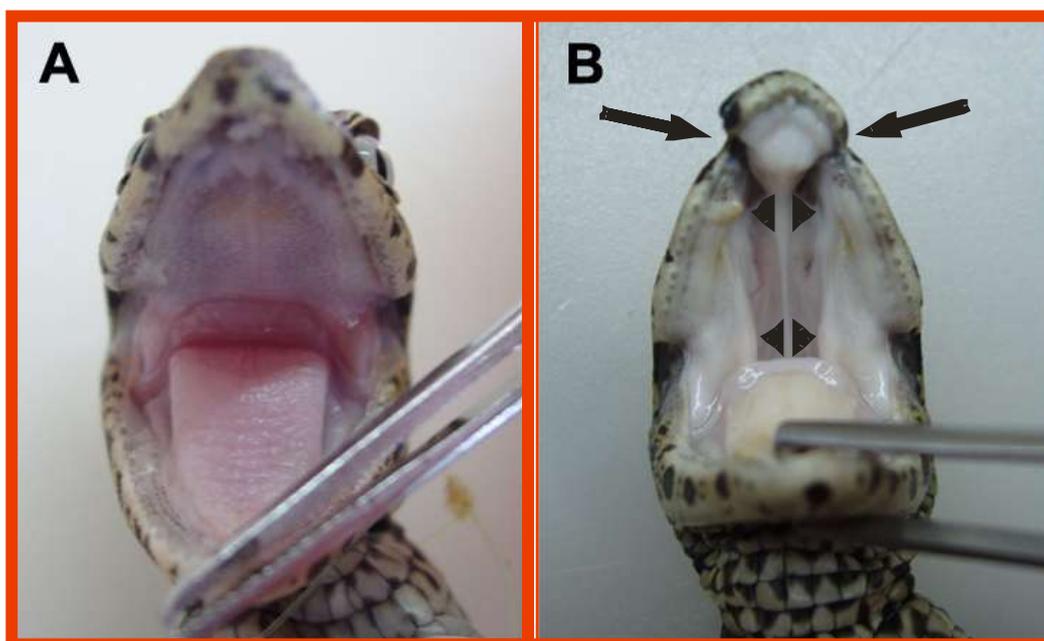
“herniación”. Cuando el saco vitelino no se incorpora a la cavidad abdominal la supervivencia de la cría está en riesgo.



**Figura 46:** Grados de cicatrización abdominal en crías a término de *Caiman latirostris*. A) Abdomen completamente cerrado: cicatrización normal. B) y C) cicatrización parcial. D) Incorporación incompleta del saco vitelino a la cavidad abdominal: herniación.

Al momento del nacimiento se registró la incidencia de malformaciones orofaciales, grado de cicatrización y de herniación. Del registro de cicatrizaciones se pudo constatar que 61,3% de los neonatos presentó cicatrización abdominal completa, 16,1% mostró cicatrización parcial y 22,6% evidenció herniación. Se

registraron malformaciones orofaciales sólo en el 4,5% de los neonatos, los que mostraron un desarrollo incompleto del paladar (Figura 47) evidenciado por la presencia de hendiduras. No encontramos asociación entre estas variables y las concentraciones de los COCs estudiados.

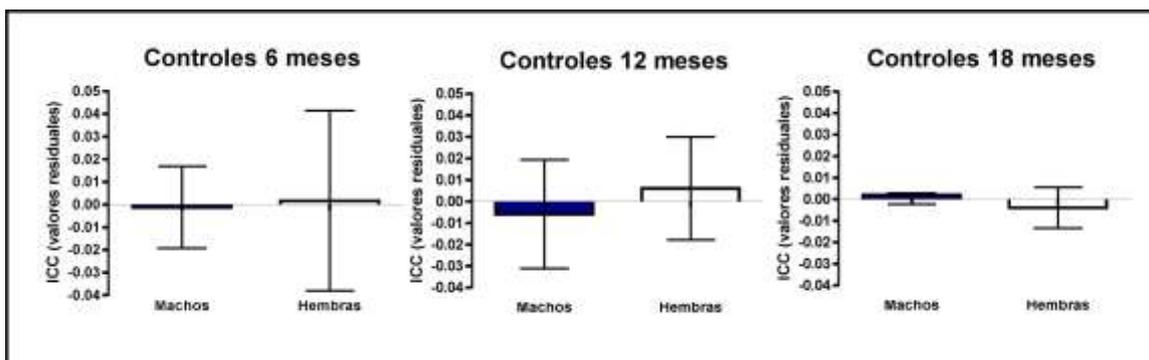


**Figura 47:** Desarrollo orofacial al nacimiento. A: Paladar completamente cerrado y sin hendiduras labiales. B: Presencia de hendidura labial bilateral (flechas), hendiduras en el paladar que van desde la parte anterior de la cavidad nasal hasta la parte posterior del conducto nasofaríngeo (punta de flecha).

## Exposición Experimental

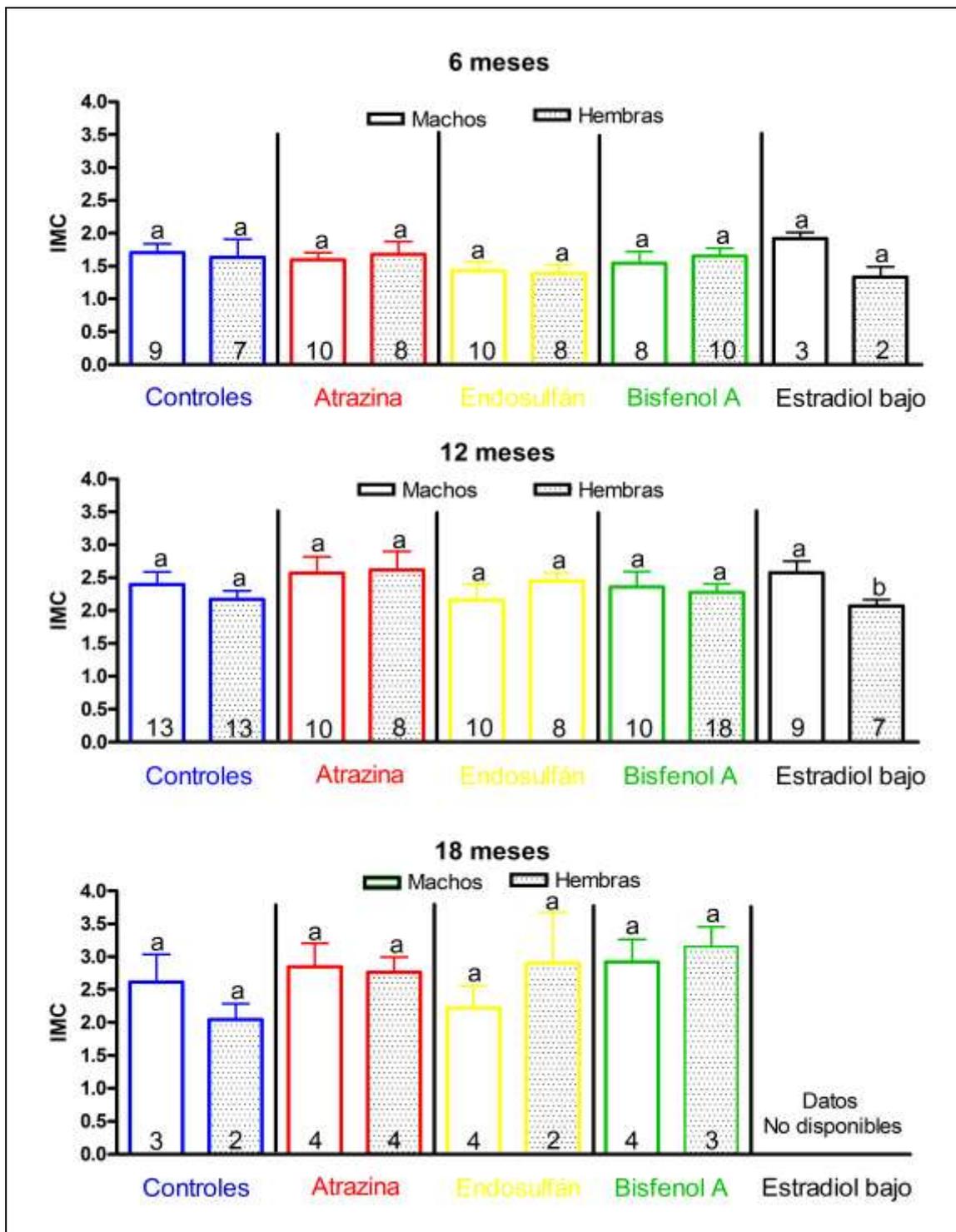
### 4.5- Evaluación del crecimiento de los yacarés overos.

En primer lugar, analizamos si los índices IMC e ICC difieren entre machos y hembras en el grupo control a las edades de 6, 12 y 18 meses de edad, concluyendo que ambos índices no difieren entre machos y hembras en las edades evaluadas (Figura 48, 49). Observamos que el IMC de las hembras tratadas con E2 (0,014ppm) es menor que el de los machos a los 12 meses de edad (Mann Whitney  $p < 0,05$ ), siendo similares en el resto de las edades evaluadas. ATZ, END o BPA no generaron dimorfismo sexual para el IMC o el ICC en ninguna de las edades evaluadas (Figura 49-51).

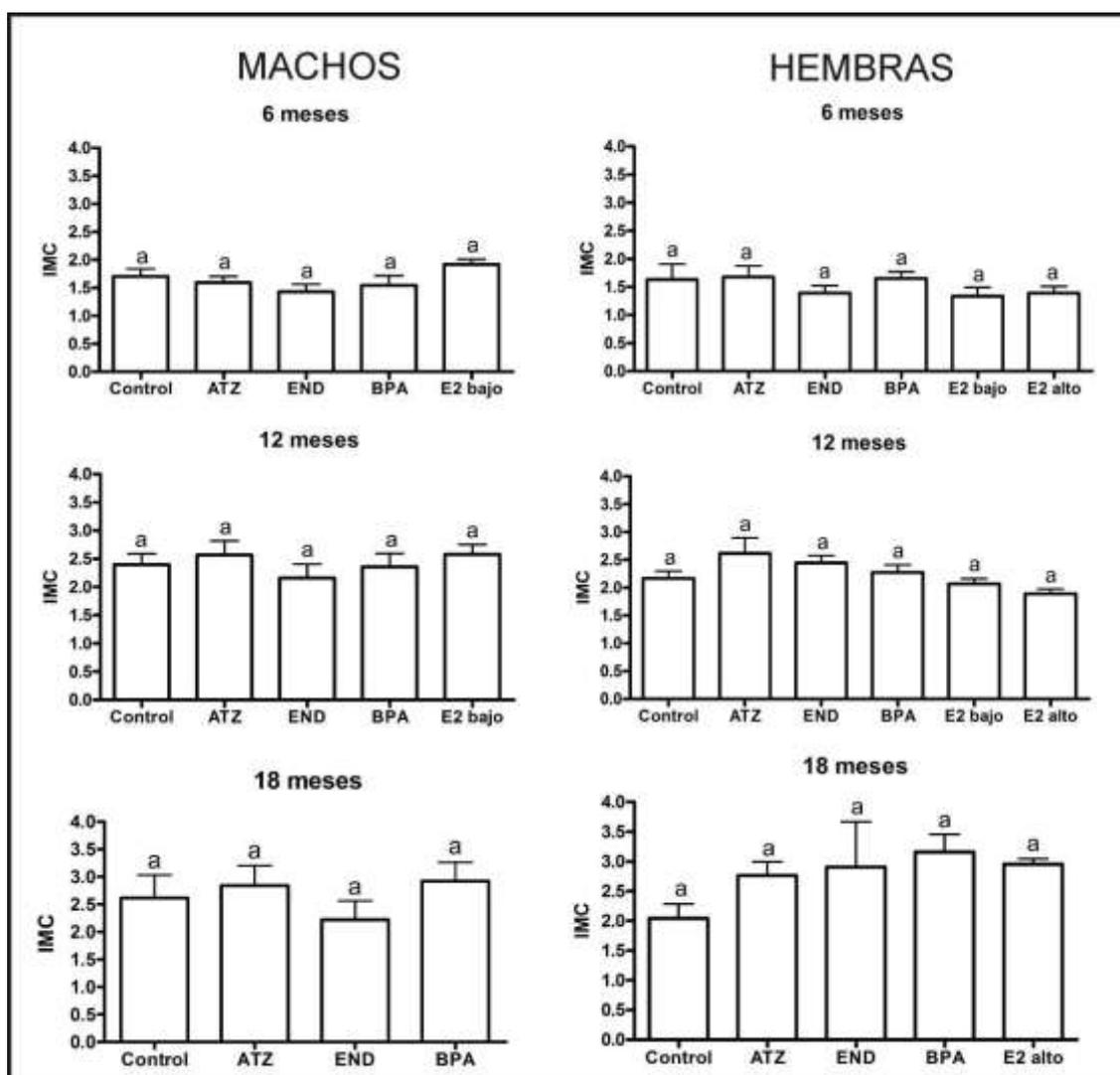


**Figura 48.** Evaluación del dimorfismo sexual del índice de condición corporal (ICC). Este índice no difiere entre machos y hembras en las edades evaluadas.

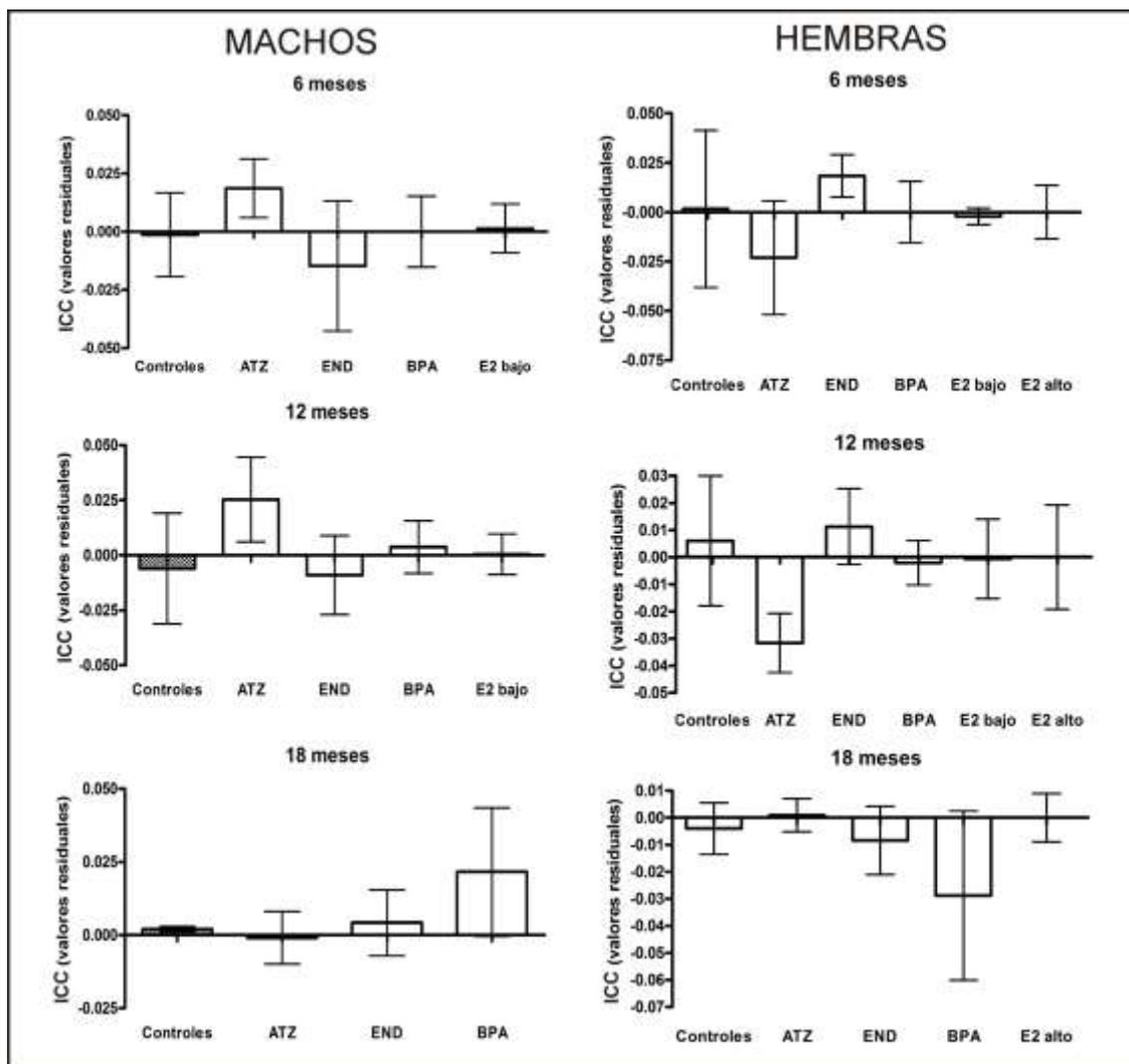
Por otro lado, evaluamos si la exposición prenatal a E2 o a los PE seleccionados (ATZ, END, BPA) modifica el IMC o el ICC de machos y hembras. Los resultados obtenidos muestran que tanto en machos como en hembras no se observaron diferencias en IMC o ICC debidas al tratamiento con, ATZ, END o BPA para las diferentes edades analizadas (Figuras 49-51). Mientras que la exposición a E2 bajo (0,014 ppm) produce una disminución en el IMC de las hembras a los 12 meses con respecto a los machos, mostrando diferencia significativa respecto a los machos de ese mismo grupo experimental (Figura 49). Sin embargo, las hembras de E2 bajo no se diferenciaron de las hembras controles. La exposición a E2 bajo hace significativa la tendencia observada en el grupo control. Debido a que no disponemos de datos a los 18 meses de animales expuestos a E2 bajo, no sabemos si esta diferencia en el IMC entre machos y hembras se mantiene.



**Figura 49.** Efecto de los contaminantes sobre el índice de Masa corporal (IMC). Se analizó el dimorfismo sexual de IMC a los 6, 12 y 18 meses de edad. El índice se presenta como un parámetro no dimórfico para las edades analizadas, excepto en los animales de 12 meses tratados con E2 bajo (0,014ppm) donde se observa diferencia en el IMC entre machos y hembras para este índice. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, las diferentes letras indican diferencia dentro del mismo grupo experimental. (Mann Whitney  $p < 0,05$ ). No se compara con el grupo control.



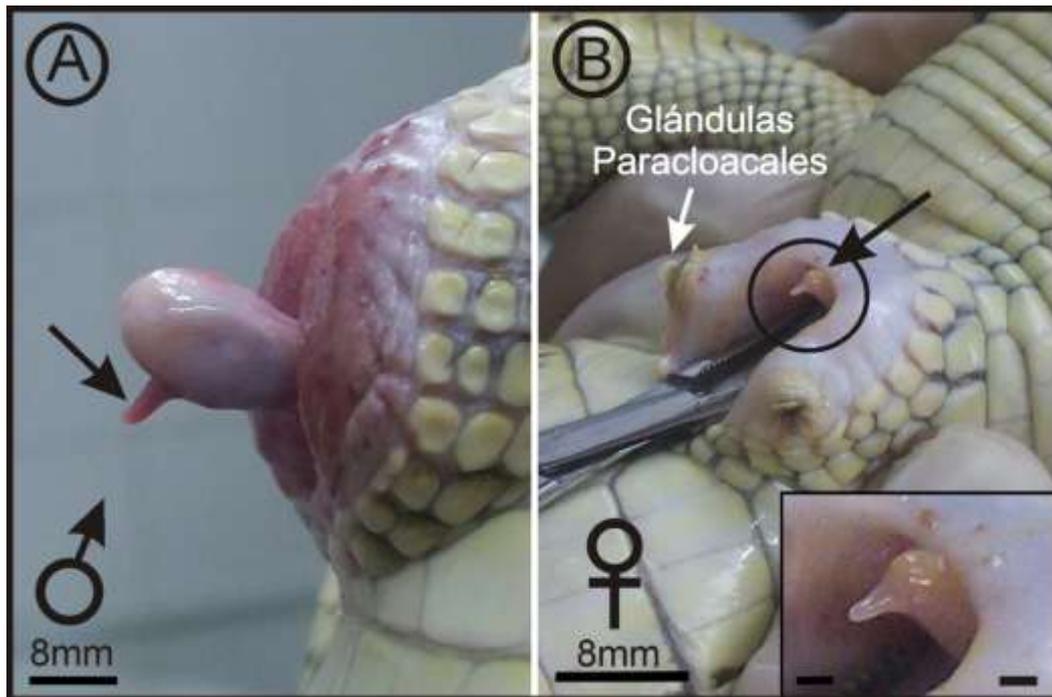
**Figura 50.** Efecto de los contaminantes sobre el índice de Masa corporal (IMC). Se analizó el efecto de los diferentes contaminantes con respecto a los animales controles, a los 6, 12 y 18 meses de edad, en caimanes machos y hembras criados en condiciones controladas. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).



**Figura 51.** Efecto de los contaminantes sobre el índice de condición corporal (ICC). Se analizó el efecto de los diferentes contaminantes en machos y hembras de 6, 12 y 18 meses de edad, criados en condiciones controladas respecto de los controles. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

#### 4.6- Morfometría de genitales externos.

En la Figura 52 se puede observar la estructura clítoris-pene (*phallus*) de un macho y una hembra juveniles, con pesos corporales similares. El *phallus* del macho posee una coloración rojiza, debido a una mayor irrigación sanguínea, mientras que el *phallus* de las hembras es blanquecino.



**Figura 52.** Dimorfismo sexual del *phallus* en caimanes juveniles controles. Se observa la diferencia morfológica y de coloración entre el *phallus* del macho, más grande y rojizo debido a la mayor irrigación sanguínea y la hembra, más pequeña y blanquecina. Barra dentro del inserto = 2mm.

Para establecer si el desarrollo del *phallus* está asociado con el crecimiento del animal, se realizaron una serie de análisis de correlación con los datos de animales del grupo control. En machos y hembras controles se correlacionaron parámetros morfométricos estructurales (Figura 27) que reflejan el desarrollo del *phallus* (largo, ancho y alto) con distintas variables alométricas del animal (peso, LT y SVL) (Tabla 14). Los resultados obtenidos demostraron que en machos el largo del *phallus*, el ancho y alto de la cabeza del *phallus*, se correlacionan positivamente con el peso del animal, LT y SVL. En las hembras, el largo del *phallus* de también se correlaciona de manera positiva con el peso, LT y SVL, mientras que el ancho de la cabeza del *phallus* tiene correlación positiva con el peso y LT. El alto de la cabeza del *phallus* de las hembras no se correlaciona con ninguna de las variables alométricas analizadas. Estas asociaciones nos permitieron identificar las variables alométricas que se pueden usar como normalizadoras, para poder distinguir entre las modificaciones debidas al crecimiento del animal y las causadas por el efecto de los contaminantes. Se

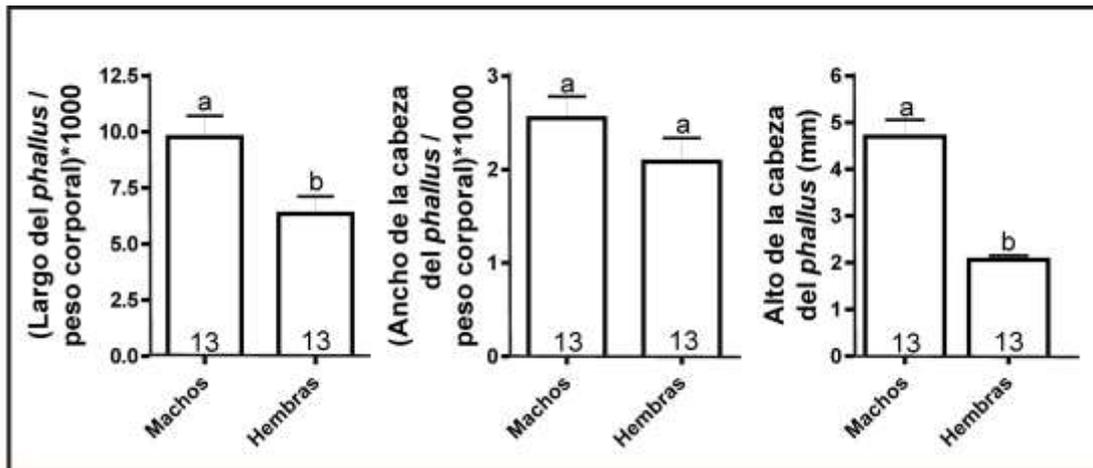
eligió el peso del animal como normalizador de todas las variables en los machos, y para longitud y ancho del *phallus* de las hembras. Como el alto de la cabeza del *phallus* de las hembras no presentó correlación con ninguna de las variables alométricas, se usaron los datos crudos para el análisis de esta variable.

**Tabla 14.** Análisis de correlación entre variables morfométricas estructurales del *phallus* y parámetros de crecimiento de *C. latirostris*.

	Peso (g)		Largo Total (mm)		SVL (mm)	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Ancho (mm)	0,8812*	0,6517*	0,8655*	0,5555*	0,9258*	0,5119
Alto (mm)	0,9291*	0,0210	0,9188*	-0,0264	0,9549*	-0,0709
Largo (mm)	0,8882*	0,6618*	0,8596*	0,5933*	0,9160*	0,6069*

Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las medidas del *phallus* y las variables alométricas para machos (n=10) y hembras controles (n=11). El asterisco indica correlación significativa.

Como se observa en la Figura 52 el *phallus* es un órgano dimórfico. Para determinar si todas las variables morfométricas presentan dimorfismo sexual en caimanes juveniles, se compararon las variables morfométricas del mismo entre machos y hembras del grupo control. Como puede observarse en la Figura 53, tanto la longitud total como el alto de la cabeza del *phallus* son variables dimórficas en caimanes de 12, 18 y 24 meses de edad, mientras que no se observa este dimorfismo para el ancho de la cabeza del *phallus*.



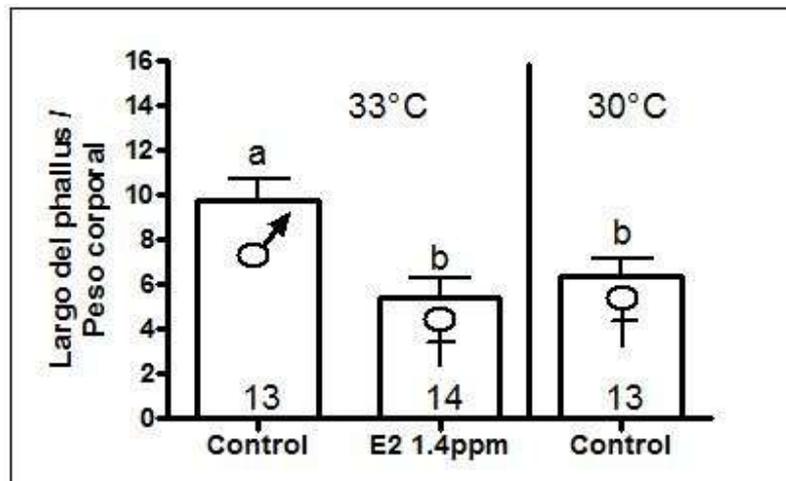
**Figura 53.** Dimorfismo sexual del *phallus*. El largo del *phallus* y el alto de la cabeza del *phallus* difieren entre machos y hembras juveniles, siendo los valores de estas variables en machos mayores que en hembras. En cambio el ancho de la cabeza del *phallus* muestra relación con el sexo de los caimanes. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

Para establecer posibles efectos deletéreos de los contaminantes seleccionados, evaluamos la influencia de los mismos sobre las variables morfométricas (largo, ancho y alto), el dimorfismo sexual y la asociación con el peso corporal del *phallus*.

#### **4.6.1- La exposición a E2 1,4 ppm, prevalece sobre la influencia de la temperatura en la determinación del sexo.**

En trabajos previos hemos demostrado que se obtienen caimanes hembras de huevos incubados a la temperatura de obtención de machos cuando aquellos han sido expuestos a E2 1,4 ppm (Stoker y col, 2003). En este trabajo la confirmación de la reversión sexual fue a través del análisis histológico de las gónadas, debido a que es difícil distinguir entre machos y hembras por observación de genitales externos al momento del nacimiento. Para profundizar en la caracterización de la determinación del sexo por acción hormonal (DSH: huevos incubados a 33°C y topicados con E2 1,4ppm) en comparación con la determinación del sexo por temperatura (DST: incubados a 33°C y topicados con etanol 100%), evaluamos si las distintas variables morfométricas del *phallus* de las hembras obtenidas por DSH son similares a las de las hembras obtenidas por

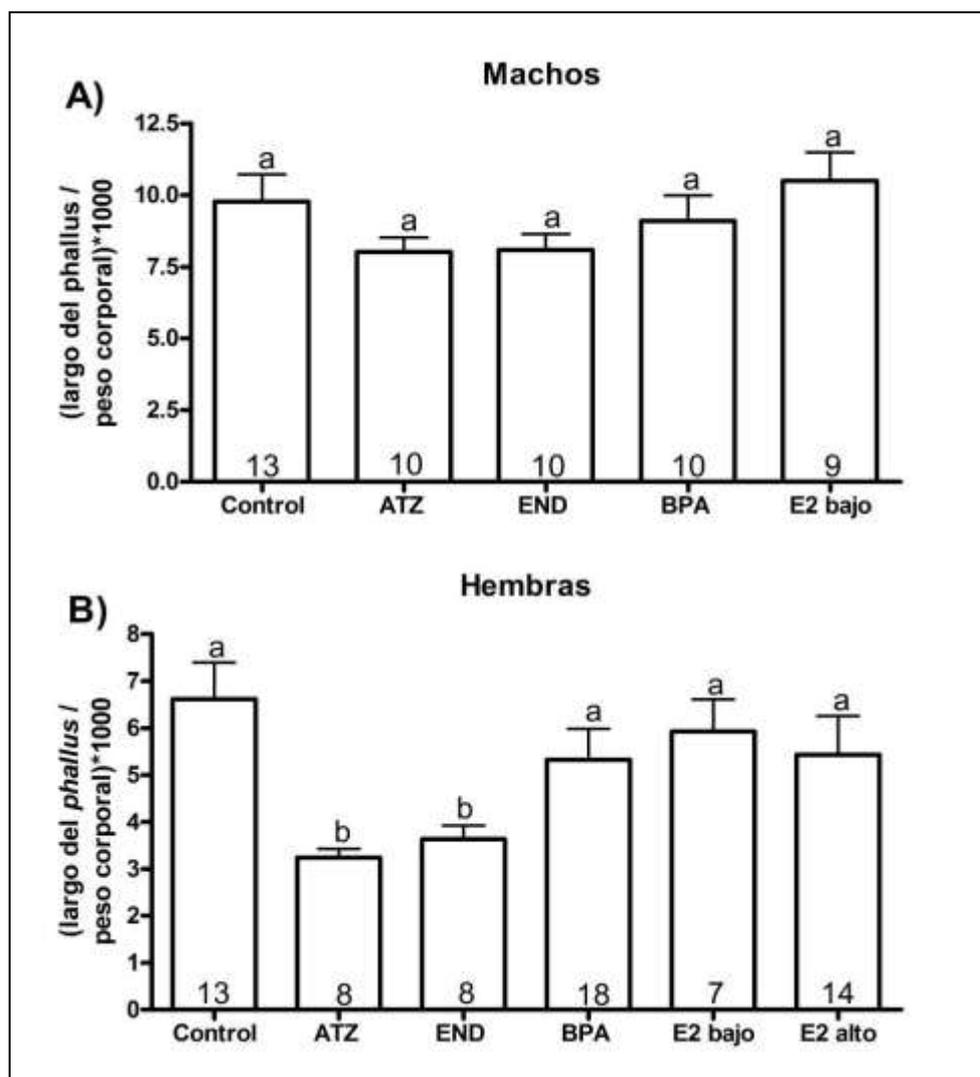
DST. Como se observa en la Figura 54, el largo del *phallus* de las hembras obtenidas por DSH (33°C) no presenta cambios en comparación con el *phallus* de las hembras obtenidas por DST (30°C) siendo, significativamente más chico que el de los machos obtenidos por DST.



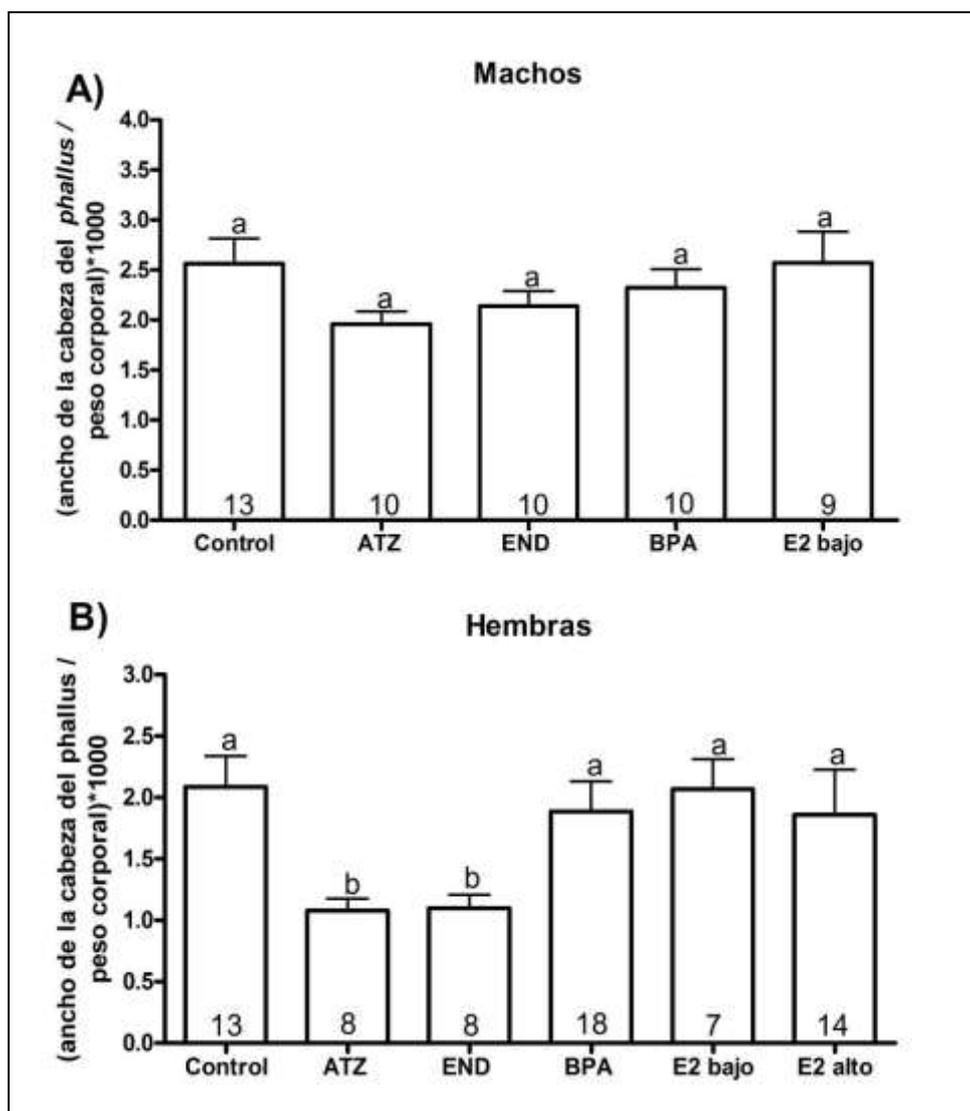
**Figura 54.** Efecto de E2 1,4ppm sobre el largo del *phallus* en caimanes juveniles. Se compararon los valores del largo del *phallus* de caimanes juveniles provenientes de huevos topicados con 17- $\beta$  estradiol e incubados a temperatura de obtención de machos (33°C), con los obtenidos de los animales topicados con etanol 100% (controles) e incubados a temperatura de obtención de machos o de hembras (33° y 30°C respectivamente). Los valores representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencias significativas (Mann Whitney,  $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2- La exposición a ATZ y END reduce el *phallus* de las hembras.

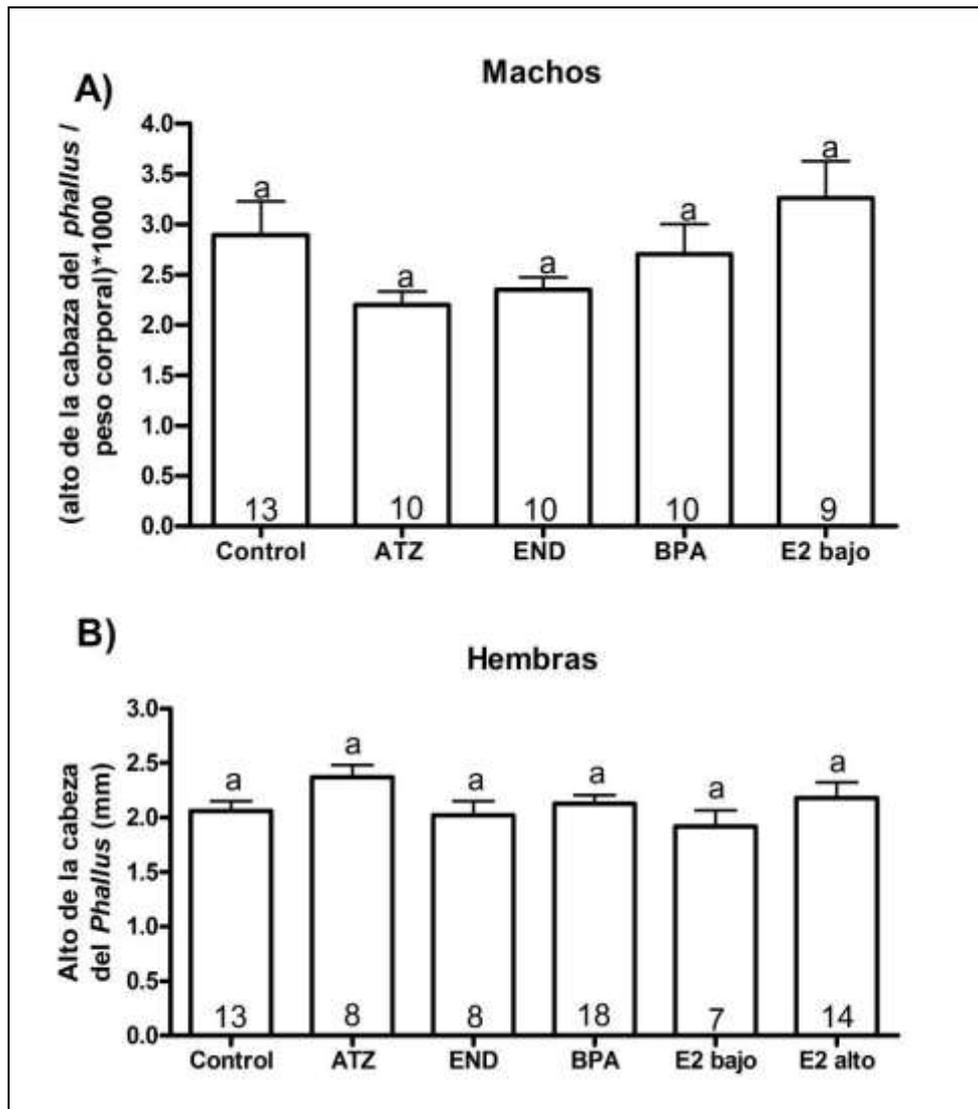
Como se puede observar en las Figuras 55 y 56, las hembras expuestas *in ovo* a ATZ o END muestran una reducción significativa del *phallus*, que se evidencia en una menor longitud total y ancho de la cabeza (Figura 55B y 56B). BPA y E2 no provocaron cambios en el tamaño del *phallus* de las hembras, mientras que ninguno de los contaminantes evaluados modificó la morfometría del *phallus* de los machos.



**Figura 55.** Efecto de los contaminantes sobre el largo del *phallus*. En machos (A) no se observa efecto de los contaminantes sobre el largo del *phallus*. En hembras (B) se observa que la ATZ y el END (0,2 y 20 ppm respectivamente) provocan una disminución en el largo del *phallus*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).



**Figura 56.** Efecto de los contaminantes sobre el ancho de la cabeza del *phallus*. En machos (A) no se observa efecto de los contaminantes sobre el ancho de la cabeza del *phallus*. En hembras (B) se observa que la ATZ y el END (0,2 y 20 ppm respectivamente) provocan una disminución en el ancho de la cabeza del *phallus*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

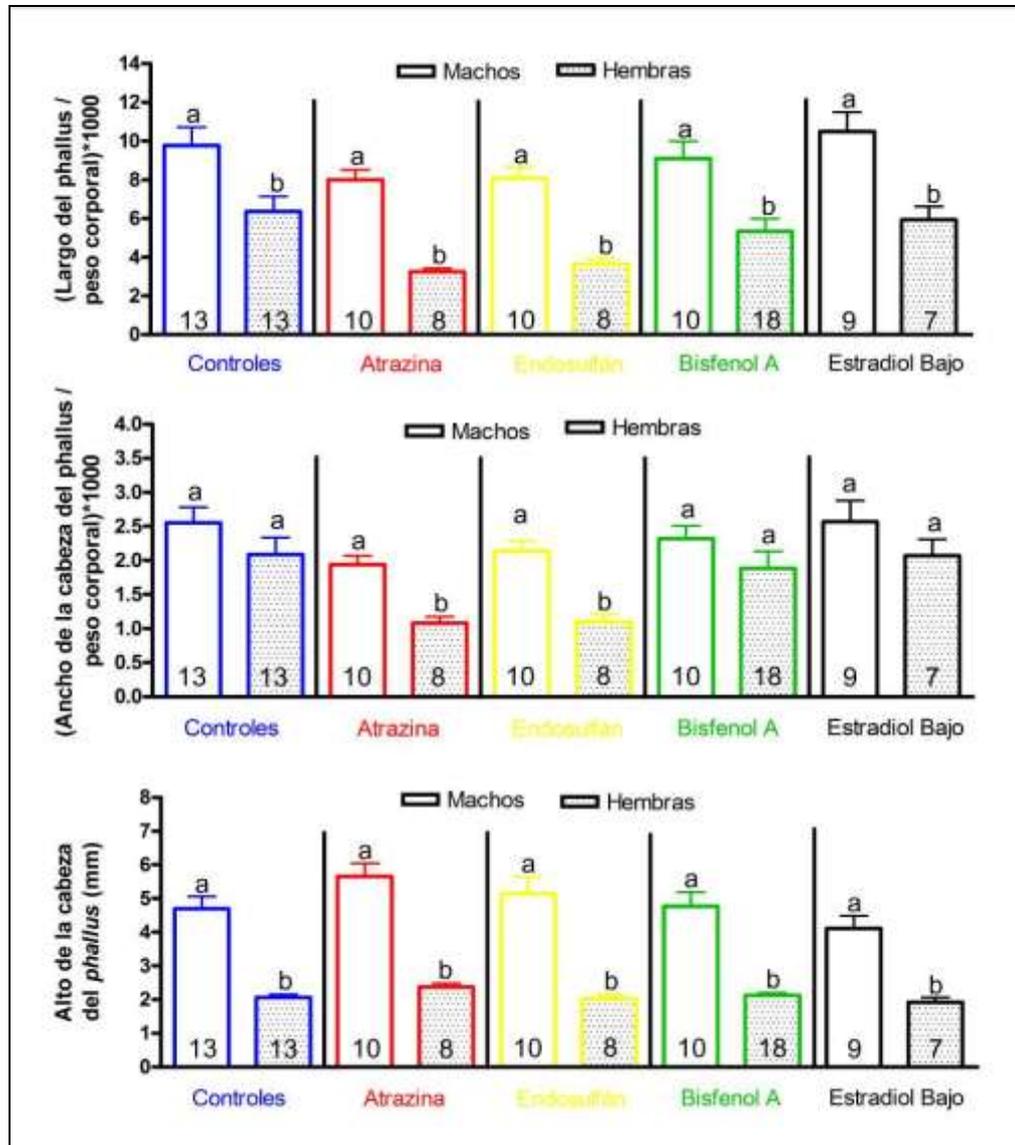


**Figura 57.** Efecto de los contaminantes sobre el alto de la cabeza del *phallus*. Tanto en machos (A) como en hembras (B) no se observa efecto de los contaminantes sobre el alto de la cabeza del *phallus*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

#### 4.6.3- El *phallus* de las hembras tratadas con ATZ o END presenta dimorfismo sexual.

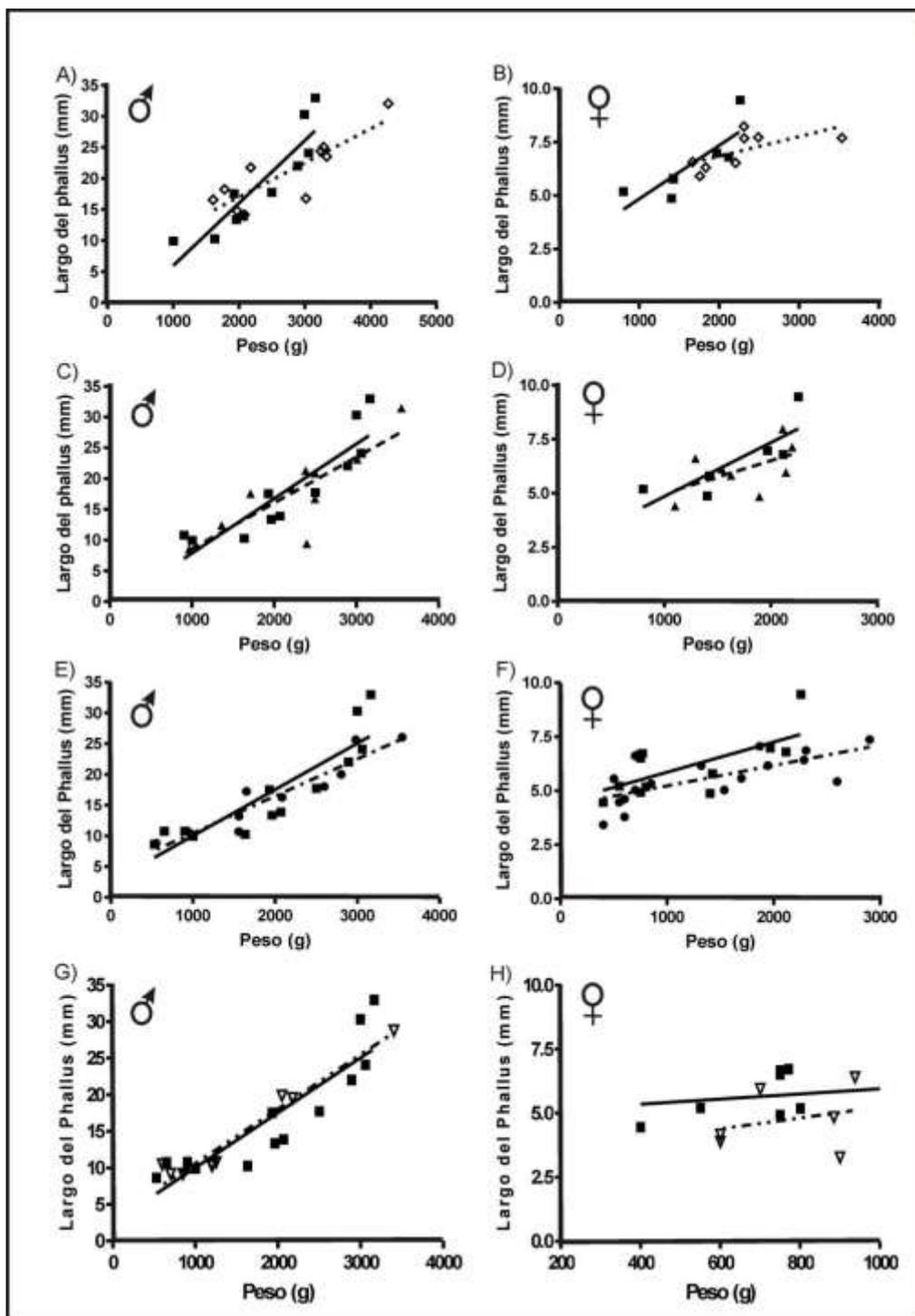
También se evaluó si el tratamiento con E2 o los xenoestrógenos seleccionados modifican el dimorfismo sexual propio del *phallus*. Como se observa en la Figura 58, el dimorfismo sexual del largo del *phallus* y el alto de la cabeza del *phallus* no es alterado por ATZ, END, BPA o E2. Sin embargo, el ancho de la cabeza del *phallus* de las hembras es menor respecto al de los

machos cuando han sido tratados con ATZ o END. Este dimorfismo sexual no está presente en animales controles.



**Figura 58.** Efecto de los contaminantes sobre el dimorfismo sexual del *phallus*. Los contaminantes evaluados no alteran el dimorfismo sexual del largo del *phallus* y alto de la cabeza del *phallus*. Se observa que la ATZ y el END (0,2 y 20 ppm respectivamente) generan dimorfismo sexual para el ancho del *phallus*, siendo mayor en los machos que en las hembras. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, evaluamos si los contaminantes alteran la asociación del largo del *phallus* con el peso corporal, concluyendo que esta correlación no es modificada por ATZ, END, BPA o E2 (Figura 59).



**Figura 59.** Efecto de la exposición *in ovo* a contaminantes sobre el largo del *phallus* en caimanes juveniles. (■) animales controles, (◊) tratados con ATZ 0,2ppm, (▲) tratados con END 20ppm, (●) tratados con BPA 1,4ppm, (▽) tratados con estradiol 0,014ppm. Se compararon las pendientes de las correlaciones del largo del *phallus* y el peso corporal entre caimanes controles y tratados, observándose que el E2 o los contaminantes aplicados no modificaron la normal correlación entre el largo del *phallus* y el peso corporal para machos y hembras: A)  $p=0,10$ ; B)  $p=0,09$ ; C)  $p=0,55$ ; D)  $p=0,90$ ; E)  $p=0,33$ ; F)  $p=0,40$ ; G)  $p=0,96$ ; H)  $p=0,72$ . El valor de “p” indica la probabilidad que las pendientes de las regresiones sean diferentes.

#### 4.7- Medidas craneofaciales.

Se evaluaron 10 parámetros craneofaciales en cada espécimen, los que se identifican en la Figura 28, en primer lugar se estudió la asociación de cada uno de estos parámetros con las variables alométricas de crecimiento de los animales (peso, LT y SVL), mediante ensayos de correlación. Los datos obtenidos nos permitieron establecer que, excepto OW, todas estas variables se correlacionan positivamente con el peso corporal. Por otro lado, OL, OW, CW y LCR no se correlacionan con LT y SVL (Tabla 15). En base a este análisis, las distintas variables craneofaciales, excepto OW, fueron normalizadas por el peso corporal de los animales para poder distinguir entre las modificaciones debidas al crecimiento del animal y las causadas por el efecto de los contaminantes. Para el análisis de OW se utilizaron los datos crudos.

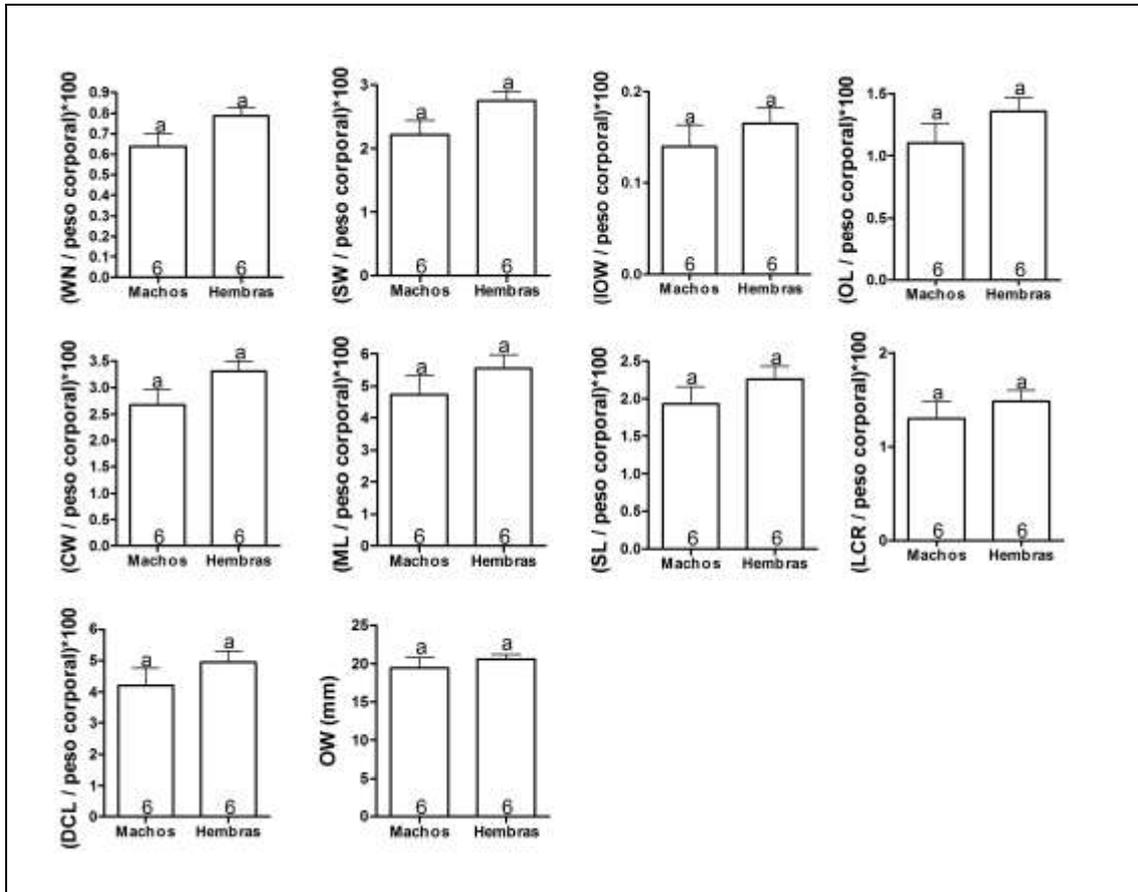
**Tabla 15.** Análisis de correlación entre medidas craneofaciales y parámetros de crecimiento de *C. latirostris*.

	Peso corporal (g)	Largo total (cm)	Longitud hocico-cloaca (cm)
WN	0,7882*	0,7106*	0,7771*
SW	0,8368*	0,7156*	0,7453*
OL	0,5783*	0,4253	0,3969
IOW	0,6849*	0,7129*	0,7689*
OW	0,4181	0,2800	0,3828
CW	0,7099*	0,5525	0,5575
ML	0,8643*	0,8121*	0,7142*
SL	0,8761*	0,8134*	0,7754*
LCR	0,6096*	0,4542	0,3301
DCL	0,7994*	0,7019*	0,6067*

Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las medidas craneofaciales y las variables alométricas de crecimiento de caimanes juveniles. El asterisco indica correlación significativa

Para establecer si las características craneofaciales de caimanes juveniles criados en bioterio con condiciones controladas es diferente entre machos y hembras, se compararon las medidas de las variables analizadas entre caimanes controles de ambos sexos. Como puede observarse en la Figura 60, en

este rango etario, el cráneo de los machos no es diferente del de las hembras, ya que no observamos dimorfismo sexual en ninguna de las variables craneofaciales evaluadas.



**Figura 60.** Dimorfismo sexual en las variables craneofaciales. Las variables craneofaciales evaluadas no son diferentes entre machos y hembras en caimanes juveniles controles criados bajo condiciones controladas. Las variables fueron normalizadas por el peso corporal (media  $\pm$  SEM; Machos:  $2610 \pm 267,7g$ ; Hembras:  $1766 \pm 160,0g$ ), excepto OW. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, letras distintas indican diferencia significativa (Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

Para establecer posibles efectos deletéreos de los contaminantes seleccionados, evaluamos la influencia de los mismos sobre las medidas craneofaciales así como sobre su dimorfismo sexual y asociación con el peso corporal.

#### 4.7.1- La morfometría del cráneo de las hembras es modificada por la exposición a ATZ o END.

Las tablas 16 y 17 muestran los efectos de E2, ATZ, END y BPA sobre la morfometría craneal en caimanes juveniles. En los machos no se observaron modificaciones. En cambio, las hembras tratadas con END poseen un menor IOW respecto de las hembras controles. Por otro lado, las hembras expuestas a ATZ presentaron una disminución del ancho máximo de las narinas (WN,  $p=0,0260$ ), de la base del hocico (SW,  $p=0,0152$ ) y craneal (CW,  $p=0,0411$ ) con respecto a las hembras controles (Tabla 17). El resto de las variables craneofaciales de las hembras no fueron afectadas por la exposición a E2 o alguno de los contaminantes evaluados.

**Tabla 16.** Efecto de la exposición *in ovo* a compuestos agroindustriales, sobre las medidas cráneo–faciales de yacarés overos machos juveniles.

Variables	CONTROL	ATZ 0,2 ppm	END 20 ppm	BPA 1,4 ppm	E2 0,014 ppm
	n= 6	n=7	n=9	n=6	n=3
<b>WN</b>	0,64 ± 0,16	0,59 ± 0,16	0,75 ± 0,20	0,64 ± 0,17	0,60 ± 0,14
<b>SW</b>	2,22 ± 0,55	2,12 ± 0,56	2,68 ± 0,80	2,29 ± 0,60	2,12 ± 0,39
<b>OL</b>	1,17 ± 0,35	1,08 ± 0,22	1,43 ± 0,45	1,11 ± 0,31	1,05 ± 0,22
<b>IOW</b>	0,14 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,06
<b>OW<sup>a</sup></b>	20,55 ± 1,71	20,67 ± 3,45	18,78 ± 2,66	18,88 ± 1,08	19,63 ± 1,22
<b>CW</b>	2,67 ± 0,72	2,56 ± 0,66	3,73 ± 1,07	2,74 ± 0,72	2,48 ± 0,53
<b>ML</b>	4,74 ± 1,44	4,56 ± 1,21	5,84 ± 1,76	4,80 ± 1,41	4,39 ± 0,96
<b>SL</b>	1,93 ± 0,56	1,87 ± 0,51	2,36 ± 0,71	1,96 ± 0,58	1,80 ± 0,38
<b>LCR</b>	1,30 ± 0,44	1,30 ± 0,34	1,66 ± 0,58	1,38 ± 0,45	1,20 ± 0,28
<b>DCL</b>	4,22 ± 1,31	4,06 ± 1,12	5,23 ± 0,55	4,27 ± 1,33	3,81 ± 0,86

Los valores en milímetros factorizados por el peso, están expresados como media ± SEM. (a) valores en milímetros no factorizados.

**Tabla 17.** Efecto de la exposición prenatal a compuestos agroindustriales, sobre las medidas cráneo–faciales de yacarés overos hembras juveniles.

Variables	CONTROL	ATZ 0,2 ppm	END 20 ppm	BPA 1,4 ppm	E2 0,014 ppm	E2 1,4 ppm
	n=6	n=6	n=8	n=6	n=3	n=2
<b>WN</b>	0,79 ± 0,10	0,61 ± 0,12 *	0,75 ± 0,12	0,75 ± 0,15	1,03 ± 0,34	1,08 ± 0,39
<b>SW</b>	2,75 ± 0,36	2,07 ± 0,39*	2,61 ± 0,45	2,56 ± 0,54	3,51 ± 1,17	3,92 ± 1,28
<b>OL</b>	1,41 ± 0,25	1,10 ± 0,26	1,40 ± 0,26	1,29 ± 0,27	1,90 ± 0,74	2,17 ± 0,86
<b>IOW</b>	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02*	0,13 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,01
<b>OW<sup>a</sup></b>	19,43 ± 3,39	19,38 ± 0,92	17,44 ± 1,81	17,96 ± 0,74	17,44 ± 1,78	15,05 ± 2,70
<b>CW</b>	3,31 ± 0,45	2,55 ± 0,51*	3,14 ± 0,52	3,12 ± 0,68	4,17 ± 1,49	4,76 ± 1,54
<b>ML</b>	5,56 ± 1,02	4,58 ± 0,96	5,71 ± 0,98	5,50 ± 1,17	7,63 ± 2,56	8,55 ± 2,11
<b>SL</b>	2,26 ± 0,43	1,86 ± 0,40	2,29 ± 0,41	2,24 ± 0,50	3,06 ± 0,98	3,40 ± 0,78
<b>LCR</b>	1,48 ± 0,30	1,29 ± 0,30	1,64 ± 0,28	1,57 ± 0,34	2,12 ± 0,76	2,51 ± 0,79
<b>DCL</b>	4,95 ± 0,90	4,11 ± 0,90	5,06 ± 0,91	4,90 ± 1,11	6,71 ± 2,43	7,76 ± 1,98

Los valores en milímetros factorizados por el peso, están expresados como media ± SEM. El asterisco indica diferencia significativa respecto de su correspondiente control. (a) valores en milímetros no factorizados.

En cuanto al dimorfismo sexual de la morfometría craneal, observamos que el ancho mínimo interorbital (IOW) difiere significativamente entre los machos ( $0,10 \pm 0,01$ ) y las hembras ( $0,13 \pm 0,03$ ) que fueron tratadas con ATZ, presentando éstas últimas una mayor distancia entre las órbitas de los ojos (Mann Whitney  $p= 0,0047$ ).

#### **4.8- Perfil hematológico, inmunológico y analitos químicos de la sangre periférica.**

La tabla 18 muestra los valores de los perfiles hematológicos y bioquímicos de *C. latirostris*. Tal como se detalla en Materiales y Métodos (3.14), se realizó una distribución de frecuencia con todos los pesos registrados, que permitió establecer el valor de la media que separa a las dos poblaciones de datos, en base a este valor, los animales fueron divididos en dos subpoblaciones o categorías, las que se diferencian entre sí por rangos de pesos: 125-900 g ( $n = 15$ ) y 901-3100g ( $n = 11$ ).

**Tabla 18.** Valores hematológicos y bioquímicos para caimanes juveniles criados en condiciones controladas.

Parámetros	Peso corporal					
	125-900 g			901-3100 g		
	n <sup>a</sup>	Media ± SEM	Rango	n <sup>a</sup>	Media ± SEM	Rango
<i>General</i>						
Peso (g)	15	486,90 ± 62,66	126,00-878,00	11	1986,00 ± 184,90*	1103,00-3056,00
SVL (cm)	15	23,47 ± 0,99	16,00-29,50	11	39,41 ± 1,50*	31,50-48,00
LT (cm)	15	48,72 ± 2,05	32,00-62,50	11	80,93 ± 2,74*	65,75-95,00
Edad (meses)	15	7,53 ± 0,65	6,00-18,00	11	13,73 ± 0,69*	12,00-18,00
Sexo (Hembra: Macho)	15	7:8		11	4:7	
<i>Hematología</i>						
Glóbulos Rojos (x10 <sup>5</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	15	5,58 ± 0,17	4,40-6,70	9	7,27 ± 0,53*	5,18-9,15
Glóbulos Blancos (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	15	16,57 ± 2,12	5,52-39,33	9	25,61 ± 1,66*	19,75-34,75
Hematocrito (%)	15	22,74 ± 0,61	18,00-28,00	11	28,59 ± 1,17*	23,50-35,00
Hemoglobina (g/dL)	8	7,07 ± 0,21	6,14-8,15	9	8,51 ± 0,42*	7,21-10,84
Linfocito (%)	15	58,35 ± 2,04	45,13-74,26	11	62,73 ± 2,50	50,00-81,68
Heterófilo (%)	15	30,54 ± 2,03	17,07-47,06	11	24,48 ± 2,27	9,42-34,38
Eosinófilo (%)	15	2,24 ± 0,32	0,83-5,69	11	3,52 ± 0,50*	1,31-6,25
Basófilo (%)	15	4,85 ± 0,66	0,99-12,20	11	4,25 ± 0,84	0,91-10,00
Monocito (%)	15	4,01 ± 0,58	0,80-8,00	11	5,02 ± 0,76	1,20-9,33
Relación limfocito:heterófilo	15	2,09 ± 0,20	1,00-3,57	11	3,05 ± 0,60	1,45-8,67
Trombocito (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	2	26,81 ± 4,12	22,69-30,94	9	28,00 ± 1,72	20,44-38,25
Eritrocitos policromáticos (%)	15	2,38 ± 0,26	0,53-4,15	11	1,36 ± 0,19*	0,51-2,69
MCV(μm <sup>3</sup> )	8	388,90 ± 9,76	346,20-445,20	9	404,10 ± 15,67	335,30-478,90
MCH (pg)	8	124,60 ± 3,94	111,20-144,40	9	119,70 ± 6,24	96,51-153,10
MCHC (g/dL)	8	32,17 ± 1,15	28,01-37,04	9	29,53 ± 0,58	27,33-31,96
<i>Analitos clínicos</i>						
Glucosa (g/L)		-		9	1,24 ± 0,07	0,78-1,51
Proteínas totales (g/dL)		-		9	4,76 ± 0,12	4,24-5,26
Albumina (g/dL)		-		9	2,38 ± 0,05	2,07-2,62
Globulina (g/dL)		-		9	2,38 ± 0,08	2,10-2,75
Relación albumina:globulina		-		9	1,01 ± 0,03	0,91-1,17
Ácido úrico (mg/dL)		-		9	3,63 ± 0,49	2,37-6,59
Creatinina (mg/dL)		-		9	0,41 ± 0,05	0,20-0,62
Bilirrubina total (mg/dL)		-		9	0,11 ± 0,01	0,10-0,16

Colesterol (mg/dL)	-	9	159,40 ± 11,50	118,00-217,00
Triglicéridos (mg/dL)	-	8	15,25 ± 1,36	8,00-19,00
Urea (g/L)	-	9	0,02 ± 0,002	0,01-0,03
<i>Enzimas</i>				
Fosfatasa alcalina (mU/mL)	-	9	25,44 ± 1,94	17,40-35,00
Alanina aminotransferasa (IU/L)	-	9	69,44 ± 6,28	45,00-97,00
Aspartato aminotransferasa (IU/L)	-	9	116,20 ± 9,51	73,00-168,00
Lactato dehidrogenasa (IU/L)	-	9	1,085,00 ± 156,00	569,00-1,881,00
Creatinkinasa (IU/L)	-	9	4,213,00 ± 970,30	1,487,00-10,290,00

(a) El número de individuos puede diferir entre las variables analizadas, ya que no todos los parámetros se evaluaron para cada caimán. El asterisco indica diferencia significativa, (test Wilcoxon,  $p < 0,05$ ), (-): no determinado, MCV: Volumen corpuscular medio, MCH: Hemoglobina corpuscular media, MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

Para aquellas variables que mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los rangos de peso propuestos, se calcularon los valores de referencia según Oliveira-Júnior y col (2009): los valores de referencia fueron establecidos en base a los intervalos de confianza, los cuales se esquematizan en la Tabla 19.

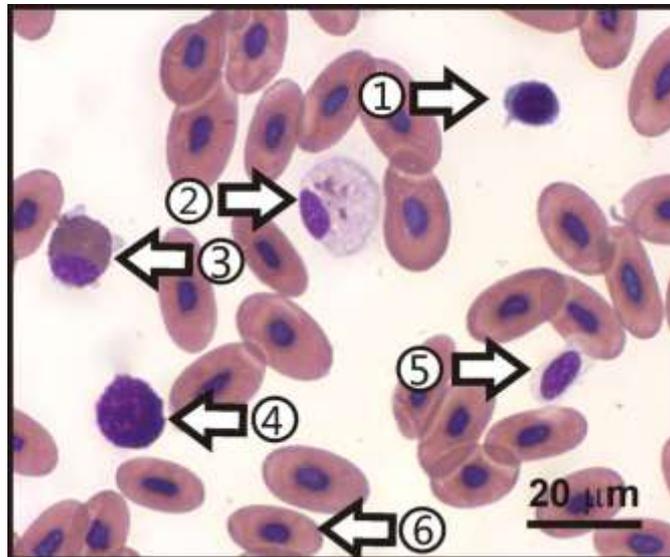
**Tabla 19.** Valores de referencia para *C latirostris* juveniles controles criados en condiciones controladas.

Parámetros	Peso corporal			
	125-900g		901-3100g	
	Nº	Intervalo de referencia sugerido (IC 95% de la media)	Nº	Intervalo de referencia sugerido (IC 95% de la media)
<i>General</i>				
SVL (cm)	15	21,3 – 25,6	11	36,1 – 42,8
LT (cm)	15	44,3 – 53,1	11	74,8 – 87,0
<i>Hematología</i>				
Glóbulos Rojos ( $\times 10^5$ cel/mm <sup>3</sup> )	15	5,2 – 5,9	9	6,1 – 8,5
Glóbulos Blancos ( $\times 10^3$ cel/mm <sup>3</sup> )	15	12,0 – 21,0	9	22,0 – 30,0
Hematocrito (%)	15	21,4 – 24,1	11	26,0 – 31,2
Hemoglobina (g/dL)	8	6,6 – 7,5	9	7,5 – 9,5

(a) número de observaciones, puede variar debido a que no todos los parámetros fueron evaluados para cada yacaré overo. (-): sin determinación.

#### 4.8.1- Recuentos celulares.

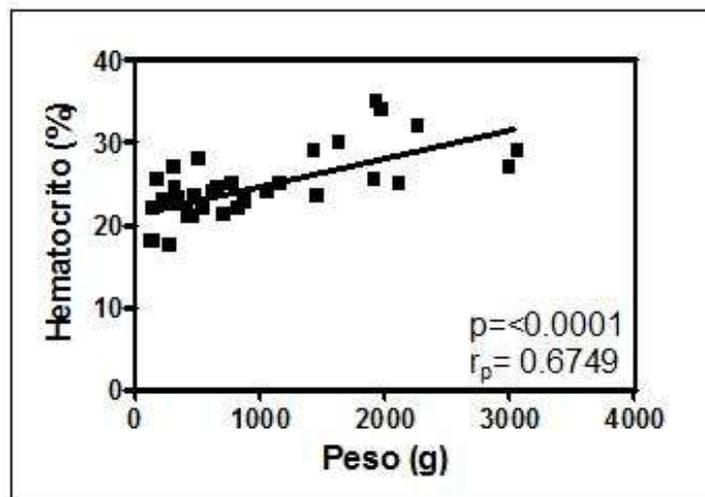
El valor promedio de **eritrocitos** fue de  $5,58 \pm 0,68$  y  $7,27 \pm 0,16 \times 10^5/\text{mm}^3$  de sangre periférica, para las clases 125-900g y 901-3100g, respectivamente. El recuento de **leucocitos** fue de  $16,57 \pm 8,21$  y  $25,61 \pm 4,98 \times 10^3/\text{mm}^3$  para la clase 125-900g y 901-3100g, respectivamente, y fueron clasificados como: heterófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos (Figura 61 y Tabla 18). Se observó una asociación positiva entre el recuento total de leucocitos y el peso corporal de los caimanes juveniles (Pearson  $r: 0,61$ ,  $p = 0,0002$ ). Los **linfocitos**, como se muestra en la Tabla 18, fueron los más numerosos en el recuento diferencial de leucocitos, seguido por los heterófilos, basófilos, monocitos y eosinófilos. Los **eosinófilos** fueron los elementos de menor proporción en los frotis de sangre periférica de *C. latirostris* (Tabla 18). El promedio de **trombocitos** fue de  $26,81 \pm 5,83$  y  $28,00 \pm 5,17 \times 10^3/\text{mm}^3$  para la clase 125-900g y 901-3100g, respectivamente. No se encontró correlación entre el recuento de trombocitos y el peso corporal de los caimanes.



**Figura 61.** Leucocitos en sangre periférica de *C. latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa. Los leucocitos fueron clasificados como: 1) linfocitos; 2) heterófilos; 3) eosinófilos; 4) basófilos y monocitos. En la imagen correspondiente a un campo ocular de un frotis, no se observaron monocitos debido a su bajo porcentaje en la fórmula leucocitaria. Además de los leucocitos en un frotis de sangre periférica encontramos trombocitos (5) y eritrocitos (6).

Como se deduce de los valores de los recuentos celulares, los animales pertenecientes al grupo de mayor peso corporal poseen un mayor número de glóbulos rojos y glóbulos blancos, además de mayor hematocrito y hemoglobina que los de menor peso (clase 125-900g).

Se pudo observar que existe una correlación positiva entre el hematocrito y los pesos de los caimanes juveniles (Figura 62).

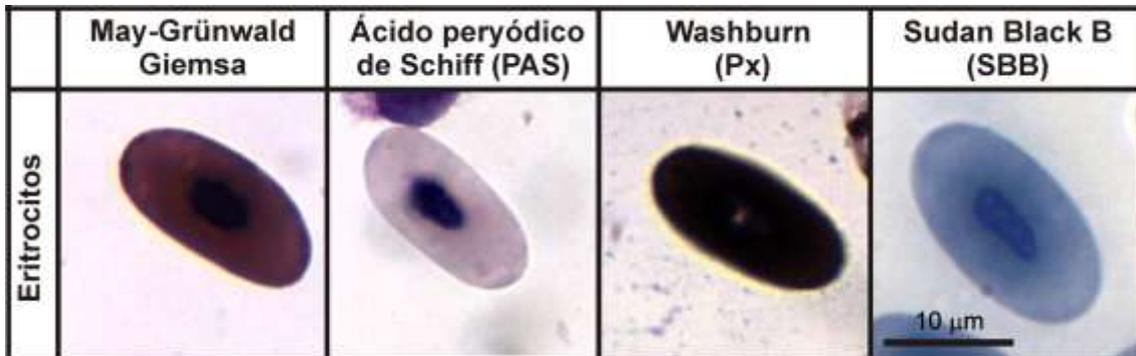


**Figura 62.** Correlación entre el hematocrito y el peso de los caimanes juveniles (test Pearson  $r_p$ )

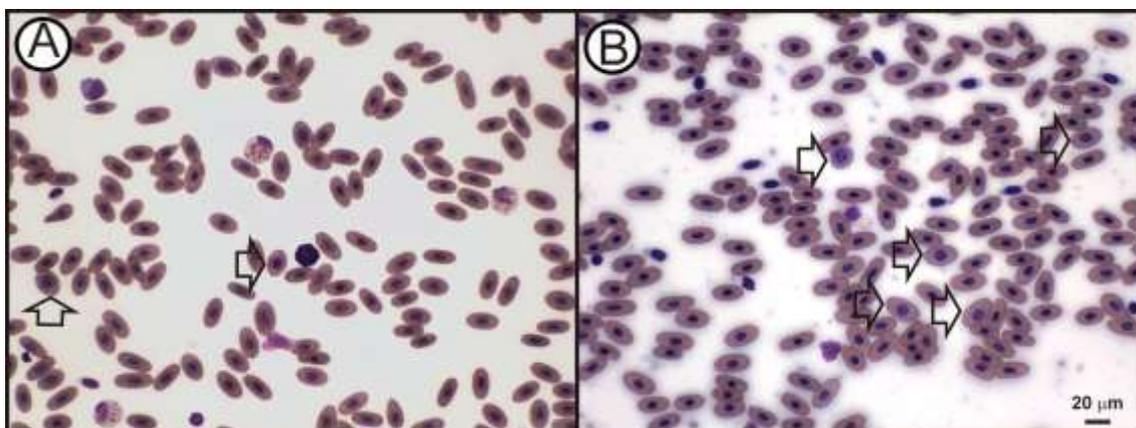
#### 4.8.2- Morfología, dimensiones y citoquímica de las células sanguíneas

Los **eritrocitos** (Figura 63), se encontraron como células elipsoidales, con núcleos centrales, ovalados o redondos con cromatina condensada en forma de manchas oscuras. Pocos eritrocitos mostraron un núcleo excéntrico. El citoplasma se tiñe uniformemente de color rojo-anaranjado a rojo ladrillo con May-Grünwal Giemsa. Los eritrocitos inmaduros representaron el 2,38% para la clase 125-900g y 1,36% en la 901-3100g, de la población globular total (Tabla 18). Esta proporción de eritrocitos inmaduros pueden ser utilizados como indicadores de la actividad eritropoyética, pudiendo ser mayor en edades tempranas o por un aumento de las respuestas compensatorias a procesos de anemia (Figura 64).

Los eritrocitos fueron negativos para el PAS, el SBB, y positivos para Px (Figura 63 y Tabla 20).

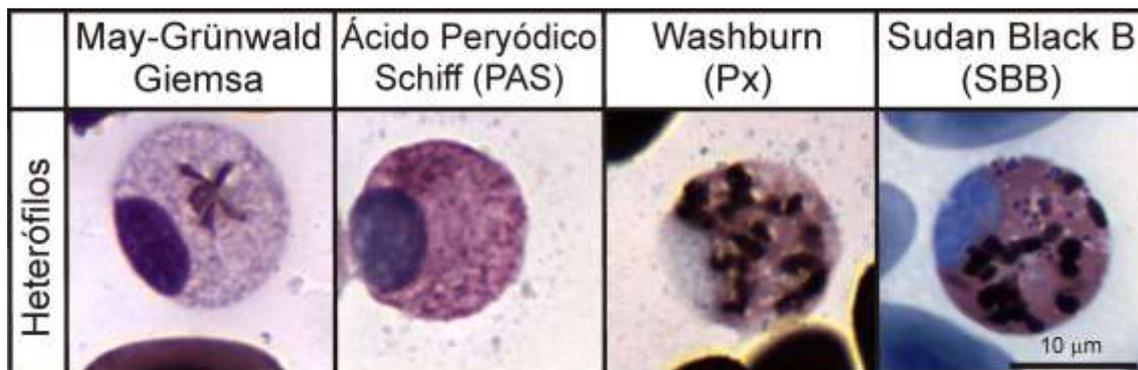


**Figura 63.** Patrón de tinción de los eritrocitos que componen la sangre periférica de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa, presentando un núcleo completo y con cromatina condensada como se observa en la imagen. La tinción con PAS y SBB mostraron resultados negativos. La presencia de Px fue positiva, adquiriendo el citoplasma una coloración marrón oscura que denota alta concentración de Px.



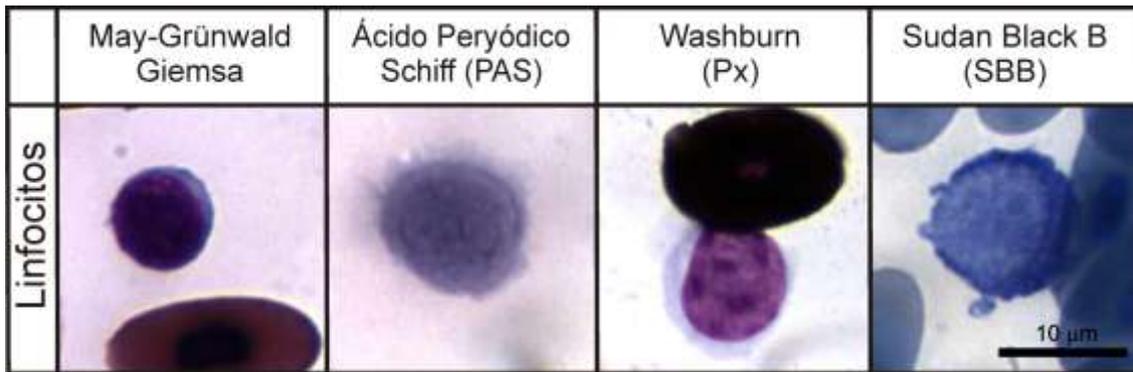
**Figura 64.** Eritrocitos inmaduros. En A) se observa un frotis correspondiente a un yacaré overo sano de la clase 901-3100g con un porcentaje de eritrocitos inmaduros de 1,33%. En B) se observa un frotis correspondiente a un yacaré overo de la misma clase con un porcentaje elevado de eritrocitos inmaduros (2,84%). Asociado con este resultado, este animal en particular presentó un valor bajo de hemoglobina y de volumen corpuscular medio y un hematocrito elevado. Estos resultados nos indican que este yacaré overo presenta una elevada actividad eritropoyética.

Los **heterófilos** (Figura 65), por lo general, fueron células redondas u ovals, con abundantes gránulos citoplasmáticos en forma de huso o estrella. El núcleo es lenticular, oval y raramente bilobulado, de posición excéntrica, con cromatina densamente condensada. Los heterófilos fueron positivos en las reacciones citoquímicas con PAS, SBB y Px (Tabla 20). En la Figura 65 se ilustra el patrón de tinción en los heterófilos.



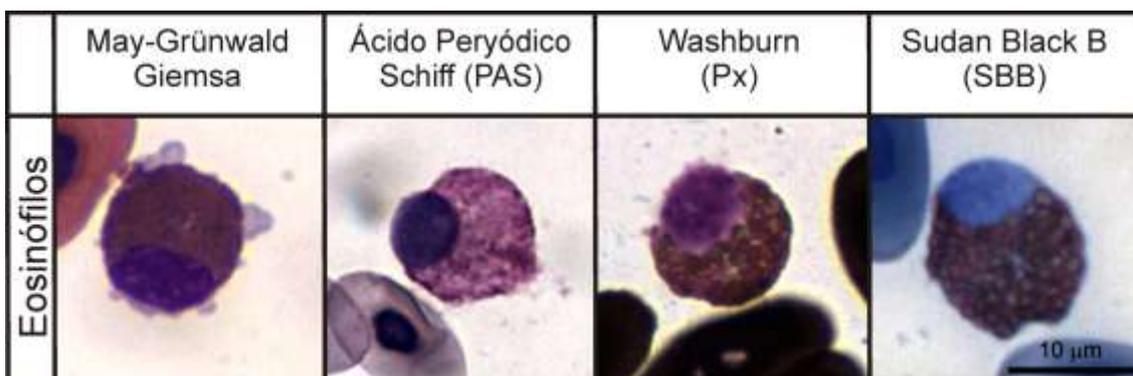
**Figura 65.** Patrón de tinción de los heterófilos de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa: en la imagen se observan los gránulos citoplasmáticos en forma de huso o estrella y el núcleo de forma lenticular excéntrico. Los carbohidratos se tiñeron con PAS, mostrando una positividad de color rojiza. Mediante el método de Washburn se demostró la presencia de peroxidasa en los gránulos citoplasmáticos, los cuales se tiñeron de color marrón oscuro (+) (en la porción inferior de la imagen se observa un linfocito con una alta marcación de Px). Los lípidos también mostraron su positividad a través de la coloración marrón oscura de los gránulos citoplasmáticos mediante la utilización de la tinción con Sudán Black B.

Los **linfocitos** son las células más pequeñas en la sangre periférica de *C. latirostris* (Tabla 21) y presenta un núcleo redondo bien definido (Figura 66). Normalmente, los linfocitos muestran una gran relación núcleo: citoplasma. La cromatina se encuentra condensada en gran medida. El escaso citoplasma es típicamente basófilo. Los linfocitos fueron negativos para las reacciones citoquímicas realizadas (Figura 66 y Tabla 20).



**Figura 66.** Patrón de tinción de los linfocitos que componen la sangre periférica de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa, en la imagen se puede observar el pequeño citoplasma basófilo. Los linfocitos mostraron negatividad para los carbohidratos, peroxidasa y lípidos. En la imagen correspondiente al método de Washburn se observa en la parte superior un eritrocito positivo y debajo de éste un linfocito negativo.

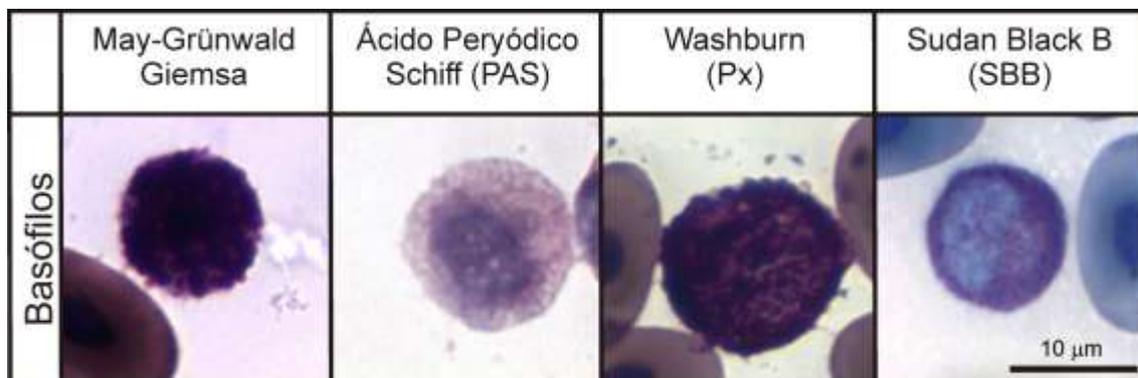
Los **eosinófilos** son células ovaladas o redondas, con abundantes gránulos eosinófilos esféricos. El núcleo teñido de púrpura, que generalmente se encuentra en un polo de la célula y causa una ligera protuberancia hacia afuera del contorno de la célula (Figura 67). Los eosinófilos resultaron positivos con Px y moderadamente positivos con PAS y SBB (Figura 67 y Tabla 20).



**Figura 67.** Patrón de tinción de los eosinófilos que componen la sangre periférica de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa donde se observa el núcleo excéntrico y los gránulos citoplasmáticos característicos de esta célula. El citoplasma presentó una coloración rojiza (+) cuando se tiñeron con PAS, evidenciando la presencia de carbohidratos. Los gránulos del citoplasma fueron levemente positivos para la peroxidasa, observándose en la parte inferior de la misma imagen un linfocito positivo, esta determinación fue realizada siguiendo el método de Washburn. Estos gránulos

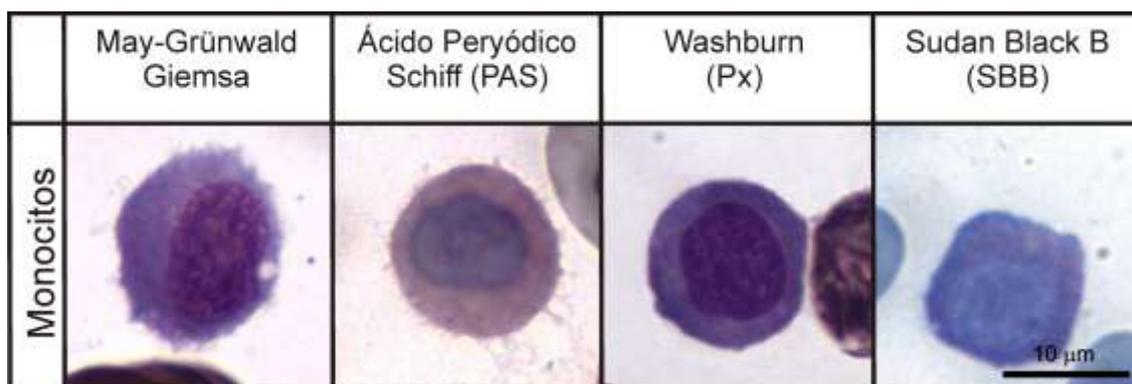
también mostraron una leve positividad para los lípidos, cuya presencia fue demostrada por la tinción con Sudán Black B.

Los **basófilos** (Figura 68) son redondos, y contienen un denso núcleo de color azul violeta, generalmente excéntrico, que presenta la cromatina condensada. El citoplasma mostró numerosos gránulos grandes basófilos que a menudo oscurecen el núcleo. Cuando fue visible el núcleo de la célula, éste se encontraba excéntrico y no lobulado. Los basófilos fueron negativos para todas las pruebas citoquímicas ensayadas (Figura 68 y Tabla 20).



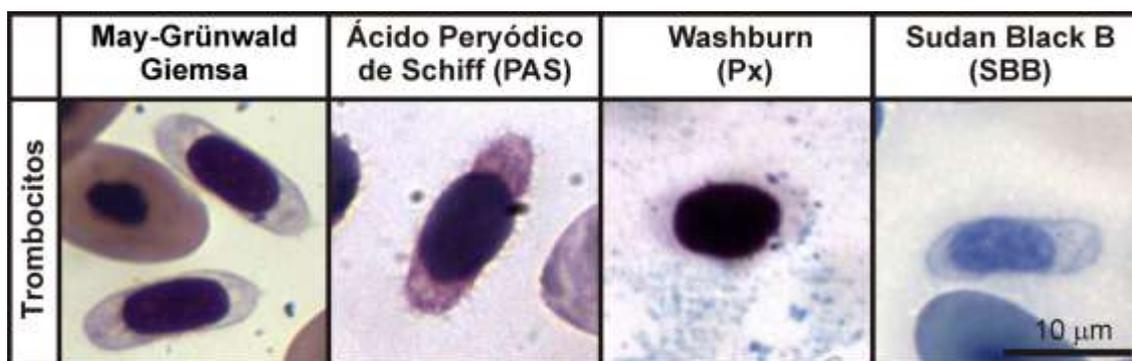
**Figura 68.** Patrón de tinción de los basófilos que componen la sangre periférica de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa y en la imagen se observa que el citoplasma presenta numerosos gránulos grandes y basófilos que a menudo oscurecen el núcleo. Los basófilos fueron negativos para la determinación de carbohidratos, peroxidasa y lípidos.

Los **monocitos** se presentaron como el elemento más grande de los leucocitos en *C. latirostris* (Tabla 19), variando desde la forma redonda a ameboide (Figura 69). El núcleo excéntrico presentó formas variables, desde redondas u ovals a lobuladas. La cromatina nuclear se condensa en menor grado, que en los núcleos de los linfocitos. El citoplasma, abundante y basófilo, puede contener vacuolas brillantes y mostrar numerosas proyecciones citoplasmáticas. Los monocitos fueron negativos para el PAS, SBB y Px (Figura 69 y Tabla 20).



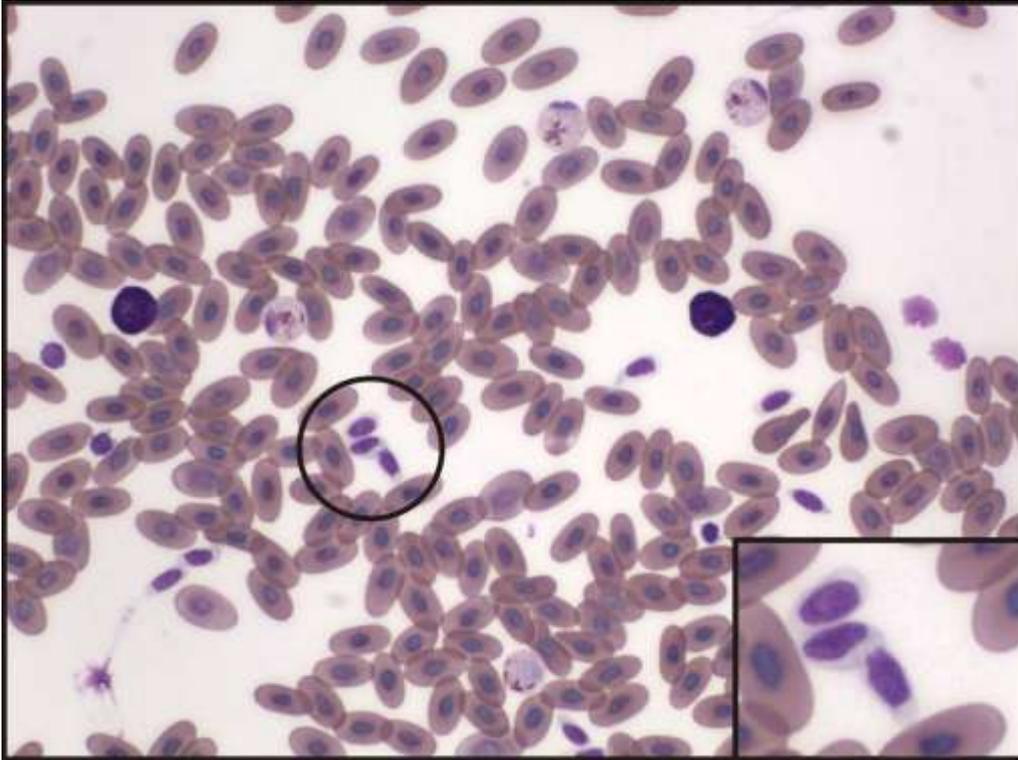
**Figura 69.** Patrón de tinción de los monocitos que componen la sangre periférica en *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa. Los carbohidratos se tiñeron con PAS, peroxidasa se demostró por el método de Washburn, y la presencia de lípidos fue demostrada por la tinción con Sudán Black B. Se utilizó sangre humana para el control positivo de cada citoquímica.

Los **trombocitos** (Figura 70) se observan como células nucleadas de forma ovalada a elíptica. El núcleo, también de forma oval, se encuentra generalmente en posición central, teñido de color azul-violeta intenso y con su cromatina condensada. El escaso citoplasma se encuentra acumulado en los dos polos de la célula oval. Cuando la célula adquiere forma redonda, el citoplasma forma un halo delgado alrededor del núcleo, lo que dificulta la distinción entre trombocitos y linfocitos.



**Figura 70.** Patrón de tinción de los trombocitos que componen la sangre periférica de *Caiman latirostris*. Las características generales fueron descritas mediante el uso de May-Grünwald Giemsa en la imagen se puede observar la disposición en los polos del citoplasma. El citoplasma presentó positividad para los carbohidratos, adquiriendo la coloración rojiza característica de las células PAS positivas. Fueron negativas las citoquímicas para determinación de peroxidasa (PX) y lípidos (SBB).

Si bien los trombocitos se observaron principalmente aislados, se encontraron pequeños grupos (clusters) de trombocitos multicelulares en frotis de sangre periférica teñidos con May-Grünwald Giemsa (Figura 71).



**Figura 71.** Clusters de trombocitos. En algunos frotis de sangre periférica de *C. latirostris* se pudo observar grupos de trombocitos (cluster). En el inset se pueden observar a mayor aumento la agrupación de los trombocitos.

En la Tabla 20 se resumen los resultados obtenidos de la caracterización citoquímica de la sangre periférica de *C. latirostris* criados en condiciones controladas.

**Tabla 20.** Caracterización citoquímica de las células de sangre periférica de *Caiman latirostris* juveniles criados en condiciones controladas.

Célula	Tinción		
	PAS	SBB	Px
Eritrocito	-	-	+
Heterófilo	+	+	+
Linfocito	-	-	-
Eosinófilo	±	±	+
Basófilo	-	-	-
Monocito	-	-	-
Trombocito	+	-	-

PAS: Periodic Acid-Schiff; SBB: Sudan Black B; Px: peroxidasa,

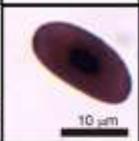
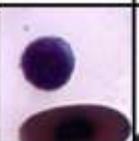
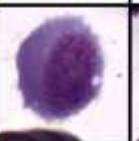
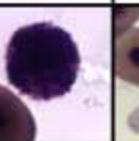
(+):positivo intenso, (±):débilmente positivo, (-): negativo,

(a) los animales fueron criados en condiciones controladas

Como se muestra en las Figuras 61 a 71 y en la Tabla 20, las tinciones citoquímicas son una herramienta útil para profundizar en la caracterización de la morfología celular y permite establecer la localización topográfica de diferentes sustancias (lípidos, carbohidratos, etc). A partir de los resultados de las diferentes tinciones podemos distinguir con mayor precisión, mediante una tinción con PAS, los trombocitos positivos, de los linfocitos negativos

En la Tabla 21 se presentan los valores determinados de diámetro, área y perímetro para cada población celular de sangre periférica.

**Tabla 21.** Dimensiones de las células de sangre periférica en caimanes juveniles criados en condiciones controladas.

	Eritrocito	Linfocito	Monocito	Heterófilo	Eosinófilo	Basófilo	Trombocito
							
DMC (µm)	17,3 ± 1,4	7,6 ± 0,9	13,9 ± 1,6	13,7 ± 1,7	14,9 ± 1,7	12,3 ± 1,1	12,0 ± 1,3
DMN (µm)	5,0 ± 0,6	5,8 ± 0,6	8,2 ± 1,5	7,3 ± 1,8	7,8 ± 1,1	s/d	8,1 ± 0,9
Área (µm <sup>2</sup> )	133,6 ± 21,8	52,6 ± 14,3	169,4 ± 31,2	157,2 ± 18,0	119,3 ± 19,3	130,2 ± 20,4	60,4 ± 9,4
Perímetro (µm)	44,5 ± 4,0	26,4 ± 3,9	48,5 ± 5,2	45,8 ± 2,7	39,6 ± 3,2	41,6 ± 3,7	33,2 ± 3,1

Se cuantificaron un total de 100 células en frotis de sangre periférica teñidos con May-Grünwald Giemsa. Los valores expresan la media ± SEM. DMC: Diámetro máximo del citoplasma; DMN: Diámetro máximo del núcleo; Área y Perímetro de la célula; (s/d): sin determinación, debido a que los gránulos enmascaran el núcleo.

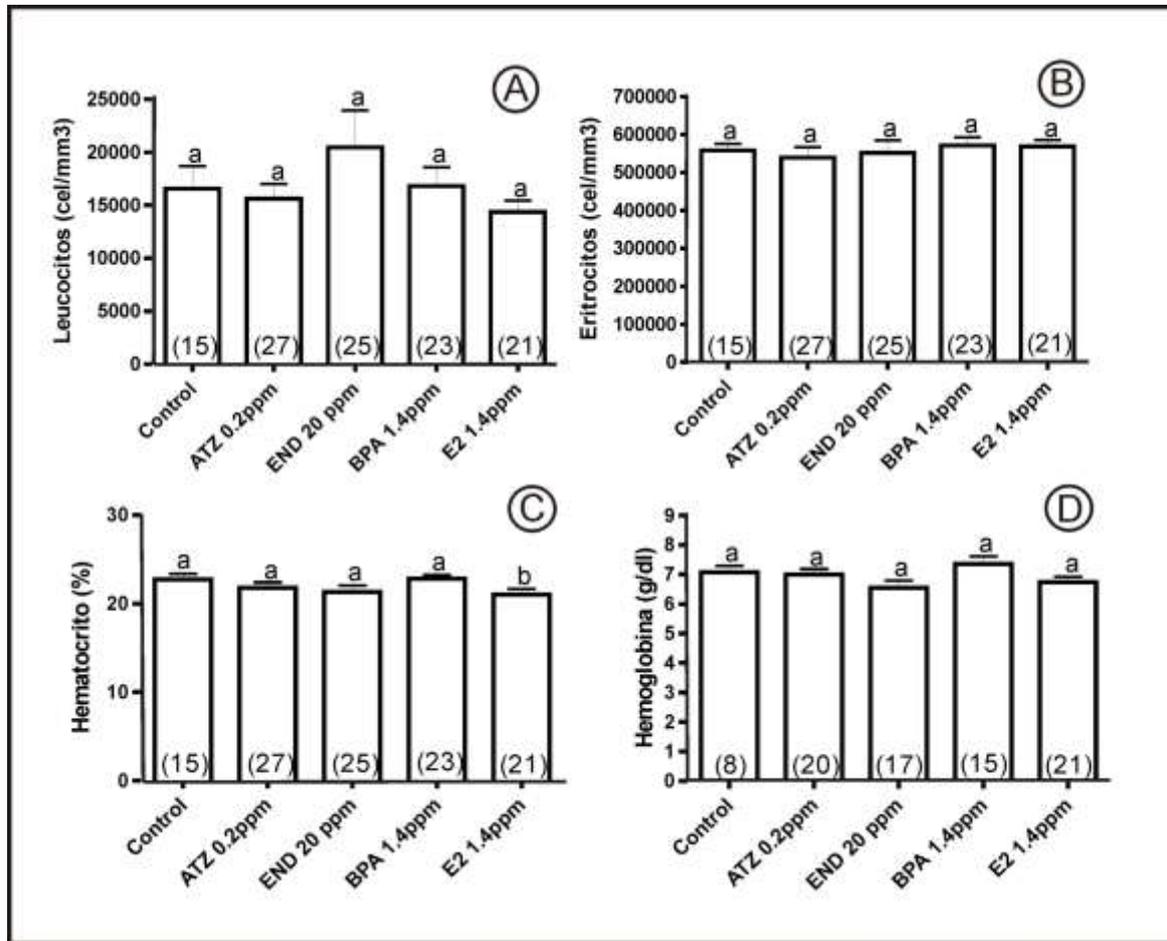
#### 4.8.3- E2 Y ATZ provocan alteraciones en el número de GR y GB.

En base a estos valores de referencia, evaluamos el efecto de E2 y de los compuestos agroindustriales utilizados en este experimento.

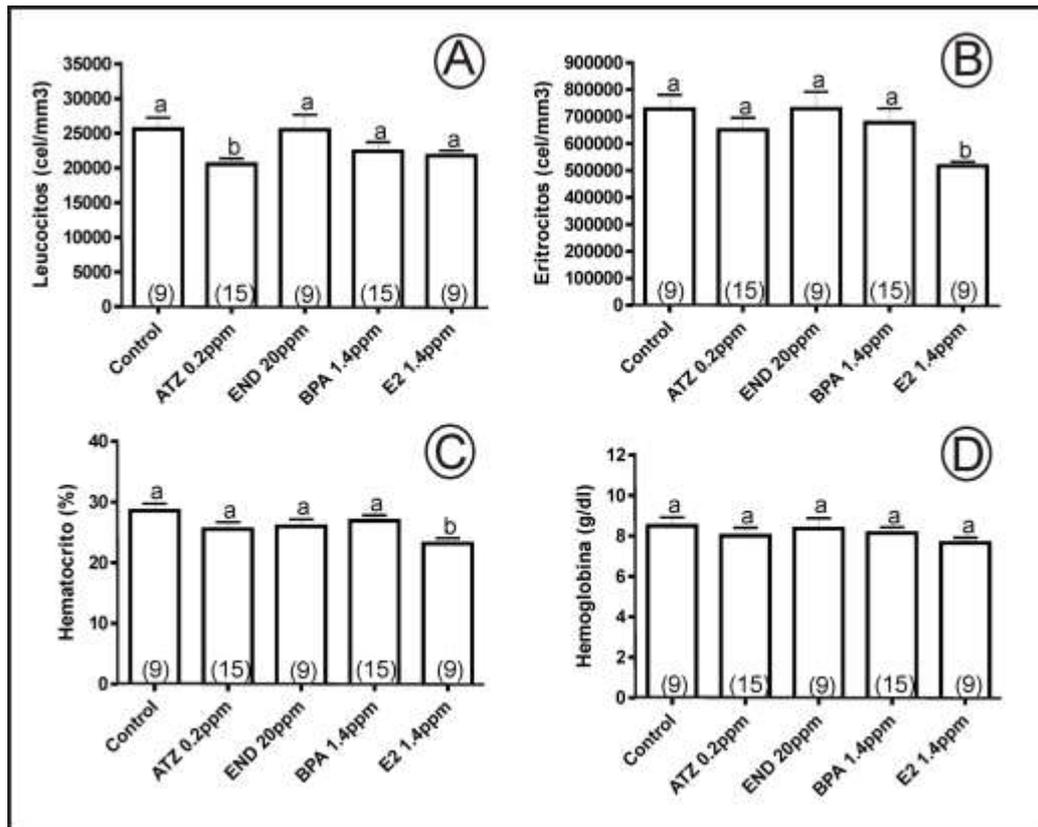
Para la clase 125-900g, los animales tratados con E<sub>2</sub> (1,4ppm), presentaron una disminución en el valor del hematocrito con respecto a los animales controles, criados bajo las mismas condiciones. (Figura 72C). Los compuestos agroindustriales en las dosis usadas no causaron alteraciones en los valores de glóbulos rojos, blancos, hematocrito y hemoglobina con respecto a las establecidas para los animales controles dentro de esta clase.

Para los animales tratados cuyos pesos corporales se encontraban entre 901-3100g, pudimos observar que aquellos animales tratados con ATZ

presentaron una disminución de leucocitos (Figura 73A), mientras que los animales tratados con E<sub>2</sub> (1,4ppm) presentaron niveles disminuidos de eritrocitos y hematocrito (Figura 73B, C).



**Figura 72.** Efecto de los compuestos agroindustriales sobre las variables hematológicas en yacaré overos cuyos pesos corporales se encontraban entre 125-900g. Los tratamientos no afectaron el número de leucocitos (A), eritrocitos (B) y contenido de hemoglobina (D). El porcentaje de hematocrito (C) fue disminuido en los animales tratados con E<sub>2</sub> 1,4ppm con respecto a los controles (Mann Whitney  $p = 0,0368$ ).



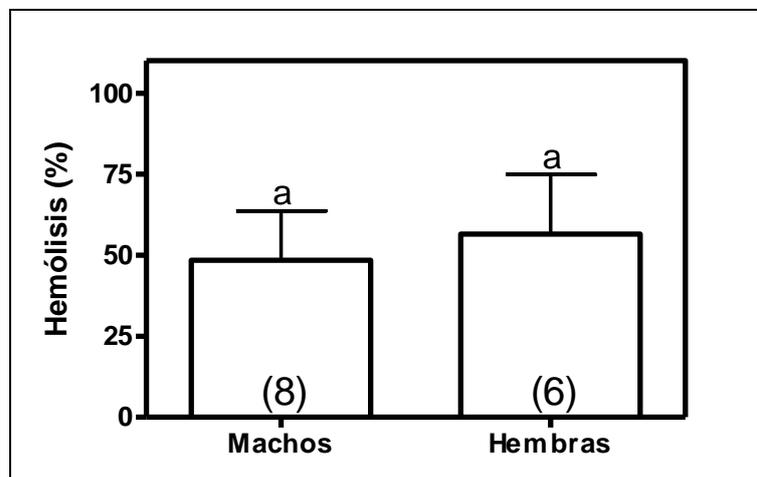
**Figura 73.** Efecto de los compuestos agroindustriales sobre las variables hematológicas en yacarés overos cuyos pesos corporales se encontraban entre 901-3100g. A- Los yacarés overos topcados con ATZ 0,2ppm presentaron disminuidos los valores de leucocitos (Mann Whitney  $p=0,0113$ ), el resto de los tratamientos no afectó este recuento. B-El número de eritrocitos se encontró disminuido en los animales tratados con E2 1,4ppm (Mann Whitney  $p=0,0040$ ), asociado a esta disminución de eritrocitos, estos caimanes presentaron disminución en el hematocrito (C-Mann Whitney  $p=0,0044$ ). La ATZ, END, BPA no afectaron los valores de eritrocitos y hematocrito. D-La hemoglobina no fue afectada por los tratamientos aplicados.

#### 4.8.4- Inmunidad innata humoral.

Se evaluó la **inmunidad innata humoral** en sueros de caimanes mediante el método descrito por Merchant y col., (2006) que se basa en la lisis mediada por complemento, de eritrocitos de oveja (SRBCs).

Previo a la utilización de las muestras de yacaré overo, se establecieron las condiciones del ensayo. Como resultado de los ensayos de optimización, pudimos establecer que los parámetros óptimos para el ensayo de inmunidad innata humoral para *C. latirostris* son 20 minutos de reacción a 37°C con una solución al 40% de suero de yacaré overo en solución fisiológica.

La inmunidad innata humoral se evaluó inicialmente en 14 caimanes controles (8 machos y 6 hembras) de 12 y 24 meses de edad, cuyos pesos corporales van desde 771 g a 3160 g. Como se muestra en la Figura 74, la actividad hemolítica de los sueros de los caimanes no fue influenciada por el género. Las hembras controles mostraron un 56,5% de hemólisis máxima (Tabla 22), mientras que los machos un 48,5% de actividad máxima, Dado que no se encontraron diferencias entre machos y hembras controles, una mezcla de sueros de ambos sexos se utilizó para calcular el valor de CH50. El valor extrapolado de la CH50 fue de 7,1%.



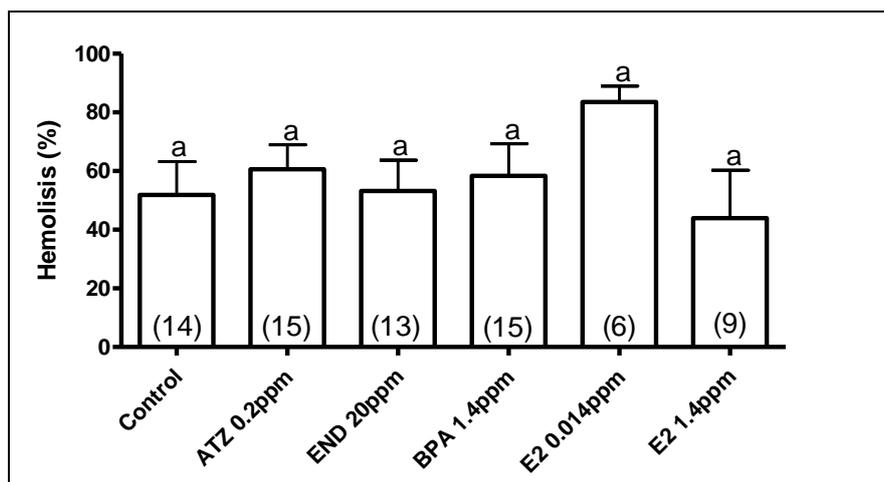
**Figura 74,** Inmunidad innata humoral en caimanes juveniles. La inmunidad innata humoral fue evaluada por la actividad hemolítica del suero de *C. latirostris*, y no se observaron diferencias entre machos y hembras. (N) representa el número de animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas respecto del control (test: Mann Whitney,  $p < 0,05$ ).

Luego de establecer los porcentajes de hemólisis para los animales controles se procedió a realizar los ensayos con los sueros de los animales sometidos a los diferentes tratamientos *in ovo*. No se encontraron alteraciones (Figura 75) en los porcentajes de hemólisis de los animales tratados con los diferentes contaminantes evaluados en este experimento (Tabla 22)

**Tabla 22.** Evaluación de la inmunidad innata humoral en yacarés overos juveniles criados en condiciones controladas.

	Machos <sup>(1)</sup>	Hembras <sup>(1)</sup>	Machos + Hembras <sup>(1)</sup>
Control	48,4 ± 42,9	56,5 ± 45,2	51,9 ± 42,4
ATZ 0,2ppm	54,3 ± 39,2	66,1 ± 26,2	60,6 ± 32,2
END 20ppm	48,7 ± 38,0	58,6 ± 40,4	53,2 ± 37,8
BPA 1,4ppm	33,2 ± 37,4	80,5 ± 33,9	58,4 ± 42,0
E2 0,014ppm	77,3 ± 3,3	89,8 ± 17,8	83,6 ± 13,3
E2 1,4ppm	s/d	40,7 ± 46,6	43,9 ± 49,0

<sup>(1)</sup> Los valores representan el % del valor establecido con el control de 100% de hemólisis y fueron expresados como Media ± SD, (s/d) sin datos.



**Figura 75.** Actividad inmune innata. Porcentaje de hemólisis para los diferentes tratamientos aplicados *in ovo*.

#### 4.8.5- Química de la sangre.

En las muestras de suero se determinaron los niveles séricos de analitos clínicos para el grupo control y cada uno de los grupos correspondientes a los diferentes tratamientos *in ovo* (Tabla 23).

**Tabla 23.** Niveles séricos de analitos clínicos y enzimas en animales controles o expuestos *in ovo* a ATZ, END, BPA o E2 (Peso corporal: 901-3100g).

	Control		ATZ 0,2ppm	END 20ppm	BPA 1,4ppm	E2 0,014ppm
<b>Analitos clínicos</b>	n= 9		n=19	n=20	n=19	n=6
	Media ± SEM	Rango	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM
<b>Glucosa (g/L)</b>	1,24 ± 0,07	0,78- 1,51	1,41 ± 0,16	1,31 ± 0,14	1,29 ± 0,14	1,04 ± 0,05
<b>Proteínas totales (g/dL)</b>	4,76 ± 0,12	4,24- 5,26	5,37 ± 0,48	5,37 ± 0,48	5,63 ± 0,44	5,03 ± 0,18
<b>Albúmina (g/dL)</b>	2,38 ± 0,05	2,07- 2,62	2,43 ± 0,11	2,25 ± 0,15	2,55 ± 0,11	2,49 ± 0,06
<b>Globulinas (g/dL)</b>	2,38 ± 0,08	2,10- 2,75	2,94 ± 0,38	3,12 ± 0,47	3,08 ± 0,35	2,55 ± 0,13
<b>Ácido Úrico (mg/dL)</b>	3,63 ± 0,49	2,37- 6,59	3,18 ± 0,23	3,20 ± 0,30	3,47 ± 0,38	4,76 ± 0,53
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,41 ± 0,05	0,20- 0,62	0,46 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,44 ± 0,06
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	0,11 ± 0,01	0,10- 0,16	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,01
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	159,40 ± 11,50	118,00- 217,00	139,50 ± 9,62	135,30 ± 9,84	141,80 ± 7,80	170,20 ± 19,60
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	15,25 ± 1,36	8,00- 19,00	154,50 ± 59,65	161,00 ± 51,47	158,80± 46,58	12,67 ± 1,90
<b>Urea (g/L)</b>	0,02 ± 0,002	0,01- 0,03	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,002
<b>Enzimas</b>						
<b>Fosfatasa alcalina (mU/mL)</b>	25,44 ± 1,94	17,40- 35,00	28,44 ± 3,12	40,07 ± 8,30	31,95 ± 3,48	35,68 ± 4,28
<b>Alanina aminotransferasa (IU/L)</b>	69,44 ± 6,28	45,00- 97,00	76,68 ± 7,10	73,75 ±7,30	74,00 ± 4,05	87,33 ± 8,11
<b>Aspartato aminotransferasa (IU/L)</b>	116,20 ± 9,51	73,00- 168,00	169,60 ± 20,76	175,20 ± 24,30	178,60 ± 21,13	102,50 ± 10,91
<b>Lactato dehidrogenasa (IU/L)</b>	1085,00 ± 156,00	569,00- 1,881,0 0	1053,00 ± 155,70	1041,00 ± 133,80	1300,00 ± 119,30	965,50 ± 112,00
<b>Creatinkinasa (IU/L)</b>	4213,00 ± 970,30	1,487,0- 10,290, 00	2514,00 ± 354,30	3952,0 ± 1036,00	5234,00 ± 1108,00	2114,00 ± 243,60

test: Mann Whitney, p <0,05

Como se puede observar en la Tabla 23, los niveles séricos de glucosa, urea, colesterol, ácido úrico, triglicéridos, creatinina, bilirrubina total, proteínas totales, albúmina y las globulinas y la actividad sérica de las enzimas fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), la creatina quinasa (CK) no fueron modificados por la exposición *in ovo* a ATZ, END, BPA o E2 (test: Mann Whitney,  $p < 0,05$ ), siendo similares a los valores obtenidos para las muestras de los animales del grupo control. Se observa una clara desviación de los valores de la media en los grupos tratados hacia la derecha, como en el caso de la aspartato aminotransferasa. Es evidente una alteración de la funcionalidad hepática y vía biliar.

# DISCUSIÓN

Una vasta cantidad de compuestos clasificados como PEs con actividad estrogénica y/o antiandrogénica han sido liberados al ambiente en las últimas décadas, principalmente bajo la forma de pesticidas de uso agrícola y químicos industriales (Danzo, 1998, Hayes y col., 2002, 2006, 2010). La mayoría de 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. En los últimos años, ha habido un incremento en las evidencias de perturbaciones endocrinas en animales silvestres (Bustnes y col., 2006; Keithmaleesatti y col., 2007; Cesh y col., 2010; Piazza y col., 2010; Zhou y col., 2011). A nivel local, se han realizado monitoreos de los niveles de compuestos organoclorados (COCs) en sedimentos y en algunos niveles tróficos de los ambientes costeros del sudoeste de Buenos Aires. Los sedimentos mostraron una contaminación de tipo estacional con elevadas concentraciones de COCs luego de lluvias y en los períodos de siembra (Menone y col., 2000, 2001 y 2006; Sagarrio y col., 2002; Arias y col., 2011). Otros trabajos realizados también en el ámbito local han demostrado la contaminación con OCPs en aves y anfibios del centro-oeste de Argentina (Cid y col., 2007, Jofre y col., 2008). Estos antecedentes ponen de relieve la necesidad del desarrollo de sistemas indicadores que valoren el riesgo de las poblaciones en contacto con PEs, permitiendo obtener señales de alerta sobre los posibles efectos nocivos en los ecosistemas. Estas señales de alerta serían útiles no sólo para la fauna silvestre, sino también para la población humana. En este sentido, nuestro propio grupo de investigación ha demostrado la presencia de elevadas concentraciones de residuos de COCs en el tejido adiposo del seno de mujeres de una zona urbana adyacente al sistema fluvial Paraná (Argentina). Estos niveles de COCs se asociaron al consumo de grasa vacuna y peces de agua dulce (Muñoz-de-Toro y col., 2006).

Los diversos organismos presentes en los ecosistemas acuáticos son potenciales organismos centinela. En este contexto, la selección y validación de biomarcadores en especies animales potencialmente útiles como centinelas es una estrategia válida para el diseño de sistemas que permitan evaluar los efectos de la contaminación ambiental por PE sobre la salud humana y del

ecosistema (Crews y col., 2000; Rey y col., 2006; Hayes y col., 2010). El yacaré overo, *Caiman latirostris*, es una de las dos especies de caimanes argentinos y está ampliamente distribuido en el noreste de nuestro país (Yanoski, 1990; Larriera, 1995). La investigación de los efectos de los PE en esta especie tiene especial interés ya que presenta aptitudes ecológicas y fisiológicas particulares que permiten considerarlo un potencial centinela de contaminación ambiental. En el desarrollo de la presente tesis se estudiaron distintos procesos fisiológicos del yacaré overo y diversos parámetros asociados, con el objetivo de evaluar su utilidad como biomarcadores de contaminación por exposición natural o experimental a diversos PEs presentes en el ambiente. Algunas de estas respuestas selectivas podrían ser útiles en sistemas de advertencia temprana y proveer indicios de potenciales efectos de los contaminantes sobre el ecosistema.

### **Exposición Natural.**

Nuestro primer objetivo fue evaluar la situación en la naturaleza, concretamente en el ambiente que rodea a *C. latirostris*, nuestra especie propuesta como centinela. En esta primera parte, a la que denominamos Exposición Natural, nos propusimos determinar a cuáles compuestos estaba expuesto *C. latirostris* en su habitat natural y la posible asociación entre los niveles de COCs presentes en los huevos y diversas variables ecológicas, características del huevo, de la cáscara y éxito reproductivo.

Los niveles de COCs en el contenido de los huevos son un valioso indicador de la contaminación de sus respectivos ecosistemas. En huevos no viables de *Crocodylus moreletii* provenientes de una laguna cercana a un río en Belice, Wu y col. (2000) determinaron que los principales contaminantes eran p,p-DDE y metoxicloro. En este trabajo los autores también detectaron lindano, aldrín, metoxicloro, epóxido de heptacloro y p,p-DDT en los sedimentos de la laguna. Este grupo de investigadores, en el año 2006, detectó nuevamente residuos de COCs en huevos de *Crocodylus moreletii* en el mismo lugar, pero con predominio de p,p-DDT, p,p-DDD, metoxicloro, aldrín y endosulfán I. Para cotejar los niveles de contaminación entre tres regiones [Isla Los Osos, Bahía

Winyah (Carolina del Sur, USA) y Refugio Rockefeller (Louisiana, USA)], Cobb y col. (2002) utilizaron la concentración de PCBs en huevos de *Alligator mississippiensis*. En la Bahía Winyah los autores pudieron determinar una elevada concentración de PCBs en los huevos de *A. mississippiensis* (3.176 ng/g), mientras que las concentraciones medias de PCBs en los huevos de la Isla de los Osos fueron menores y similares a las halladas en el Refugio de Vida Silvestre Rockefeller (333 ng/g y 218 ng/g, respectivamente). Los sistemas de salud ya habían alertado sobre la contaminación por hidrocarburos clorados en la cadena trófica y sedimentos en la Bahía Winyah desde el año 1993. Teniendo en cuenta estos trabajos, podemos afirmar que los niveles de COCs en huevos son una herramienta valiosa para caracterizar el grado de contaminación de una región y para establecer comparaciones entre distintas regiones cuando se utilizan parámetros reproducibles entre las mismas.

Por otro lado, Rauschenberger y col. (2004) comprobaron que los OCPs son transferidos por la madre durante el desarrollo del huevo: huevos de *A. mississippiensis* producidos por hembras contaminadas poseen mayores concentraciones de OCPs ( $12,814 \pm 813$  ng/g) que los producidos por hembras no contaminadas ( $38 \pm 4$  ng/g). En nuestro trabajo determinamos la identidad y concentración de COCs en huevos de *C. latirostris* por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Esta cuantificación de COCs se realizó en el contenido de huevos sin embrión, recolectados dentro de las 48 hs de su postura. Por lo tanto, consideramos que los COCs detectados en estos huevos llegan a los mismos por transferencia materna. De esta manera, los niveles de COCs serían un reflejo de la contaminación de la madre por la exposición al ambiente y su posterior bioacumulación.

En primer lugar, pudimos establecer que el pesticida endosulfán solo se halló presente en nidos provenientes de la zona de Entre Ríos. Generalmente se utiliza el mismo pesticida para maíz, soja, trigo, girasol y sorgo, lo que explica el elevado uso de END en una zona donde se acostumbra realizar la práctica de rotación de cultivos. Por otro lado, observamos que el oxiclordano y los compuestos de la familia del DDT fueron los compuestos COCs hallados en mayor concentración y frecuencia en los nidos de las tres regiones de muestreo

(Santa Fe, Entre Ríos y Chaco). Dentro de la familia de compuestos del DDT, el más abundante fue el DDE. La prevalencia del DDE y el oxiclordano puede deberse a que son los metabolitos más persistentes del DDT y clordano, respectivamente. Con respecto a la provincia de Chaco, debemos decir que es una provincia que se inició en el comercio del tanino y que luego fomentó el desarrollo algodonero, adoptando en una economía algodonera alrededor de 1916 hasta la actualidad. Debido a esta actividad agropecuaria, desde 1940 a 1970 se utilizó DDT como principal insecticida para combatir las plagas del algodón. En Argentina, el uso del clordano y DDT en el ganado fue prohibido en 1968 y 1969, respectivamente (SENASA - [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar)). Sin embargo, si bien estas restricciones fueron aplicadas para su uso en la ganadería y agricultura, estos compuestos seguían siendo detectados en insecticidas de uso doméstico, principalmente en aquellos destinados a exterminar termitas, alacranes, hormigas, arañas, etc. Por lo tanto, en el año 1998 se prohibió totalmente el uso de este compuesto y sus derivados en nuestro país (ANMAT - [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar) ANMAT 7292/98). Esta problemática ambiental debido a la persistencia de compuestos de DDT también fue observada en otros países. Si bien fue prohibido en Estados Unidos en 1972, DDT posee una vida media ambiental de alrededor de 100 años (Gilbert, 2006), por lo que DDT y DDE han sido asociados a diversos problemas ambientales, tales como la disminución de la población de aligátors en Florida, la feminización de peces en Lake Superior, el incremento de cáncer de mama y la declinación a nivel mundial del recuento de espermatozoides en la población humana (Carlseny col., 1992; Keiding y Skakkebaek 1993; Stone, 1994; Swan y col., 1997). En el mismo sentido, Guillette y col (1994); Matter y col., 1998) han vinculado el derrame de contaminantes en el Lago Apopka, entre los que se incluían DDT, DDE y numerosos PCBs, a una reducción del 90% en la tasa de nacimientos de aligátors y del tamaño del pene en los ejemplares machos juveniles (Gilbert, 2006).

En trabajos publicados en los últimos años se pone de relieve la detección de DDT en diferentes tejidos de diversas especies. Ondarza y col. (2011) detectaron DDT y sus metabolitos en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) luego de un episodio donde se produjeron inundaciones en la cuenca

del Río Negro en la Patagonia Argentina. Cabe destacar que el endosulfán mostró las diferencias máximas, de hasta 43 veces en los peces pre y post-inundación. Jofré y col. (2008) en anfibios adultos de diferentes especies (*Chaunus arenarun*; *Leptodactylus mystacinus*; *Hypsiboas cordobae*; *Odontophrynus occidentalis*; *Melanophryniscus stelzneri* y *Pleurodema tucumanum*) que habitaban depósitos artificiales de agua en la provincia de San Luis (Embalse Las Flores), determinaron diferentes concentraciones de pesticidas organoclorados entre ellos el DDT, endosulfán, clordano, aldrin, etc, sugiriendo que los anuros pueden concentrar COCs y por lo tanto son una fuente importante de exposición para sus depredadores. Estos antecedentes recientes nos indican que se siguen utilizando estos compuestos y que su detección no solo se da en especies longevas como el yacaré overo.

Nuestros datos, sumados a los de otros autores (de Solla y col., 2008; Rasuchemberger y col., 2007) nos permiten proponer a los niveles de COCs presentes en los huevos de yacaré overo como monitores/biomarcadores de la presencia de contaminantes en el hábitat del yacaré overo. Basándonos en que se ha demostrado que la madre transfiere los contaminantes a los huevos durante su desarrollo, y que posee las características de bioacumular los contaminantes, ser fiel a su hábitat y no migrar, podemos considerar que los niveles de COCs detectados son un reflejo de la contaminación histórica de la región evaluada. Por lo tanto, los mayores contaminantes en las regiones estudiadas de Santa Fe, Chaco y Entre Ríos son el oxiclordano y los pertenecientes a la familia del DDT, mientras que el Endosulfán sería un contaminante característico de la zona estudiada en Entre Ríos.

Diversos autores asocian la presencia de COCs con un aumento de la mortalidad embrionaria y problemas en la reproducción en distintas especies (Colborn y Clements, 1992; Rauschemberger y col., 2007; De Solla y col., 2008; Guillette y Edwards, 2008; Monje y col., 2009). En este sentido, varias especies de aves rapaces que se alimentan fundamentalmente de peces están en peligro debido a la acumulación de altos niveles de DDE, DDT, PCB, dioxinas y metil-mercurio, en particular en los huevos. La exposición a estos contaminantes ambientales podría llevar a la producción reducida de huevos,

adelgazamiento de la cáscara, disminución de la fertilidad, malformaciones y disminución de la supervivencia de las crías (Lundholm, 1997). De hecho, Gormley y Teather, (2003) encontraron una disminución en la producción de huevos con demoras en la eclosión y en la madurez sexual en hembras de *Oryzias latipes* (pez medaca) cuando fueron expuestas *in ovo* durante 24 horas a diferentes concentraciones de endosulfán en el agua de la pecera (0,01; 0,10 y 1 µg/l). En nuestro trabajo hallamos una correlación negativa entre el número de huevos por nido y el contenido de OCPs. Por otro lado, Rauschemberger y col. (2004) demostraron que los huevos de hembras de *A. mississippiensis* expuestas a OCPs tuvieron una menor viabilidad ( $13 \pm 22\%$ ) que los controles ( $45 \pm 20\%$ ). Por el contrario, nosotros no encontramos asociación entre los niveles detectados de COCs y alteraciones en el porcentaje de eclosión ni de supervivencia a los 10 días de vida. Esta falta de asociación directa entre la presencia de contaminantes y una menor sobrevivencia también fue observada por Heinz y col. (1991), quienes evaluaron el porcentaje de eclosión de los nidos y los niveles de pesticidas organoclorados y PCBs en huevos de *Alligator mississippiensis* provenientes de los lagos Apopka, Griffin, y Okeechobee en Florida (EEUU). En coincidencia con nuestros resultados, estos autores no encontraron evidencias de una asociación directa entre la contaminación con POCs o PCBs y un porcentaje de supervivencia reducido.

La población humana también está expuesta a este tipo de contaminantes ambientales (Muñoz-de-Toro y col., 2006). En el año 2001, Oliva y col. observaron que la exposición a diversos pesticidas y/o solventes de una población de hombres del sur del Litoral de Argentina está significativamente asociada con parámetros de fertilidad alterados o por debajo de los valores normales (criptorquidia, hipospadia, tumores testiculares, menor producción de esperma, etc). También se ha demostrado la asociación entre el desarrollo de criptorquidismo infantil y niveles detectables en la leche materna de 27 COCs diferentes, entre ellos el endosulfán, el oxiclordano y compuestos de la familia del DDT (Damgaard y col., 2006). En base a los antecedentes descriptos y a nuestros resultados, podemos proponer que la medición de COCs y pesticidas en el contenido de los huevos de *C. latirostris* sería útil para

una detección temprana de potenciales amenazas a la salud de los ecosistemas y de la población humana.

Por otro lado, la exposición a COCs es capaz de alterar tanto la densidad de poros como el grosor de la cáscara de los huevos, siendo la formación de la cáscara también una etapa materna. En huevos de patos (*Anas platyrhynchos domesticus*) alimentados diariamente o 3 veces por semana con Lindano (20 mg/kg) durante ocho semanas, se comprobó un adelgazamiento del grosor de la cáscara y una reducción en la densidad de poros (Chakravarty y Lahiri, 1986). En el presente trabajo pudimos establecer una asociación negativa entre la densidad de poros y la concentración de COCs, de manera que a medida que aumenta la concentración de COCs disminuye el número de poros por cm<sup>2</sup> de cáscara. Teniendo en cuenta que el oxígeno ingresa por difusión desde el medio ambiente que rodea al huevo, una disminución del número de poros/cm<sup>2</sup> podría comprometer el intercambio gaseoso y afectar la viabilidad del embrión (Ar y Rahn, 1985; Reizis y col., 2005). En este sentido, en cocodrilos se ha demostrado que la porosidad de la cáscara de los huevos está relacionada con la viabilidad fetal (Wink y col., 1990). De hecho, nosotros también pudimos observar que, la menor densidad de poros de los huevos estuvo asociada a un menor porcentaje de supervivencia de las crías a los 10 días de vida, demostrando una menor viabilidad postnatal. Como mencionamos antes, la disminución en el número de poros estuvo asociada con un incremento en la concentración de COCs en los huevos de *C. latirostris*. Por lo tanto, estos resultados nos permiten proponer un efecto deletéreo indirecto de los COCs sobre la supervivencia postnatal temprana, mediado por una disminución en la densidad de poros de la cáscara de los huevos. En cuanto al grosor de la cáscara, pudimos determinar que el grosor de la misma es similar entre las diferentes porciones del huevo, coincidiendo con los resultados obtenidos por Morales-Arango y col. (2007) en cáscaras de huevo de *Crocodylus intermedius*. Sin embargo, el grosor de la cáscara permaneció inalterado al aumentar la concentración de COCs. Es probable que los niveles de COCs que detectamos en los huevos estén por debajo de la cantidad mínima necesaria para provocar una reducción en el grosor de las mismas (Chakravarty y Lahiri, 1986; Clark y col., 2001).

En resumen, nuestros resultados muestran que una alta concentración de COCs en huevos se asocia con una menor capacidad reproductiva (menor número de huevos y menor porosidad en la cáscara de los huevos) y como consecuencia menor sobrevivencia de los neonatos.

### ***Exposición experimental***

En una segunda etapa del trabajo de tesis, que denominamos Exposición Experimental, buscamos conocer los efectos de la exposición *in ovo* a concentraciones conocidas de algunos PEs sobre distintos parámetros de crecimiento del yacaré overo, características dimórficas (morfometría genitales externos y características craneofaciales) y los perfiles hematológico, bioquímico e inmunológico innato, con el fin de identificar y sugerir biomarcadores de efecto por exposición a PEs.

Diversos antecedentes sugieren al *phallus* como un órgano sensible a contaminantes en crocodílidos. Guillette y col. (1996) observaron una disminución del 24% en el *phallus* de machos juveniles de *Alligator mississippiensis* que habitan el lago Apopka (lago contaminado) con respecto a los aligatores de similar tamaño que habitan el lago Woodruff (lago perteneciente a una reserva de vida silvestre). Esta disminución en el *phallus* está asociada a una reducción de un 70% de la testosterona plasmática y a túbulos seminíferos pobremente organizados.

Sin embargo, considerando que es un órgano asimétrico, para poder establecer si el *phallus* es un posible biomarcador/bioindicador de exposición a contaminantes, es necesario evaluar con precisión la morfometría del mismo. Teniendo en cuenta esto, utilizamos tres variables que representan su morfología: largo del *phallus*, ancho y alto de la cabeza del *phallus*. Por otro lado, es necesario conocer de qué manera el crecimiento corporal influye en el desarrollo de este órgano. La relevancia de esta correlación fue puesta en evidencia cuando Guillette y col. (1999), utilizando los valores normalizados por el peso para cuantificar las modificaciones del *phallus*, observaron que, las diferencias entre los lagos contaminados y el control se hicieron más claras.

Esta asociación entre el peso del animal y el tamaño del *phallus* también fue observada en juveniles (peso corporal entre 2,5 y 4,7 kg) de *Alligator mississippiensis* por Moore y col. (2012). Para establecer la asociación del tamaño del *phallus* con el tamaño corporal, se evaluaron las correlaciones con las variables de crecimiento registradas a lo largo del experimento (peso, largo total, longitud hocico-cloaca). De esta manera, pudimos determinar al peso del animal como normalizador de todas las variables morfométricas evaluadas en los machos, y para longitud y ancho del *phallus* de las hembras. Como el alto de la cabeza del *phallus* de las hembras no presentó correlación con ninguna de las variables alométricas, se usaron los datos crudos para el análisis de esta variable. Luego, al analizar si los tratamientos *in ovo* con PEs afectaban las correlaciones entre el *phallus* y el peso corporal de los yacarés overos, concluimos que los contaminantes ATZ, END, BPA o E2 no modificaron la asociación entre *phallus* y peso corporal del yacaré overo.

Varios autores han descripto dimorfismo sexual del *phallus* en cocodrilidos, variando la edad a la cual este dimorfismo se manifiesta según la especie analizada. Allsteadt y Lang (1995) observaron un dimorfismo sexual claramente distinguishible en los genitales externos en aligatores a los 6 meses de edad. Nuñez-Otaño y col. (2010) observaron diferencia en el ancho y alto de la cabeza del *phallus* en *C. latirostris* recién eclosionados, siendo las medidas de los machos mayores a las hembras, y no observaron diferencia en el largo del *phallus* en esta edad. Moore y col. (2012) observaron dimorfismo sexual en el largo del *phallus* en juveniles de *Alligator mississippiensis*. Para los ejemplares de *C. latirostris* criados en las condiciones controladas de nuestro bioterio, pudimos determinar que el largo del *phallus* y alto de la cabeza del *phallus* en caimanes de 12, 18 y 24 meses de edad son diferentes entre machos y hembras (dimorfismo sexual), mientras que no observamos dimorfismo en el ancho de la cabeza del *phallus*.

También pudimos determinar que el largo del *phallus* de ejemplares machos de 12 y 24 meses de edad, que fueron tratados *in ovo* con ATZ, END, BPA o E2 bajo, es similar al de los controles. En cambio, el tratamiento *in ovo* de las hembras con ATZ o END produjo una disminución significativa del largo

del *phallus* y del ancho de la cabeza del *phallus* con respecto a las hembras controles. Por el contrario, las hembras topicadas con BPA o E2 no mostraron cambios en el tamaño del *phallus*. Además, observamos que el dimorfismo sexual del largo del *phallus* y el alto de la cabeza del *phallus* no es alterado por ATZ, END, BPA o E2. En cambio, el ancho de la cabeza del *phallus* de las hembras tratadas con ATZ o END presentó dimorfismo sexual, siendo menor respecto al de los machos del mismo tratamiento. Este dimorfismo sexual no está presente en animales controles.

En una serie de trabajos, Guillette y col. (1996; 1999) describen la feminización de aligatores macho juveniles habitantes de lagos contaminados principalmente con compuestos organoclorados. Estos aligatores muestran una disminución del tamaño del *phallus* cuando son comparados con animales provenientes de otro lago poco contaminado perteneciente a una reserva, el cual fue tomado como sitio de referencia en su estudio. Efectos feminizantes también fueron observados por Hayes y col. (2010) en sapos (*Xenopus laevis*) tratados con Atrazina, en donde los machos mostraron una disminución de la concentración de testosterona, demasculinización/feminización en el desarrollo de la laringe, falta de comportamiento de apareamiento, reducción de la espermatogénesis y disminución de la fertilidad. Incluso también existen evidencias de disminución del tamaño del pene en caracoles expuestos a 1 y 100 µg/l de BPA durante su ciclo de vida; resultado que se lo asocia más con la actividad antiandrogénica del BPA que con la estrogénica (Soto y col., 1997; Sohoni y Sumpter, 1998; Oehlmann y col., 2000; Sultan y col., 2001). Tal como ya mencionáramos, en las edades estudiadas, el *phallus* de los caimanes macho no fue afectado por ninguno de los contaminantes a los que fueron expuestos *in ovo*. En cambio observamos una reducción del *phallus* en las hembras. La discordancia entre nuestros resultados y las observaciones de Guillette y col. (1996; 1999) y Moore y col. (2012) sobre el tamaño del *phallus* en machos juveniles, podría deberse a que nuestros animales estuvieron expuestos a los PE en un único momento *-in ovo-* durante el desarrollo embrionario. Los aligatores estudiados por Guillette y col. y Moore y col., en cambio, estuvieron expuestos de forma crónica a múltiples contaminantes y no sólo *in ovo* sino también durante la vida postnatal (Heinz y col., 1991; Guillette

y col., 1996; 1999 a y b; Bargar y col., 1999). En cuanto a los resultados que describimos para los ejemplares hembras de nuestro estudio, no encontramos en la literatura científica indicios sólidos del significado biológico que pueda tener en la biología reproductiva de los caimanes la presencia de un *phallus* reducido en las hembras. Sin embargo, consideramos que esto no invalida el uso de este parámetro como biomarcador de exposición a ATZ o END en la población de caimanes. Estos resultados nos estarían indicando que el *phallus* es un órgano blanco de ATZ y END y respaldan la utilización del *phallus* como un marcador de contaminación ambiental y como un potencial biomarcador para la caracterización del yacaré overo como centinela de contaminación.

Un resultado que consideramos interesante es que el largo del *phallus* de las hembras obtenidas por DSH (huevos incubados a 33°C y topicados con estradiol 1,4 ppm), es macroscópicamente similar al *phallus* de las hembras obtenidas por DST (huevos incubados a 30°C). En trabajos previos hemos descrito los cambios a nivel histológico que se dan en las gónadas cuando se obtienen caimanes hembras de huevos incubados a la temperatura de obtención de machos y expuestos a E2 1,4 ppm (Stoker y col, 2003). Los resultados de la presente tesis muestran que el proceso de reversión sexual se da también a nivel del desarrollo de características sexuales secundarias como el tamaño y morfometría del *phallus*, lo que nos permite concluir que la exposición a 17- $\beta$  estradiol en una dosis de 1,4 ppm es un factor determinante del sexo que prevalece sobre la influencia de la temperatura.

En cuanto a las medidas craneofaciales no observamos diferencias entre machos y hembras en los animales controles para las diez variables analizadas, demostrando la ausencia de dimorfismo sexual en la morfometría craneofacial en animales juveniles criados en las condiciones controladas de nuestro bioterio. Piña y col. (2007) observan dimorfismo sexual en *C. latirostris* de 10 días de edad, siendo las dimensiones craneofaciales de los machos menor al de las hembras, mientras que Verdade, (2000) observa dimorfismo sexual en caimanes overos adultos. En nuestro caso, la exposición a ATZ generó dimorfismo en el ancho mínimo interorbital, el cual no fue observado entre machos y hembras del grupo de animales controles. Las hembras

expuestas a ATZ mostraron además una disminución del ancho máximo de las narinas, de la base del hocico y craneal, presentando dimensiones semejantes a los machos controles, mientras que en las que fueron tratadas con END observamos una reducción en el ancho mínimo inter-orbital. La morfología craneofacial tiene un rol importante en el reconocimiento visual previo al apareamiento que se da en la naturaleza, como parte del cortejo por el cual el macho realiza la búsqueda de una hembra. Esta idea fue utilizada por Verdade (2000), al mostrar que la región superior craneofacial es diferente entre machos y hembras: para identificar a una hembra el macho observa la región de la cabeza que queda al descubierto cuando los animales descansan en la superficie del agua. Los resultados aquí presentados sugieren que las alteraciones provocadas por ATZ o END podrían entorpecer el reconocimiento visual de las hembras por parte de los machos en el agua. Además, en base a lo antes expuesto podemos proponer al ancho mínimo interorbital como un biomarcador de efecto por contaminación con ATZ o END.

Muchos factores influyen el hemograma de los reptiles. Cuando se realiza la interpretación del hemograma de un reptil, se deben tener en cuenta una diversidad de factores tales como la estación, condiciones ambientales, sitio de extracción, edad, género e incluso los métodos de laboratorio utilizados. Los parámetros hematológicos y químicos de la sangre pueden proporcionar información predictiva sobre la salud de los animales, el diagnóstico de enfermedades y el monitoreo de la respuesta a una terapia (Jacobson, 2007). En este sentido, la determinación de rangos de referencia son necesarios para ayudar a evaluar las causas de las enfermedades y los riesgos a los que están expuestas las poblaciones (Casal y Oros, 2007; Oliveira-Júnior y col., 2009). Aunque los parámetros hematológicos y de química sanguínea podrían ofrecer valiosas herramientas no invasivas de diagnóstico del estado de salud, estos parámetros pueden ser muy variables, debido a la influencia de diversos factores intrínsecos y extrínsecos tales como la calidad del medio acuático, la ubicación geográfica, las variaciones genéticas, madurez, sexo, estado de reproducción y la dieta. Con el fin de definir rangos de referencia que sean independientes de factores externos, se

criaron yacarés overos en condiciones ambientales controladas de manera de satisfacer las necesidades fisiológicas asociadas al crecimiento corporal.

En una primera etapa nos propusimos establecer los valores de referencia hematológicos, inmunológicos y de la química sanguínea, como así también, las dimensiones de las células sanguíneas y su perfil citoquímico en muestras de yacarés overos sanos a los cuales no se les administró ninguna droga de estudio (grupo control). Ninguna de las variables estudiadas fue diferente entre machos y hembras en los yacarés overos de nuestro estudio. Observamos que la mayoría de las variables analizadas presentaban solapamiento cuando eran clasificadas en función de la edad de los animales, mientras que esta superposición se minimizaba cuando eran clasificadas en función de los valores de peso, longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (SVL). Se propusieron entonces intervalos de referencia para dos grupos de animales clasificados en base a rangos de peso corporal: 125-900g y 901-3100g. Consideramos que esta clasificación puede ser de mucha utilidad: al ser criados en condiciones ambientales totalmente reguladas y controladas, los intervalos de referencia propuestos pueden ser interpretados como una referencia a valores “ideales” que los animales deberían mostrar según su desarrollo corporal. Esto puede ser aplicado incluso para estudios que utilicen datos que provienen de la naturaleza, donde la edad de los animales salvajes no puede ser determinada mientras que el peso corporal se puede obtener con relativa facilidad.

Observamos una correlación positiva entre el peso corporal y la concentración de hemoglobina, hematocrito, y número de glóbulos rojos. Estas correlaciones concuerdan con publicaciones que describen la hematología de otros reptiles. Adultos de *Crocodylus palustris* tuvieron un mayor número de glóbulos rojos que los juveniles (Stacy y Whitaker, 2000). En tortugas se describió una asociación positiva entre el peso y el hematocrito (Stamper y col., 2005). Es probable que estos incrementos asociados al crecimiento del animal se traduzcan en una mayor capacidad de transporte de oxígeno que permitan, a estos reptiles, bucear por períodos más largos de tiempo. Sin embargo, en términos comparativos, los reptiles tienen recuentos de RBC y de

concentración de Hb menores que las de los mamíferos o aves (Hawkey y col., 1991). Estos datos indicarían una mayor capacidad de transporte de oxígeno en la sangre de aves y mamíferos comparada con la de animales ectotérmicos tales como los reptiles (Jacobson, 2007).

Los leucocitos de los reptiles incluyen granulocitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos) y células mononucleares (linfocitos, monocitos). Existe una amplia variación entre las diferentes especies tanto en tamaño celular como en la morfología de los gránulos citoplasmáticos, y en el núcleo de los granulocitos circulantes. En líneas generales, los linfocitos y monocitos circulantes en la sangre periférica de reptiles se asemejan a los de los mamíferos (Jacobson, 2007). Sin embargo, existe una elevada variabilidad de los porcentajes de leucocitos entre las especies e incluso dentro de un mismo género (Alleman y col., 1999). En el presente trabajo describimos con detalle la morfología de las distintas células sanguíneas, las que mostraron características morfológicas similares a las de otras especies de reptiles. En cuanto a la abundancia relativa de las células de la línea blanca, observamos que los linfocitos son los leucocitos más numerosos en la sangre periférica de *C. latirostris* juveniles. Esto es consistente con los datos reportados por el ISIS (*International Species Information System*, 1999), que informa que los linfocitos representan aproximadamente el 60% del total de glóbulos blancos, pero difiere de los resultados obtenidos en la mayoría de los quelonios y crocodilidos, que describen a los heterófilos como los leucocitos sanguíneos más observados (Mateo y col., 1984; Stacy y Whitaker, 2000; Schoeb y col., 2002; Casal y col., 2007). Otros investigadores describen a los linfocitos como la población predominante de células blancas (Mussart y col., 2006), quienes determinaron que los linfocitos representaron alrededor del 75% del total de leucocitos en la sangre periférica de una muestra mixta de subadultos de *C. latirostris* y *C. yacare*, un valor sensiblemente más alto que el de nuestro estudio. Una posible explicación para esta discrepancia es que, aunque las características morfológicas y ultra-estructurales del trombocito han sido claramente descritas (Glassman y col., 1981; Mateo y col., 1984; Leal de Moura y col., 1997; Alleman y col., 1999; Casal y Oros, 2007), los informes de recuento de trombocitos son poco frecuentes y hasta contradictorios, lo que podría deberse

a la identificación errónea de trombocitos como linfocitos. La principal causa de estos desaciertos es la falta de un método directo y adecuado para el recuento de trombocitos (Mateo y col., 1984), lo que obliga a deducir el recuento total de trombocitos a partir de frotis de sangre entera (Oliveira-Júnior y col., 2009). Además, para *C. latirostris* no hay datos de recuento de trombocitos en la literatura. En el presente estudio, el uso de una solución modificada de Natt-Herrick nos permitió conservar las diferencias morfológicas entre linfocitos y trombocitos y de esta manera pudimos contar directamente estas dos células en la cámara de Neubauer, obteniendo recuentos cuantitativos para cada una de ellas. Los valores obtenidos de número de trombocitos fueron similares a los valores previamente publicados para cocodrilos americanos (Glassman y col., 1981; Mateo y col., 1984).

A diferencia de los eritrocitos de los mamíferos, las RBCs de reptiles, aves y anfibios poseen núcleo. Los RBCs nucleados son elípticos y mayores que los RBCs no nucleados, siendo los de anfibios los más grandes. En general, los eritrocitos maduros de reptiles poseen un núcleo oval, con una cromatina densa y un citoplasma eosinofílico homogéneo. La caracterización de procesos patológicos asociados con una morfología anormal en los eritrocitos es limitada en reptiles. La policromasia (múltiples colores) evidencia la presencia de RBCs inmaduros en frotis de sangre teñidos. Esta condición es observada con relativa frecuencia en reptiles con anemias moderadas a severas, y representa una respuesta regenerativa del organismo del animal para retornar a su estado de homeostasis (Jacobson, 2007). En sangre periférica de yacarés overos saludables describimos eritrocitos policromáticos, los que se observaron en mayor porcentaje en los yacarés overos de menor peso (125-900g) con respecto a los animales más pesados (901-3100g): los intervalos de referencia establecidos fueron 1,8-2,9% y 0,9-1,8% del recuento de eritrocitos totales, respectivamente. En general, valores bajos de eritrocitos inmaduros se consideran como normales para la mayoría de los reptiles, siendo el grado de policromasia un buen indicador de la respuesta regenerativa eritrocítica (Campbell, 2004).

Las variaciones cuantitativas de los recuentos totales y relativos de los leucocitos y sus alteraciones morfológicas, se pueden relacionar con procesos inflamatorios, neoplasias, malnutrición y estados de estrés (Campbel, 2004, Barni y col., 2007). Los animales que fueron expuestos *in ovo* a E2 1,4 ppm mostraron un hematocrito reducido en ambos rangos de peso, resultando en un recuento de GR totales menor sólo en los animales más grandes (grupo de 901-3100g). Las alteraciones halladas en ambas variables hematológicas (hematocrito y recuento de GR), sugieren un síndrome anémico en los animales expuestos *in ovo* a E2. Si bien la causa primaria de anemia es una eritropoyesis disminuida, existen varias patologías que pueden causar anemia secundaria, entre las que se cuentan diabetes mellitus, hipo e hipertiroidismo, e hipoadrenocorticismo (llamada enfermedad de Adison). Los niveles de glucemia no son alterados por E2, sin embargo no podemos descartar una disfunción tiroidea o adrenal asociada en nuestro grupo de animales. Un aspecto interesante es que una complicación reconocida de hipotiroidismo en humanos y animales es anemia de tipo no regenerativa, compatible con los valores normales de eritrocitos inmaduros que observamos en el presente trabajo (Weiss y Wardrop, 2010). Además, desde hace muchos años se conoce que la administración de etinilestradiol provoca un cuadro de anemia leve en roedores, asociado a un incremento en la susceptibilidad de los GR al daño oxidativo (Le Petit-Thevenin y col., 1991). Por otro lado, la topicación *in ovo* con ATZ provocó una reducción en el número de GB en los animales de mayor peso, lo cual podría estar relacionado con el rol estrogénico sobre la proliferación y diferenciación de la población de leucocitos (Weiss y Wardrop, 2010).

Diversos factores han sido descriptos como causantes de variaciones en el contenido de hemoglobina como también del número total de GR y de GB. Entre ellos, se describen agentes virales, toxinas, estado nutricional, temperatura ambiental y hasta períodos de hibernación o de sequía. Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se informa el efecto de un estrógeno “puro” (como el estradiol) o de ATZ sobre los valores de hemoglobina y de recuentos de células sanguíneas.

Encontramos similitudes y diferencias al comparar la actividad de enzimas y niveles de carbohidratos, proteínas y lípidos de juveniles de *C. latirostris* con los valores de otros cocodrilos sanos (Stacy y Whitaker, 2000; Schoeb y col., 2002; Barboza y col., 2008). Los niveles de glucosa están muy influenciados por el período de ayuno. Los niveles de glucosa evaluados, después de 24 horas de ayuno, fueron superiores a los de Stacy y Whitaker (2000) en el que todos los animales se mantuvieron en ayunas al menos 48 horas antes de la extracción de sangre. No se pudieron establecer comparaciones en los niveles de glucosa con trabajos donde no se informa el período de ayuno, o son animales de vida silvestre (Schoeb y col., 2002; Barboza y col., 2008). Los bajos niveles de colesterol y triglicéridos detectados podrían reflejar el bajo consumo de grasas como resultado de la dieta suministrada en nuestro bioterio. Por otra parte, la cantidad de creatinina producida se relaciona con la masa muscular, y la dieta tiene poca influencia. De acuerdo con esto, los niveles de creatinina que se detectaron para *C. latirostris* fueron similares a los reportados para los animales con en el mismo rango de peso (Stacy y Whitaker, 2000) y más bajos que los observados en caimanes más pesados (Barboza y col., 2008). Los valores detectados para las enzimas relacionadas con el daño hepatocelular se encontraron dentro de los rangos reportados para otros cocodrilos sanos (Stacy y Whitaker, 2000). En el presente trabajo, ninguno de los contaminantes evaluados ni E2 provocaron alteraciones en los niveles de los analitos de química sanguínea. Si bien las medias estadísticas no difieren significativamente, los valores de los animales expuestos son superiores al límite superior de los controles. El aumento en las enzimas hepato-biliares ponen en evidencia alteraciones de la funcionalidad hepática. Esto podría impactar negativamente en los mecanismos involucrados en la eliminación de hormonas esteroides, modificando su vida media, otro modo de perturbación endócrina.

Además de la respuesta inmune celular, los cocodrilos han evolucionado una respuesta inmune humoral amplia y de gran alcance (Merchant y col, 2006a, b), por lo tanto, la inmunología podría ofrecer valiosas herramientas de diagnóstico y pronóstico para examinar su estado de salud. En este estudio, determinamos un valor de CH50 (concentración a la cual se produce el 50% de

hemólisis), igual a 7,1% de suero. La CH50 es una medida de valoración de la función inmune innata y podría ser utilizada como referencia por las clínicas veterinarias que participan en la práctica con animales exóticos, evaluando la actividad relativa de una muestra de suero (Margni, 1980).

**CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten afirmar que:

- Las tres áreas geográficas evaluadas presentaron similares niveles de COCs y una gran diversidad de compuestos, siendo el oxiclordano y los miembros de la familia del DDT los COCs hallados en mayor concentración y frecuencia. Estos resultados, contrastan con el grado de intervención antrópica de las diferentes áreas y evidencian la globalización de la contaminación. El END sólo se detectó en dos nidos de la provincia de Entre Ríos, coincidiendo con la intensa actividad agrícola de esta provincia y reforzando el concepto de que los niveles de COCs en los huevos reflejan la contaminación histórica de la región evaluada.

- Los niveles de COCs mostraron una asociación con ciertas variables de relevancia en la reproducción de *C. latirostris*. Detectamos que una mayor concentración de COCs se asocia de manera directa a un menor número de huevos por nido. Por otro lado, una elevada cantidad de COCs en huevos estuvo asociada a una menor porosidad de la cáscara, la cual se correlacionó con una menor supervivencia a los 10 días de vida. Esto último nos permite proponer un efecto indirecto de los COCs sobre la supervivencia postnatal temprana, mediada posiblemente por un intercambio gaseoso deficitario por un número reducido de poros de la cáscara.

- El crecimiento general de los animales no fue afectado por la exposición a BPA, ATZ o END. Sin embargo, ciertas variables dimórficas como la morfometría craneofacial y de la estructura del *phallus* mostraron alteraciones causadas por ATZ o END. La región superior del cráneo es diferente entre machos y hembras y, para identificar a una hembra, el macho observa la región de la cabeza que queda al descubierto cuando los animales descansan en la superficie del agua. Los resultados aquí presentados sugieren que las alteraciones provocadas fundamentalmente por ATZ podrían entorpecer el reconocimiento visual de las hembras por parte de los machos en el agua. Por otro lado, la estructura clítoris/pene de la hembra es modificada por la exposición a ATZ o END, lo que nos permite proponer ciertos parámetros de esta estructura dimórfica como biomarcadores de efecto por la exposición a estos contaminantes.

- En la presente tesis establecimos los valores de referencia de los perfiles hematológico y bioquímico de *C latirostris* en relación a su peso corporal, junto con la caracterización citoquímica de las células de sangre periférica. La inmunidad innata no fue alterada por la exposición a ATZ, END, BPA o E2. Los niveles de los analitos de la química de la sangre no mostraron alteraciones en los grupos experimentales; sin embargo, al ser analizados de manera individual, varios de estos animales mostraron valores por fuera del rango establecido por los valores de referencia.

Finalmente, diversas variables pueden ser propuestas como potenciales biomarcadores de efecto por la exposición a contaminantes clasificados como PE. Además, estos resultados permiten profundizar nuestro conocimiento respecto a la toxicidad de los COCs relacionada con la biología reproductiva del yacaré overo e identificar efectos deletéreos de los COCs presentes en su hábitat natural sobre el éxito reproductivo de la especie.

# RESUMEN

La exposición a contaminantes ambientales conocidos como perturbadores endocrinos (PE) altera el desarrollo y la función del sistema endocrino afectando a especies tan diversas como anfibios, peces, reptiles, roedores y seres humanos. Los compuestos que han sido clasificados como PE abarcan un amplio espectro de aplicaciones, tales como pesticidas, herbicidas, suplementos dietarios, plásticos, medicamentos y productos cosméticos o de cuidado personal. Tal diversidad ha aumentado la exposición tanto de los animales como del hombre a PE. Los efectos vinculados a la exposición a PE incluyen feminización de los machos, disminución de la calidad del esperma, aumento de la incidencia de anomalías en el desarrollo genital y aumento en la incidencia de tumores hormonodependientes.

Uno de los objetivos principales de nuestro grupo es el estudio de los efectos de la exposición durante períodos críticos del desarrollo a contaminantes ambientales clasificados como PE y de amplia distribución en ecosistemas acuáticos. En este sentido, nos interesa caracterizar tanto los efectos deletéreos que los organismos padecen por la exposición a PE en sus hábitats de origen como en condiciones experimentales controladas. Para ello, en este trabajo de tesis doctoral se estudiaron los efectos derivados de la exposición natural a compuestos organoclorados (COCs) [pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados] y de la exposición experimental a endosulfán (END), atrazina (ATZ) y bisfenol A (BPA).

Los COCs, son sustancias lipofílicas, clasificadas como PE que se comportan principalmente como xenoestrógenos, sin embargo, también se observaron efectos antiandrogénicos. Los COCs se dispersan y acumulan en el medio ambiente y en la cadena alimentaria. Para los humanos, la principal vía de exposición a COCs es la dieta, fundamentalmente a través de la ingesta de carne y productos lácteos. En nuestro país, como resultado de la amplia utilización de semillas transgénicas y de la aplicación de nuevas tecnologías de labranza, las prácticas agrícolas han crecido sustancialmente acompañadas por una deforestación intensiva y por el aumento del uso de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes). Sumado a esto, el creciente desarrollo industrial y el desconocimiento de las normas de protección del medio ambiente son las

principales amenazas a la salud de nuestro ecosistema. Sin embargo, a pesar de esta notable expansión de la frontera agrícola-industrial, es poco lo que se sabe sobre los niveles de contaminación que esta actividad está generando en los humedales en Argentina. El END, es un COC desarrollado en la década del '50 y es efectivo contra una amplia variedad de insectos y ácaros. En Argentina el END está siendo utilizado masivamente desde la prohibición total del monocrotofos en 1999, y es uno de los insecticidas de elección en cultivos de maíz, soja, trigo, girasol y sorgo, entre otros.

La ATZ es un herbicida utilizado en el control de malezas. ATZ es altamente persistente en suelo, no se adsorbe en gran medida a sedimentos y es moderadamente soluble en agua.

El BPA es un compuesto ampliamente utilizado en la producción de policarbonatos plásticos y resinas epoxi. Se ha demostrado que el BPA se libera del material del cual forma parte bajo condiciones normales de uso por ruptura del enlace éster formado entre monómeros.

Estos contaminantes (ATZ, END y BPA) se han encontrado en aguas superficiales, sedimentos, leche materna humana y animal, suero y tejido adiposo de mujeres, anfibios y peces. Por estas razones representan un riesgo potencial, altamente significativo para los humanos y la vida silvestre.

Para el monitoreo de la contaminación ambiental y la evaluación de los efectos de los contaminantes, es muy importante contar con especies centinelas y biomarcadores. El *Caiman latirostris* (yacaré overo) se encuentra ampliamente distribuido en el noreste de Argentina y está siendo utilizado en diversos programas de rancheo. El yacaré overo es una especie ovípara que posee características ecológicas y fisiológicas que lo convierten en un posible organismo centinela de exposición a PE. Entre las principales características se pueden mencionar que posee una posición superior en la red trófica, tiene determinación sexual por temperatura, sensible a los xenoestrógenos, tiene una expectativa de vida semejante a los humanos lo que permite la bioacumulación de contaminantes y es una especie de hábitos acuáticos y

terrestres pudiendo estar expuesta a una gran variedad de contaminantes durante todos los estadios de su vida. Todas estas características sustentan la relevancia de la evaluación de los efectos provocados por determinados agroquímicos y desechos urbano-industriales, clasificados como PE, para la caracterización de *Caiman latirostris* como centinela de contaminación y monitor de la salud del ecosistema. A tal fin la identificación y caracterización de biomarcadores de exposición y efecto de PE es fundamental. Estas respuestas selectivas pueden actuar como sistemas de advertencia temprana y proveer índices de potenciales efectos de los contaminantes sobre el ecosistema.

Nuestra hipótesis de trabajo es que ciertos compuestos agroindustriales clasificados como PE contaminan los ecosistemas naturales donde habita el yacaré overo y que esta exposición a contaminantes con capacidad de modificar su sistema endocrino puede ser detectada de forma temprana mediante diversos biomarcadores de exposición o efecto. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

**1- Evaluación de la exposición natural a compuestos agroindustriales.**

En huevos de *C. latirostris*, colectados en zonas con diferente grado de intervención antrópica:

- a) Determinar la concentración de distintos compuestos organoclorados (COCs).
- b) Establecer porosidad y grosor de las cáscaras.
- c) Evaluar las posibles relaciones entre concentración de COCs, características de la cáscara en huevos y variables reproductivas.
- d) Documentar y establecer incidencia de malformaciones congénitas.

**2- Evaluación de la exposición experimental a compuestos agroindustriales.**

En *C. latirostris* juveniles criados en condiciones controladas:

- a) Determinar los efectos de la exposición a PE sobre las curvas de crecimiento.

- b) Establecer las características que diferencian al *phallus* de machos y hembras y evaluar el efecto de la exposición a PE sobre las mismas.
- c) Establecer las características cráneo-faciales en ambos sexos y evaluar el efecto de la exposición a PE sobre las mismas.
- d) Determinar los efectos de la exposición a PE sobre los parámetros hematológicos, inmunológicos y bioquímicos.

### **Materiales y Métodos:**

Para evaluar la **Exposición Natural** a PE, en las temporadas reproductivas de 2002, 2006-2008, se cosecharon los huevos de 14 nidos en zonas con diferente grado de intervención antrópica en las provincias de Chaco, Santa Fe y Entre Ríos. En el campo, se registró el número de huevos por nido, el tipo de nidificación, ubicación topográfica del mismo y el grado de intervención antrópica. En el laboratorio, se registraron peso, ejes mayor y menor de cada uno de los huevos evitando movimientos bruscos y rotaciones, conservando siempre la posición de la marca hacia arriba. Se seleccionaron al azar 2 a 4 huevos de cada nido para la determinación de residuos de COCs, evaluación del grosor y porosidad de la cáscara y determinación del estadio embrionario. Los huevos restantes se incubaron en condiciones controladas para evaluar los efectos de la exposición Natural sobre el número de nacidos vivos, supervivencia de los neonatos a los 10 días, incidencia de malformaciones.

La detección de los residuos de COCs se realizó a partir de un homogenado del contenido del huevo, excluyendo el embrión. La detección y cuantificación de los COCs se realizó por cromatografía gaseosa con detector de captura electrónico (ECD Ni 63). Se confirmó la identidad y concentración de COCs mediante el sistema de cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masa GC-MS.

A las cáscaras se les extrajo la membrana corioalantoidea y se les realizó un lavado y deshidratación. Los fragmentos fueron destinados a la cuantificación del grosor y densidad de poros de la cáscara correspondientes a cada región (medial y polar). La medición del grosor de las cáscaras se realizó

mediante el análisis de imágenes digitalizadas con las herramientas disponibles en el software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (media Cybernetics, USA). El número de poros por unidad de superficie y sus características se estableció mediante microscopía electrónica de barrido. Las mediciones de la cantidad de poros y la superficie de cada fragmento se llevaron a cabo en las electromicrografías utilizando el programa de procesamiento de imágenes Image J (NIH, Bethesda, USA).

Para la evaluación de los efectos de la **Exposición Experimental** a PE durante las estaciones reproductivas de los años 2007 y 2008 se cosecharon 8 nidos de *C. latirostris* (yacaré overo) en humedales del refugio “El Cachapé” de la Fundación Vida Silvestre cercano a la localidad de La Eduvigis, provincia de Chaco.

Se evaluaron efectos por tratamiento *in ovo* con END, ATZ y BPA. Los huevos fueron transportados al laboratorio donde se pesaron e incubaron en condiciones controladas de humedad y temperatura (33°C para obtener machos y 30°C para obtener hembras). Llegados a la etapa 20 del desarrollo embrionario, se trataron los huevos por topicación. Los tratamientos aplicados fueron: END 20 ppm, ATZ 0,2 ppm, BPA 1,4 ppm, E2 0,014 y 1,4 ppm. En todos los casos se utilizaron grupos controles negativo (topicación con vehículo-etanol) y positivo de acción xenoestrogénica (con E2 1,4 ppm). Finalizado el período de incubación se asistió a los nacimientos y se registró la supervivencia a los 10 días de edad. Se registraron las siguientes variables alométricas: peso corporal, largo total y largo desde el hocico hasta la cloaca. Para detectar posibles acciones neurotóxicas del END y/o del resto de los compuestos topicados, se evaluaron la postura, locomoción, recuperación de la postura y reflejo ocular fotomotor. A los 6, 12, 18 y 24 meses de edad, utilizando los datos de las variables alométricas, determinamos índice de masa corporal (IMC) y el índice de condición corporal (ICC). En animales de 12, 18 y 24 meses de edad se extrajo la estructura clítoris-pene (*phallus*), que fue fijada y luego conservada en alcohol 70%. Las mediciones fueron obtenidas a partir de imágenes digitalizadas utilizando el software Image Pro-Plus 4.1.0.1. Utilizando la misma metodología se registraron diez medidas craneofaciales en

yacarés overos juveniles de 12 meses de edad, estas corresponden a diferentes longitudes y anchos del cráneo del yacaré overo.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción supra vertebral del seno venoso occipital, después de cumplirse 24 horas de ayuno. Los extendidos sanguíneos (frotis) se realizaron con sangre entera, para luego realizar el recuento diferencial de leucocitos, y la caracterización morfológica y citoquímica. Para la evaluación de hemoglobina, hematocrito y recuento en cámara de Neubauer se utilizó sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético. A los 12, 18 y 24 meses de edad se obtuvo suero a partir de 1 ml de sangre entera, para la posterior evaluación de la actividad inmune innata y la determinación de parámetros de química sanguínea.

## **Resultados**

### Exposición Natural

Todas las muestras analizadas presentaron niveles detectables de COCs, indicando que todos los sitios de cosecha de huevos presentaron algún grado de contaminación, observándose una gran heterogeneidad de residuos de COCs. Las familias del DDT y Clordano son los compuestos que representaron un mayor aporte a la sumatoria de pesticidas, mientras que END sólo estuvo presente en dos nidos de la provincia de Entre Ríos.

Al evaluar si la exposición a COCs podría afectar la fertilidad de la hembra, encontramos que una correlación negativa entre el número de huevos por nido y el contenido de pesticidas organoclorados, no observándose correlación respecto al porcentaje de nacidos vivos, la supervivencia a los 10 días y la incidencia de malformaciones.

Independientemente de las concentraciones de COCs, las características de los huevos (peso, ejes) fueron similares a los reportados en la literatura. Además, establecimos una correlación positiva entre el peso del huevo y el peso del yacaré overo al momento del nacimiento.

El grosor y la porosidad de la cáscara no fueron afectados por el avance

del desarrollo del embrión en el rango de estadios embrionarios utilizados. El grosor promedio de las cáscaras fue de  $400,9 \pm 6,0 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  SEM), mientras que el número de poros abiertos/cm<sup>2</sup> fue  $25,3 \pm 4,3$  (media  $\pm$  SEM). No observamos correlación significativa entre el grosor de la cáscara y las concentraciones de COCs. En cambio, el número de poros/cm<sup>2</sup> se correlacionó negativamente con el contenido de COCs, evidenciando que una mayor concentración de COCs se asocia con una reducción en el número de poros/cm<sup>2</sup> de la cáscara. Si bien estos cambios de grosor y porosidad no afectaron el porcentaje de nacidos vivos, el menor número de poros/cm<sup>2</sup> se correlacionó con una menor supervivencia del neonato a los 10 días de edad. Por lo tanto, estos resultados nos permiten proponer un efecto deletéreo indirecto de los COCs sobre la supervivencia postnatal temprana, mediado por una disminución en la densidad de poros de la cáscara de los huevos.

Del registro de cicatrizaciones se pudo constatar que 61,3% de los neonatos presentó cicatrización abdominal completa, 16,1% mostró cicatrización parcial y 22,6% evidenció herniación. Se registraron malformaciones orofaciales sólo en el 4,5%.

#### Exposición Experimental

Los índices IMC e ICC no mostraron diferencias entre machos y hembras en el grupo control a las edades de 6, 12 y 18 meses de edad. En cambio, el IMC de las hembras tratadas con E2 (0,014ppm) es menor que el de los machos a los 12 meses de edad, siendo similares en el resto de las edades evaluadas. ATZ, END o BPA no generaron dimorfismo sexual para el IMC o el ICC en ninguna de las edades evaluadas.

La longitud total como el alto de la cabeza del *phallus* son variables dimórficas en caimanes de 12, 18 y 24 meses de edad, mientras que no se observa este dimorfismo para el ancho de la cabeza del *phallus*. Las hembras expuestas *in ovo* a ATZ o END mostraron una reducción significativa del *phallus*, que se evidencia en una menor longitud total y ancho de la cabeza. BPA y E2 no provocaron cambios en el tamaño del *phallus* de las hembras, mientras que ninguno de los contaminantes evaluados modificó la morfometría

del *phallus* de los machos. El dimorfismo sexual del largo del *phallus* y el alto de la cabeza del *phallus* no fue alterado por ATZ, END, BPA o E2. Sin embargo, el ancho de la cabeza del *phallus* de las hembras fue menor respecto al de los machos debido al tratamiento con ATZ o END. Este dimorfismo sexual no está presente en animales controles.

El largo del *phallus* de las hembras obtenidas por DSH (huevos incubados a 33°C y topicados con estradiol 1,4 ppm), es similar al *phallus* de las hembras obtenidas por DST (huevos incubados a 30°C), demostrando que el proceso de reversión sexual se da también a nivel del desarrollo de características sexuales secundarias. Esto nos permite concluir que la exposición a 17-β estradiol en una dosis de 1,4 ppm es un factor determinante del sexo que prevalece sobre la influencia de la temperatura.

No observamos dimorfismo sexual en ninguna de las variables craneofaciales evaluadas en animales controles. Sólo el tratamiento con ATZ generó dimorfismo del ancho mínimo interorbital (IOW). Las hembras tratadas con END mostraron una reducción del IOW respecto de las hembras controles, mientras que en los machos no se observaron modificaciones. Las hembras expuestas a ATZ presentaron una disminución del ancho máximo de las narinas, de la base del hocico y craneal con respecto a las hembras controles. El resto de las variables craneofaciales de las hembras no fueron afectadas por la exposición a los contaminantes evaluados.

En base a una distribución de frecuencia, los animales fueron clasificados en dos subpoblaciones, divididas en rangos de pesos: 125-900 y 901-3100g. El valor promedio de eritrocitos fue de  $5,58 \pm 0,68$  y  $7,27 \pm 0,16 \times 10^5/\text{mm}^3$  de sangre periférica, para las clases 125-900g y 901-3100g, respectivamente. El recuento de leucocitos fue de  $16,57 \pm 8,21$  (125-900g) y  $25,61 \pm 4,98 \times 10^3/\text{mm}^3$  (901-3100g), y fueron clasificados como: heterófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos. Los animales tratados con E2 (1,4ppm), presentaron una disminución en el valor del hematocrito con respecto a los animales controles en el grupo de animales de menor peso (125-900g). En cambio, los compuestos agroindustriales no causaron alteraciones en los valores de

glóbulos rojos, blancos, hematocrito y hemoglobina. Los animales tratados con ATZ presentaron una disminución en el número de leucocitos, mientras que aquellos tratados con E2 (1,4ppm) presentaron una reducción del número de eritrocitos y del hematocrito, cuando alcanzaron el rango de mayor peso corporal (901-3100g).

La composición química de las células sanguíneas fue estudiada mediante reacciones de citoquímica clásica, evaluándose la presencia y distribución celular de las enzimas y componentes celulares (peroxidasa, polisacáridos, mucopolisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos y lípidos). Los heterófilos y trombocitos fueron positivos con el ácido peryódico de Schiff, siendo los eosinófilos débilmente positivos. Con Sudan Black B fueron marcados los heterófilos y débilmente marcados los eosinófilos. La presencia de peroxidasa fue observada en los eritrocitos, heterófilos y eosinófilos.

En cuanto al tamaño de los componentes de la sangre periférica de yacaré overos controles, los monocitos poseen un área celular mayor ( $169,4 \pm 31,2\mu\text{m}^2$ ) que los linfocitos ( $52,6 \pm 14,3\mu\text{m}^2$ ). La célula con mayor perímetro fue el monocito ( $48,5 \pm 5,2\mu\text{m}$ ) y con el mayor diámetro del citoplasma fue el eritrocito ( $17,3 \pm 1,4\mu\text{m}$ ).

La inmunidad humoral innata se evaluó en 14 caimanes controles de 12 y 24 meses de edad. La actividad hemolítica de los sueros de los caimanes no fue influenciada por el género, las hembras controles mostraron un 56,5% de hemólisis máxima, mientras que los machos un 48,5% de actividad máxima. La CH50 fue establecida con un valor de 7,1%. No se encontraron alteraciones en los porcentajes de hemólisis de los animales tratados con los diferentes contaminantes evaluados en este experimento.

Los niveles séricos de glucosa, urea, colesterol, ácido úrico, triglicéridos, creatinina, bilirrubina total, proteínas totales, albúmina y las globulinas y la actividad sérica de las enzimas fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, la creatina quinasa no fueron modificados por la exposición *in ovo* a ATZ, END, BPA o E2, siendo

similares a los valores obtenidos para las muestras de los animales del grupo control. Sin embargo, un porcentaje de los animales de cada grupo presenta valores que están fuera de los valores de referencia establecidos previamente para cada analito, fundamentalmente en aquellos relacionados con una alteración de la funcionalidad hepática y de vías biliares.

### **Conclusiones**

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten afirmar que:

- Las tres áreas geográficas evaluadas presentaron similares niveles de COCs y una gran diversidad de compuestos, siendo el oxiclordano y los miembros de la familia del DDT los COCs hallados en mayor concentración y frecuencia. Estos resultados, contrastan con el grado de intervención antrópica de las diferentes áreas y evidencian la globalización de la contaminación. El END sólo se detectó en dos nidos de la provincia de Entre Ríos, coincidiendo con la intensa actividad agrícola de esta provincia y reforzando el concepto de que los niveles de COCs en los huevos reflejan la contaminación histórica de la región evaluada.

- Los niveles de COCs mostraron una asociación con ciertas variables de relevancia en la reproducción de *C. latirostris*. Detectamos que una mayor concentración de COCs se asocia de manera directa a un menor número de huevos por nido. Por otro lado, una elevada cantidad de COCs en huevos estuvo asociada a una menor porosidad de la cáscara, la cual se correlacionó con una menor supervivencia a los 10 días de vida. Esto último nos permite proponer un efecto indirecto de los COCs sobre la supervivencia postnatal temprana, mediada posiblemente por un intercambio gaseoso deficitario por un número reducido de poros de la cáscara.

- El crecimiento general de los animales no fue afectado por la exposición a BPA, ATZ o END. Sin embargo, ciertas variables dimórficas como la morfometría craneofacial y de la estructura del *phallus* mostraron alteraciones causadas por ATZ o END. La región superior del cráneo es diferente entre machos y hembras y, para identificar a una hembra, el macho observa la región de la cabeza que queda al descubierto cuando los animales descansan en la

superficie del agua. Los resultados aquí presentados sugieren que las alteraciones provocadas fundamentalmente por ATZ podrían entorpecer el reconocimiento visual de las hembras por parte de los machos en el agua. Por otro lado, la estructura clítoris/pene de la hembra es modificada por la exposición a ATZ o END, lo que nos permite proponer ciertos parámetros de esta estructura dimórfica como biomarcadores de efecto por la exposición a estos contaminantes.

- En la presente tesis establecimos los valores de referencia de los perfiles hematológico y bioquímico de *C latirostris* en relación a su peso corporal, junto con la caracterización citoquímica de las células de sangre periférica. La inmunidad innata no fue alterada por la exposición a ATZ, END, BPA o E2. Los niveles de los analitos de la química de la sangre no mostraron alteraciones en los grupos experimentales; sin embargo, al ser analizados de manera individual, varios de estos animales mostraron valores por fuera del rango establecido por los valores de referencia.

Finalmente, diversas variables pueden ser propuestas como potenciales biomarcadores de efecto por la exposición a contaminantes clasificados como PE. Además, estos resultados permiten profundizar nuestro conocimiento respecto a la toxicidad de los COCs relacionada con la biología reproductiva del yacaré overo e identificar efectos deletéreos de los COCs presentes en su hábitat natural sobre el éxito reproductivo de la especie.

Exposure to environmental contaminants known as endocrine disruptors (ED) alters the development and function of the endocrine system of species as diverse as amphibians, fish, reptiles, rodents and humans. ED covers a broad spectrum of applications and includes pesticides, herbicides, additives, plastics, medicines and cosmetics or personal care. Based on that, the exposure to ED of animals and man has increased. The associated effects include feminization of males, decreasing quality of semen, increased incidence of abnormalities in the genital development and increase in the incidence of hormone-dependent tumors.

One of the main objectives of our group is the study of the effects during critical periods of development of exposure to environmental pollutants classified as ED and wide distribution in aquatic ecosystems. In this sense, we are interested in characterize both the harmful effects that organisms have both in their natural habitats or under controlled laboratory conditions. In this work we evaluate the effects derived from natural exposure to organochlorine compounds (COCs) [organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls] and from experimental exposure to endosulfan (END), atrazine (ATZ) and Bisphenol A (BPA).

The COCs are lipophilic substances, classified as ED, which behaves mostly as xenoestrogens. However, antiandrogenic effects were also observed. Also, they are dispersed and accumulate in the environment and in the food chain. For humans, the main route of exposure to COCs is diet, mainly through the intake of meat and dairy products. In our country, as a result of extensive use of transgenic seeds and new technologies, agricultural practices have substantially grown accompanied by an intensive deforestation and increased use of agrochemicals (pesticides and fertilizers). In addition, growing industrial development and ignorance of the environment standards protection are the main threats to the health of our ecosystem. However, despite this remarkable expansion of the agro-industrial frontier, little is known about levels of pollution caused by these activities in the Argentina wetlands. The END is a COC developed in the 50's and is effective against a broad spectrum of insects and mites. In Argentina, END is still being used massively since the total prohibition

of monocrotophos in 1999, and it is basically used in crops of corn, soybeans, wheat, sunflower and sorghum, among others. The ATZ is a herbicide used for control of weeds. It is highly persistent in soil, is not largely adsorbed to sediments and moderately soluble in water. The BPA is a compound widely used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. It has been shown that the BPA is released under normal use by rupture of the ester-bond formed between monomers. These contaminants (ATZ, END and BPA) have been found in surface waters, sediment, animal and human breast milk, serum and adipose tissue of women, amphibians and fish. For these reasons, they represent a potential health hazard to humans and wildlife.

For the monitoring of environmental pollution and the assessment of the pollutant effects, is very important to detect sentinel species and biomarkers. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) is distributed in the northeast of Argentina and it is being used in various ranching programs. The broad-snouted caiman is an oviparous species that has ecological and physiological characteristics that make it a possible sentinel organism for exposure to ED. It is in a top position of the food chain, is sensitive to xenoestrogens, it has sexual temperature determination, has a human-like life expectancy allowing the bioaccumulation of contaminants, and is a species with aquatic and terrestrial habits that can be exposed to a wide variety of contaminants during all stages of its life. All these features justify using *C. latirostris* as sentinel of pollution and monitor the health of the ecosystem for the evaluation of the effects caused by certain chemicals and agro-industrial wastes. For this purpose the identification and characterization of biomarkers of exposure and effect to ED is essential. These selective responses can act as early warning systems and provide indices of potential effects of pollutants on the ecosystem.

Our working hypothesis is that certain agro-industrial compounds classified as PE pollute natural ecosystems where broad-snouted caimans inhabit and that this exposure to contaminants capable of modifying its endocrine system can be early detected by means of various biomarkers. The specific objectives were the following:

1. Assessment of natural exposure to agro-industrial compounds.

In *C. latirostris* eggs collected in areas with varying degrees of anthropic intervention:

- (a) Determine the concentration of different organochlorine compounds (COCs).
- (b) Establish porosity and thickness of shells.
- (c) Assess the relationship between concentration of COCs, characteristics of shell and reproductive variables.
- (d) Detect and establish incidence of congenital malformations.

2. Evaluation of experimental exposure to agro-industrial compounds.

In *C. latirostris* juveniles reared under controlled conditions:

- (a) Determine the effects of exposure to ED on growth.
- (b) Establish the differential features of males and females *phallus* and to assess the effect of exposure to ED on them.
- (c) Establish the craniofacial features in both sexes and assess the effect of exposure to ED on them.
- (d) Determine the effects of exposure to ED on the hematological, immunological and biochemical parameters.

### **Materials and methods**

To evaluate **Natural Exposure** to ED, eggs from 14 clutches (nesting seasons 2002, 2006 to 2008) were harvested in areas with different degrees of anthropic intervention in the provinces of Chaco, Santa Fe and Entre Ríos (Argentina). In the field, the clutch size, topographical location and degree of anthropic intervention were recorded. In the laboratory, eggs were weighed and measured, avoiding sudden movements. Two to four from each nest were randomly selected for the determination of residues of COCs, assessment of the thickness and porosity of shell and determination of embryonic stage. The remaining eggs were incubated under controlled conditions to assess the number hatched, survival at 10 days of age, and incidence of malformations.

The detection of COCs was performed from a homogenate of the egg, excluding the embryo. The detection and quantification of the COCs was

measured by gas chromatography with electronic capture detector (ECD Ni 63), and then, both COCs identity and concentration were confirmed by gas chromatography system coupled to a GC-MS mass spectrometer

Chorioallantoic membrane was extracted, washed and dehydrated. The fragments were destined to quantification of the thickness and density of pores in each shell's region (medial and polar). The measurement of the thickness was carried out through the analysis of images scanned with the software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (media Cybernetics, USA). The number of pores per unit of surface and its characteristics were established by scanning electron microscopy. Measurements of the amount of pores and the surface of each fragment were conducted in the electromicrographs using the software Image J (NIH, Bethesda, USA).

To evaluate the effects of **Experimental Exposure** to ED, eight *C. latirostris* nests were harvested during the nesting seasons 2007 and 2008 in wetlands of "El Cachape" (Fundación Vida Silvestre Argentina), near "La Eduvigis" city in the province of Chaco.

We assessed *in ovo* effects by treatment with END, ATZ and BPA. The eggs were transported to the laboratory; they were weighed and incubated under controlled conditions of humidity and temperature (33° C for males and 30° C for females). At the stage 20 of embryonic development, the eggs were topically treated. The treatments were: 20 ppm END, 0.2 ppm ATZ, 1.4 ppm BPA, 0.014 and 1.4 ppm E2 (17  $\beta$ -estradiol). Ethanol (vehicle) was used as a negative control and 1.4 ppm E2 as positive control for xenoestrogenic action. Number of caimans hatched, survival at day 10, and some allometric variables (body weight, total and snout vent length) were measured. To detect possible neurotoxic actions, posture, locomotion, posture recovery and eye reflex were evaluated. Based on allometric variables, body mass (BMI) and body condition index (BCI) at 6, 12, 18 and 24 months old were determined. In 12, 18 and 24 months old animals, the clitoris-penis structure (*phallus*) were extracted, fixed and preserved in 70% alcohol. Measurements were obtained from scanned images using the software Image Pro-Plus 4.1.0.1. Same methodology was

used to register ten craniofacial parameters from 12 months old caimans, corresponding to different skull lengths and widths.

Peripheral blood samples were obtained by supra-spinal puncture of occipital venous sinus, after 24 hours of fasting. The blood smear was performed with whole blood, to make differential leukocyte count, morphological and cytochemical characterization. Blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid was used for the evaluation of hemoglobin, hematocrit and erythrocytes count. 1 ml serum at 12, 18 and 24 months caimans old was used for subsequent evaluation of the innate immune activity and of blood chemistry parameters determination.

## **Results**

### Natural exposure

All tested samples showed detectable levels of COCs, indicating that all egg harvest sites showed some degree of pollution. We also showed a considerable heterogeneity of residues of COCs. The families of DDT and chlordane were the compounds that represented the major contribution to the sum of pesticides, whereas END was only present in eggs from two nests of the province of Entre Ríos.

To assess whether exposure to COCs may affect female fertility, we found a negative correlation between the clutch size and the contents of organochlorine pesticides, and we did not observe correlation regarding the percentage caimans hatched, and their survival for 10 days or the incidence of malformations.

Regardless of COCs concentrations, weight and size of eggs were similar to those reported in the literature. In addition, we established a positive correlation between egg weight and Broad-snouted caimans weight at hatching.

The thickness and porosity of shell were not affected by the development of the embryo. The average thickness of shells was  $400.9 \pm 6.0 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SEM), while the number of open pores/cm<sup>2</sup> was  $25.3 \pm 4.3$  (mean  $\pm$  SEM). We

did not observe significant correlation between the thickness of the shell and the concentrations of COCs. On the other hand, the number of pores/cm<sup>2</sup> was negatively correlated with the content of COCs, demonstrating that a higher concentration of COCs is associated with a reduction in the number of shell pores/cm<sup>2</sup>. While the thickness and porosity did not affect the percentage of live births, the lowest number of pores/cm<sup>2</sup> correlated with decreased survival of the animals at 10 days of age. Therefore, these results allowed us to propose an indirect deleterious effect caused by COCs of early postnatal survival, mediated by a decrease in the density of pores in the shell of the eggs.

It was found that 61.3% of neonates showed complete abdominal scarring, 16.1% with partial healing and 22.6% showed herniation, whereas only 4.5% demonstrated orofacial malformations.

#### Experimental exposure

BMI and BCI rates showed no differences between males and females in the control group at 6, 12 and 18 months old. On the other hand, the BMI of E2 (0.014ppm)-treated females was lower than BMI-males at 12 months old, being similar in the rest of the assessed ages. ATZ, END or BPA did not generate sexual dimorphism for the BMI or the BCI in any of the evaluated ages.

The total length and height of the head of the *phallus* are dimorphic variables in caimans of 12, 18 and 24 months old; dimorphism for the width of the head of the *phallus* is not observed. *In ovo* exposure to ATZ and END induced a significant reduction of the female *phallus*, evidenced by a shorter overall length and width of the head. BPA and E2 did not cause changes in the size of the *phallus* of the females, while none of the tested pollutants modified the *phallus* morphometry in males. The sexual dimorphism of the length of the *phallus* and the height of the head of the *phallus* were not altered by ATZ, END, BPA or E2. However, the width of the females *phallus* head was lower with respect to males due to treatment with ATZ or END. This sexual dimorphism was not present in untreated animals.

The length of the female *phallus* obtained by DSH (eggs incubated at 33° C and topicated with estradiol 1.4 ppm), were similar to the *phallus* of females obtained by DST (eggs incubated at 30° C), showing that the sex-reversal process also occurs at the level of secondary sexual characteristics development. This allows us to conclude that exposure to 17- $\beta$  estradiol in a dose of 1.4 ppm is a determining factor and it prevails on the influence of temperature.

No sexual dimorphism was observed in any of the craniofacial variables evaluated in the control animals. Only treatment with ATZ generated dimorphism of the interorbital minimum width (IOW). The females treated with END showed a reduction of the IOW for females controls, while no changes were observed in males. ATZ-exposed females showed a decrease in the maximum width of the nostrils, at the base of the snout and head with respect to female controls. The rest of the craniofacial variables of the females were not affected by exposure to the pollutants.

Animals were divided into two subpopulations: 125-900 and 901-3100g. The average erythrocytes count was  $5.58 \pm 0.68$  and  $7.27 \pm 0.16 \times 10^5/\text{mm}^3$  of peripheral blood for 125-900g and 901-3100g, respectively. The white blood cell count was  $16.57 \pm 8.21$  (125-900 g) and  $25.61 \pm 4.98 \times 10^3/\text{mm}^3$  (901-3100g), and were classified as: heterophils, lymphocytes, eosinophils, basophils and monocytes. Animals treated with E2 (1.4 ppm), showed a decrease in the value of the hematocrit in the group of lighter animals (125-900 g). On the other hand, the agro-industrial compounds caused no alterations in the values of red and white blood cells, hematocrit and hemoglobin. ATZ-treated animals showed a decrease in the number of leukocytes, while those treated with E2 (1.4 ppm) showed a reduction in the number of erythrocytes and hematocrit when animals became heavier (901-3100g).

The chemical composition of the blood cells was studied by classic cytochemistry, assessing the presence and cellular distribution of enzymes and cellular components (peroxidase, polysaccharides, mucopolysaccharides, glycoproteins, glycolipids, and lipids). Heterophils and platelets were positive

with the periodic acid-Schiff, being eosinophils weakly positive. Sudan Black B were present in heterophils and faintly in eosinophils. Peroxidase was observed in erythrocytes, heterophils and eosinophils.

In terms of the size of the components of the peripheral blood of *C. latirostris* controls, monocytes have a larger cell area ( $169.4 \pm 31.2\mu\text{m}^2$ ) with respect to lymphocytes ( $52.6 \pm 14.3\mu\text{m}^2$ ). Cell with highest perimeter was the monocyte ( $48.5 \pm 5, 2\mu\text{m}$ ), and with the largest cytoplasm diameter was the erythrocyte ( $17.3 \pm 1, 4\mu\text{m}$ ).

Humoral innate immunity was evaluated in 14 untreated caiman of 12 and 24 months old. The serum hemolytic activity was not influenced by gender. Females showed a 56.5% of maximum hemolytic activity, while in males was 48.5%. The CH50 was established in 7.1%. There were no changes in the percentages of hemolysis of treated animals.

Serum levels of glucose, urea, cholesterol, uric acid, triglycerides, creatinine, total bilirubin, total protein, albumin and globulins and serum activity of enzymes alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, creatine kinase were not modified by exposure *in ovo* to ATZ, END, BPA or E2, being similar to the animals in the control group. However, a percentage of the animals in each group present values outside of reference range previously established, mainly those related to an alteration of liver function and bile pathways.

## Conclusions

The results obtained in this thesis allow us to affirm that:

- The three geographic areas evaluated exhibited similar levels of COCs and a wide variety of compounds. Oxichlordane and members of DDT family were found in high concentration and frequency. These results disagree with the preliminary classification of degree of human intervention of the different areas and demonstrate the globalization of pollution. The END was detected only in two nests of the province of Entre Ríos, in agreement with the intense

agricultural activity in this area, and reinforcing the concept that COCs levels in the eggs reflect historical contamination of the assessed region.

-The levels of COCs showed an association with certain variables of relevance in the reproduction of *C. latirostris*. We detected that higher concentration of COCs is directly associated to a smaller number of eggs per nest. On the other hand, a high number of COCs in eggs was associated with a lower porosity of shell, which was correlated with a low survival at 10 days of life. Therefore, we propose an indirect effect of the COCs on early postnatal survival, possibly mediated by a deficit in gaseous exchange by a reduced number of pores in the shell.

-The caimans growth was not affected by exposure to BPA, ATZ or END. However, some variable dimorphic as craniofacial morphometry and the structure of the *phallus* showed alterations caused by ATZ or END. The upper region of the skull is different between males and females, and to identify a female, the male evaluate the region of the head that is exposed on the surface of the water. The results presented here suggest that alterations caused mainly by ATZ could hinder visual recognition of females by males in the water. On the other hand, the structure of the female clitoris/penis is modified by exposure to ATZ or END, allowing us to propose these parameters as biomarkers of effect by exposure to these contaminants.

In this thesis, we established the reference values of biochemical and hematological profiles of *C. latirostris* in association to their body weight and also we characterized the cytochemistry of peripheral blood cells. Innate immunity was not altered by exposure to ATZ, END, BPA or E2. The levels of blood chemistry analytes showed no alterations in the experimental groups. However, when analyzed individually, several of these animals showed values outside the range established by the reference values.

Finally, several variables can be proposed as potential biomarkers of effect by exposure to pollutants classified as ED. In addition, these results enhance our knowledge of the reproductive biology of toxicity of the COCs

related to broad-snouted caimans and allow us to identify deleterious effects of COCs present in their natural habitat on the reproductive performance of the species.

# BIBLIOGRAFÍA

Akingbemi, B. T.; Sottas, C. M.; Koulova, A. I.; Klinefelter, G. R.; Hardy, M. P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145:592-603.

Al-Hiyasat, A.S.; Darmani, H.; Elbetieha, A.M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci.* 110:163-167.

Al-Hiyasat, A.S.; Darmani, H.; Elbetieha, A.M. (2004). Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci.* 112:267-272.

Alleman, A.R.; Jacobson, E.R.; Raskin, R.E. (1999). Morphologic and cytochemical characteristics, and ultrastructural characteristics of blood cells from Eastern Diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *American Journal of Veterinary Research* 60:507–513.

Allsteadt, J.; Lang, J.W. (1995). Sexual dimorphism in the genital morphology of young American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Herpetologica* 51:314-325.

Aloisi, A.M.; Della Seta, D.; Ceccarelli, I.; Farabollini, F. (2001). Bisphenol-A differently affects estrogen receptors-alpha in estrous-cycling and lactating female rats. *Neurosci Lett.* 310:49-52.

Andersen, H.R.; Andersson, A.M.; Arnold, S.F.; Autrup, H.; Barfoed, M.; Beresford, N.A.; Bjerregaard, P.; Christiansen, L.B.; Gissel, B.; Hummel, R.; Bonafel Jorgensen, E.; Korsgaard, B.; Le Guevel, R.; Leffers, H.; McLachlan, J.; Moller, A.; Nielsen, J.B.; Olea, N.; Oles-Karasko, A.; Pakdel, F.; Pedersen, K.L.; Perez, P.; Skakkeboek, E.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Sumpter, J.P.; Thorpe; Grandjean, P. (1999a). Comparison of shorter-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107:89-108.

Andersen, H.R.; Halling-Sorensen, B.; Kusk, K.O. (1999b). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44:56-61.

Anderson, M.; Vitt, L.J. (1990). Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphisms in teiid lizards. *Oecologia* 84(2):145-157.

ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica - [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar) ANMAT 7292/98

Ar. A.; Rahn, H. (1985). Pores in avian eggshells: gas conductance, gas exchange and embryonic growth rate. *Respir Physiol* 61:1-20.

Arias, A.H.; Pereyra, M.T.; Marcovecchio, J.E. (2011). Multi-year monitoring of estuarine sediments as ultimate sink for DDT, HCH, and other organochlorinated pesticides in Argentina. *Environ Monit Assess* 172(1-4):17-32.

Ashpole, S.L.; Bishop, C.A.; Brooks, R.J. (1999). Contaminant residues in snapping turtle (*Chelydras. serpentina*) eggs from the Great Lakes-St. Lawrence River basin. *Arch Environ Contam Toxicol* 47(2):240-252.

Aubé, M.; Larochelle, C.; Ayotte, P. (2011). Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environ Res.* 111(3):337-347.

Axiak, V.; Micallef, D.; Muscat, J.; Vella, A.; Mintoff, B. (2003). Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ Int.* 28(8):743-9.

Banerjee, B.D.; Hussain, Q.Z. (1986). Effects of sub-chronic endosulfan exposure on humoral and cell mediated immune responses in albino rats. *Arch. Toxicol.* 59:279-284.

Banerjee, B.D.; Hussain, Q.Z. (1987). Effects of endosulfan on humoral and cell mediated immune responses in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38:435-441.

Barboza, N.N.; Mussart, N.B.; Coppo, J.A.; Fioranelli, S.A.; Koza, G.A. (2008). El medio interno de *Caiman latirostris* en cautiverio. Influencia del sexo, crecimiento y estación del año. *Revista Veterinaria* 19:33–41.

Bargar, T.A.; Sills-McMurry, C.; Dickerson, R.L.; Rhodes, W.E.; Cobb, G.P. (1999). Relative distribution of polychlorinated biphenyls among tissues of neonatal American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37:364-368.

Bargar T.A.; Scott, G.I.; Cobb, G.P. (2001). Uptake and Distribution of Three PCB Congeners and Endosulfan by Developing White Leghorn Chicken Embryos (*Gallus domesticus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 508 –514.

Barni, S.; Boncompagni, E.; Grosso, A.; Bertone, V.; Freitas, I.; Fasola, M.; Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81:45-54.

Beato, M.; Sánchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587-609.

Beldoménico, P.M.; Rey, F.; Prado, W.S.; Villarreal, J.C.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2007). In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf* 68(2):246-251.

Bergeron, J.M.; Crews, D.; McLachlan, J.A. (1994). PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102:780-781.

Bhatti, J.S.; Sidhu, I.P.; Bhatti, G.K. (2011). Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem* 353:139-149.

Borteiro, C.; Gutiérrez, F.; Tedros, M.; Kolenc, F. (2008). Conservation status of *caiman latirostris* (crocodylia: alligatoridae) in disturbed landscapes of northwestern Uruguay. Conservation status of *Caiman latirostris* South American. *Journal of Herpetology* 3(3):244-250.

Bosquiazso, V.L.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H., Ramos, J.G. (2010). Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. *Biol Reprod.* 82(1):86-95.

Briz, V.; Galofré, M.; Suñol, C. (2010). Reduction of glutamatergic neurotransmission by prolonged exposure to dieldrin involves NMDA receptor internalization and metabotropic glutamate receptor 5 downregulation. *Toxicol Sci.* 113(1):138-49.

Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos, M.; Pedraza, V.; Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103:608-612.

Bryan, A.M.; Stone, W.B.; Olafsson, P.G. (1987). Disposition of toxic PCB congeners in snapping turtle eggs: expressed as toxic equivalents of TCDD. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39:791-796.

Burlington, H.; Lindeman, V.F. (1950). Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 74:48-51.

Burow, M.E.; Tang, Y.; Collins-Burow, B.M.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; McLachlan, J.A.; Beckman, B.S. (1999). Effects of environmental estrogens on

tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 20:2057-2061.

Bustnes, J.O.; Helberg, M.; Strann, K.B.; Skaare, J.U. (2006). Environmental pollutants in endangered vs. increasing subspecies of the lesser black-backed gull on the Norwegian Coast. *Environ Pollut.* 144(3):893-901.

Calafat, A.M.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J.A.; Caudill, S.P.; Ekong, J.; Needham, L.L. (2008). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391-395.

Callewaert, F.; Sinnesael, M.; Gielen, E.; Boonen, S.; Vanderschueren, D. (2010). Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinol.* 207(2):127-134.

Campbell, T.W. (1996). *Reptile Medicine and Surgery. Clinical Pathology.* (Mader, D.R.). Saunders Company, Philadelphia, PA. 248–257.

Campbell, T.W. (2004). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Hematology of reptiles.* (Thrall, M.A.). Williams and Wilkins, Philadelphia Lippincott. 259–276.

Campoy, C.; Jimenez, M.; Olea-Serrano, M.F.; Moreno-Frias, M.; Canabate, F.; Olea, N.; Bayes, R.; Molina-Font, J.A. (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum. Dev.* 65:183-190.

Carey, C.; Cohen, N.; Rollins-Smith, L. (1999). Amphibians declines: an immunological perspective. *Develop. Comp. Immunol.* 23:459-472.

Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ Clinical research* 305:609-613.

Carr, J.A.; Gentles, A.; Smith, E.E.; Goleman, W.L.; Urquidi, L.J.; Thuett, K.; Kendall, R.J.; Giesy, J.P.; Gross, T.S.; Solomon, K.R.; Van Der Kraak, G. (2003). Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ Toxicol Chem* 22:396–405.

Casal, A.; Oro's, J. (2007). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science* 82:158–165.

Cesh, L.S.; Elliott, K.H.; Quade, S.; McKinney, M.A.; Maisoneuve, F.; Garcelon, D.K.; Sandau, C.D.; Letcher, R.J.; Williams, T.D.; Elliott, J.E. (2010). Polyhalogenated aromatic hydrocarbons and metabolites: Relation to circulating thyroid hormone and retinol in nestling bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Environ Toxicol Chem.* 29(6):1301-1310.

Chakravarty, S.; Lahiri, P. (1986). Effect of lindane on eggshell characteristics and calcium level in the domestic duck. *Toxicology* 42:245-258.

Chitra, K.C.; Latchoumycandane, C.; Mathur, P.P. (1999). Chronic effect of endosulfán on the testicular functions of rat. *Asian Journal of Andrology* 1:203-206.

Chitra, K.C.; Latchoumycandane, C.; Mathur, P.P. (2003). Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185:119-127.

Cid, F.D.; Anton, R.I.; Caviedes-Vidal, E. (2007). Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Sci Total Environ* 385:86–96.

Clark, K.E.; Stansley, W.; Niles, L.J. (2001). Changes in contaminant levels in New Jersey osprey eggs and prey, 1989 to 1998. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40(2):277-84.

Cobb, G.; Houlis, P.D.; Bargar, T.A. (2002). Polychlorinated biphenyl occurrence in American alligators (*Alligator mississippiensis*) from Louisiana and South Carolina. *Environmental Pollution* 118:1–4.

Colborn, T.; Clements, C. (1992). Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. (Colborn, T.; Clements, C.). Princeton Scientific Publishing, Princeton, NY. 403.

Colborn, T.; Vom Saal, F.S.; Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrinedisrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101:378-384.

Colborn, T. (1995). Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. *Environ Health Perspect.* 103:81-85.

Cooper, W.E.; Vitt, L. J. (1993). Female mate choice of large male broad-headed skinks. *Animal Behaviour* 45(4):683-693.

Cormier, D.A.; Daniel, F.B. (1994). Biomarkers: taking science forward. *Environ. Toxicol. Chem.* 13:1011-1012.

Crain, D.A.; Guillette, L.J.; Rooney, A.A.; Pickford, D.B. (1997). Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perpesct.* 105:528-533.

Crain, D.A.; Spiteri, I.D.; Guillette, L.J.Jr. (1999). The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed in ovo to atrazine, 2,4-D, or estradiol. *Toxicol. Ind. Health* 15:180-185.

Crain, D.A.; Guillette, L.J.; Pickford, D.B.; Percival, H.F.; Woodward, A.R. (1998). Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators

(*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida. Environ Toxicol Chem. 17:446-452.

Crews, D.; Willingham, E.; Skipper, J.K. (2000). Endocrine disruptors: present issues, future directions. Q. Rev. Biol. 75:243-260.

Custer, T.W.; Custer, C.M.; Hines, R.K.; Stromborg, K.L.; Allen, P.D.; Melancon, M.J.; Henshel, D.S. (2001). Organochlorine contaminants and biomarker response in double-crested cormorants nesting in Green Bay and Lake Michigan, Wisconsin, USA. Arch Environ Contam Toxicol. 40:89-100.

Dalsenter, P.R.; Dallegrove, E.; Mello, J.R.; Langeloh, A.; Oliveira, R.T.; Faqi, A.S. (1999). Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. Hum Exp Toxicol. 18:583-589.

Damstra, T.; Barlow, S.; Bergman, A.; Kavlock, R.; Van Der Kraak, G. (2002). International programme of chemical safety Global Assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization 180.

Damgaard, I.N.; Skakkebaek, N.E.; Toppari, J.; Virtanen, H.E.; Shen, H.; Schramm, K.W.; Petersen, J.H.; Jensen, T.K.; Main, K.M.; Nordic Cryptorchidism Study Group. (2006). Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. Environ Health Perspect. 114(7):1133-1138.

Danzo, B.J. (1998). The effects of environmental hormones on reproduction. Cell. Molec. Life Sci. 54:1249-1264.

Davis, W.P.; Bortone, S.A. (1992). Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. Effects of kraft mill effluent on sexuality of fishes. An environmental early warning? (Colborn, T.; Clement, C.). Princeton Sci. Publ., Princeton. 113-127.

Davis, D.L.; Bradlow, H.L.; Wolff, M.; Woodruff, T.; Hoel, D.G.; Anton-Culver, H. (1993). Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. Environ. Health Perspect. 101:372-377.

de Solla, S.R.; Bishop, C.A.; Lickers, H.; Jock, K. (2001). Organochlorine Pesticides, PCBs, Dibenzodioxin, and Furan Concentrations in Common Snapping Turtle Eggs (*Chelydra serpentina serpentina*) in Akwesasne, Mohawk Territory, Ontario, Canada. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40:410-417.

de Solla, S.R.; Fernie, K.J. (2004). Characterization of contaminants in snapping turtles (*Chelydra serpentina*) from Canadian Lake Erie Areas of Concern: St. Clair River, Detroit River, and Wheatley Harbour. Environ Pollut. 132(1):101-12.

de Solla, S.R.; Fernie, K.J.; Ashpole, S. (2008). Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in Canadian areas of concern in the Great Lakes Basin. II. Changes in hatching success and hatchling deformities in relation to persistent organic pollutants. Environ Pollut. 153(3):529-36.

Degen, G.H.; Bolt, H.M. (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. Int Arch Occup Environ Health 73:433-41.

Dickinson, V.M.; Jarchow, J.L.; Trueblood, M.H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. Journal of Wildlife Diseases 38:143–153.

Dixon, K.M.; Mason, R.S. (2009). Vitamin d. Int J Biochem Cell Biol. 41(5):982-5.

Dodds, E.C.; Lawson, W. (1936). Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. Nature 131:996.

Durando, M.; Kass, L.; Piva, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. Environ Health Perspect. 115:80-86.

Dutta, H.M.; Misquitta, D.; Khan, S. (2006). The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: A histopathological study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 149–156.

Eldridge, J.C.; Wetzel, L.T.; Stevens, J.T.; Simpkins, J.W. (1999). The mammary tumor response in triazine-treated female rats: A threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. *Steroids* 64:672–678.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889-895.

Feist, G.W.; Webb, M.A.; Gundersen, D.T.; Foster, E.P.; Schreck, C.B.; Maule A.G.; Fitzpatrick, M.S. (2005). Evidence of detrimental effects of environmental contaminants on growth and reproductive physiology of white sturgeon in impounded areas of the Columbia River. *Environ Health Perspect.* 113:1675-1682.

Fentress, J.A.; Steele, S.L.; Bart, H.L.; Cheek, A.O. (2006). Reproductive disruption in wild longear sunfish (*Lepomis megalotis*) exposed to kraft mill effluent. *Environ Health Perspect.* 114:40-45.

Ferguson, M.W.J.; Joanen, T. (1983). Temperature dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *J. Zool. Lond.* 200:143-177.

Ferguson, M.W.J. (1985). *Biology of the Reptilia. Volumen 14: Development A. Reproductive biology and embryology of the crocodilians.* (Gans, C.; Billet, F; Maderson, P.F.A.). Wiley, New York. 329-491.

Freiberg, M.A.; Carvalho, A.L. (1985). El yacaré sudamericano *Caiman latirostris* (Daudin). *Physis (Buenos Aires)* 25:351-360.

French, J.B.Jr.; Nisbet, I.C.; Schwabl, H. (2001). Maternal steroids and contaminants in common tern eggs: a mechanism of endocrine disruption? *.Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 128(1):91-8.

Friedmann, A.S. (2002). Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod Toxicol.* 16(3):275-279.

Fry, D.M.; Toone, C.K. (1981). DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213:922-924.

Fry, D.M. (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ. Health Perspect.* 103:165-171.

Funabashi, T.; Sano, A.; Mitsushima, D.; Kimura, F. (2003). Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol.* 15:134-140.

Funabashi, T.; Nakamura, T.J.; Kimura, F. (2004). p-Nonylphenol, 4-tert-octylphenol and bisphenol A increase the expression of progesterone receptor mRNA in the frontal cortex of adult ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol* 16:99-104.

Ganong, W. (1992). *Fisiología médica*, 13 edición. El Manual Moderno, Mexico. 744.

Gilbert, S.F. (2006). *Developmental Biology Eighth Edition.* (Gilbert, S.F.; Singer, S.) Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. 751.

Gitton, Y.; Heude, E.; Vieux-Rochas, M.; Benouaiche, L., Fontaine, A.; Sato, T.; Kurihara, Y.; Kurihara, H.; Couly, G., Levi, G. (2010). Evolving maps in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol.* 21(3):301-8.

Glassman, B.A.; Bennett, C.A.; Hazen, T.C. (1981). Peripheral blood components in *Alligator mississippiensis*. *Transactions of the American Microscopical Society* 100:210–215.

Goebel, H.; Gorbach, S.; Knauf, W.; Rimpau, R.H.; Huttenbach, H. (1982). Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue Rev.* 83:1-165.

Gonzalez, M. (2003). Efecto de la exposición prenatal a agroquímicos sobre el sistema reproductor de yacaré overo (*Caiman latirostris*). Tesina, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

González Sagrario, M.L.; Miglioranza, K.S.; Aizpún de Moreno, J.E.; Moreno, V.J.; Escalante, A.H. (2002). Polychlorinated biphenyls in different trophic levels from a shallow lake in Argentina. *Chemosphere* 48(10):1113-1122.

Gormley, K.L.; Teather, K.L. (2003). Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:330-338.

Gray, L.E.; Ostby, J.S.; Kelce, W.R. (1994a). Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129:46-52.

Gray, L.E.; Ostby, J.; Furr, J.; Wolf, C.J.; Lambright, C.; Parks, L.; Veeramachaneni, D.N.; Wilson, V.; Price, M.; Hotchkiss, A.; Orlando, E.; Guillette, L. (2001). Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals *Hum Reprod Update* 7:248-264.

Grigg, G.C. (1993). Wildlife management: crocodiles and alligators. Water relations of crocodilian eggs: management considerations. (Webb, J.W.; Manolis, S.C.; Whitehead, P.J.). Surrey Beatty and Sons Pty Lt in association with the Conservation Commission of the Northern Territory. 499-502.

Grignaschi, V.J. (1991). Diagnóstico citológico de las hemopatías. Editorial Médica Panamericana, Madrid. 514.

Gross, T.S.; Smith, E.E.; Wiebe, E.; Sepulveda, M.S.; Carr, J.; Du Preez, L.H. (2003). An evaluation of gonadal anomalies and agrichemical exposures for the cane toad (*Bufo marinus*) in south Florida. In: 24th Annual Meeting in North America, Soc Environ Toxicol Chem, Austin, Texas. Available: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2003>

Grün, F.; Blumberg, B. (2009). Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol.* 304(1-2):19-29.

Guillette, L.J.; Crain, D.A.; Rooney, A.A.; Pickford, D.B. (1995a). Organization versus activation: The role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103:157-164.

Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Gross, D.; Rooney, A.A.; Percival, H.F. (1995b). Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated and control lakes. *Environ. Health Perspect.* 103:31-36.

Guillette, L.J.; Crain, D.A. (1996). Endocrine-disrupting contaminants and reproductive abnormalities in reptiles. *Comments Toxicology* 5:381-399.

Guillette, L.J.; Pickford, D.B.; Crain, D.A.; Rooney, A.A.; Percival, H.F. (1996). Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101:32-42.

Guillette, L.J.; Woodward, A.R.; Crain, D.A.; Masson, G.R.; Palmer, B.D.; Cox, M.C.; You-Xiang, Q.; Orlando, E.F. (1997). The reproductive cycle of the female American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 108:87-101.

Guillette, L.J.; Brock, J.W.; Rooney, A.A.; Woodward, A.R. (1999a). Serum concentrations of various environmental contaminants and their relationship to sex steroid concentrations and *phallus* size in juvenile American alligators. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36:447-455.

Guillette, L.J.; Rooney, A.A.; Crain, D.A.; Orlando, E.F. (1999b). Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment. Steroids hormones as biomarkers of endocrine disruption in wildlife. (Henshel, D.S.; Black, M.C.; Harrass, M.C.) American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, P.A. 254-270.

Guillette, L.J.; Woodward, A.R.; Crain, D.A.; Pickford, D.B.; Rooney, A.A.; Percival, H.F. (1999c). Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116:356-372.

Guillette, L.J.; Crain, D.A.; Gunderson, M.P.; Kools, S.A.E.; Milnes, M.R.; Orlando, E.F.; Rooney, A.A.; Woodward A.R. (2000). Alligators and endocrine disrupting contaminants: a current perspective. *Amer. Zool.* 40:438-452.

Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Masson, G.R.; Matter, J.M.; Percival, H.F.; Woodward, A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102:680-688.

Guillette, L.J. Jr.; Edwards, T.M. (2008). Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife? *Fertil Steril* 89(2):21-24.

Gunderson, M.P.; Bermudez, D.S.; Bryan, T.A.; Degala, S.; Edwards, T.M.; Kools, S.A.; Milnes, M.R.; Woodward, A.R.; Guillette, L.J. Jr. (2004). Variation in sex steroids and *phallus* size in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) collected from 3 sites within the Kissimmee-Everglades drainage in Florida (USA). *Chemosphere.* 56:335-345.

Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224:61-68.

HACC: Herpetological Animal Care and Use Committee. (2004). Sociedad Americana de ictiólogos y herpetólogos. (Beaupre, S.J.; Jacobson, E.R.; Lillywhite, H.B.; Zamudio K.). 1-43.

Hall, R.J.; Clark, D.R. (1982). Responses of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organophosphorous pesticides. *Environ. Pollut.* 28:45-52.

Hall, R.J.; Henry, P.F.P. (1992). Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetol. J.* 2:65-71.

Hall, P.M.; Portier, K.M. (1994). Cranial morphometry of New Guinea crocodiles (*Crocodylus novaeguineae*): ontogenetic variation in relative growth of the skull and an assessment of its utility as a predictor of the sex and size of individuals. *Herpetological Monographs* 8:203-225.

Harper, N.; Connor, K.; Safe, S. (1993). Immunotoxic potencies of polychlorinated biphenyl (PCB), dibenzofuran (PCDF) and dibenzo-p-dioxin (PCDD) congeners in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicology* 80:217-227.

Hayes, T.; Collins, A.; Lee, M.; Mendoza, M.; Noriega, N.; Stuart, A.A.; Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* 99:5476-5480.

Hayes, T.; Haston, K.; Tsui, M.; Hoang, A.; Haeffele, C.; Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environ Health Perspect* 111:568-575.

Hayes, T.B.; Stuart, A.A.; Mendoza, M.; Collins, A.; Noriega, N.; Vonk, A.; Johnston, G.; Liu, R.; Kpodzo, D. (2006). Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (*cyproterone acetate*) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ Health Perspect.* 114(1):134-41.

Hayes, T.B.; Khoury, V.; Narayan, A.; Nazir, M.; Park, A.; Brown, T.; Adame, L.; Chan, E.; Buchholz, D.; Stueve, T.; Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(10):4612-4617.

Hayes, T.B.; Anderson, L.L.; Beasley, V.R.; de Solla, S.R.; Iguchi, T.; Ingraham, H.; Kestemont, P.; Kniewald, J.; Kniewald, Z.; Langlois, V.S.; Luque, E.H.; McCoy, K.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Oka, T.; Oliveira, C.A.; Orton, F.; Ruby, S.; Suzawa, M.; Tavera-Mendoza, L.E.; Trudeau, V.L.; Victor-Costa, A.B.; Willingham, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127(1-2):64-73.

Hawkey, C.M.; Bennett, P.M.; Gascoyne, S.C.; Hart, M.G.; Kirkwood, J.K. (1991). Erythrocyte size, number and hemoglobin content in vertebrates. *Br J Haematol* 77:392–397.

Herbst, A.L.; Ulfelder, H.; Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N. Engl. J. Med.* 284:878-881.

Heinz, G.H.; Percival, H.F.; Jennings, M.L. (1991). Contaminants in American alligator eggs from Lake Apopka, Lake Griffin, and Lake Okeechobee, Florida. *Environ Monit Assess* 16:277-28.

Hiremath, M.B.; Kaliwal; B.B. (2002). Effect of endosulfan on ovarian compensatory hypertrophy in hemicastrated albino mice. *Reproductive Toxicology* 16:783–790.

Honma, S.; Suzuki, A.; Buchanan, D.L.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol* 16:117-122.

Howdeshell, K.L.; Hotchkiss, A.K.; Thayer, K.A.; Vandenbergh, J.G.; vom Saal,

F.S. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764.

Howdeshell, K.L.; Peterman, P.H.; Judy, B.M.; Taylor, J.A.; Orazio, C.E.; Ruhlen, R.L.; vom Saal, F.S.; Welshons W.V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health Perspect.* 111:1180-1187.

Howe, S.R.; Borodinsky, L. (1998). Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. *Food Addit. Contam.* 15:370-375.

Howell, W.M.; Black, D.A.; Bortone, S.A. (1980). Abnormal expression of secondary sex characters in population of mosquitofish *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia* 4:676-681.

Huchzermeyer, F.W. (2003). *Crocodiles: Biology, Husbandry and Diseases. Transmissible diseases.* (Huchzermeyer, F.W.). CABI Publishing, Cambridge, MA, 167–169.

Hugget, R.J.; Kimerle, R.; Mehrle, P.; Bergman, H.; Dickson, K.; Fava, J.; McCarthy, J.; Parrish, R.; Dorn, P.; McFarland, V.; Lahvis, G. (1992). Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Biomarkers.* (Hugget, R.J.; Kimerle, R.; Mehrle, P.; Bergman, H.; Dickson, K.; Fava, J.; McCarthy, J.; Parrish, R.; Dorn, P.; McFarland, V.; Lahvis, G.). Lewis, Chelsea. 110-138.

Hughes, C.L. Jr. (1988). Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 78:171-174.

Hurley, P.M. (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Health Perspect.* 106:437-445.

ISIS .International Species Information System ). (1999). Physiological Data Reference Values. [www.southcampus.colostate.edu/zoo/book1/INT\\_BOOK.htm](http://www.southcampus.colostate.edu/zoo/book1/INT_BOOK.htm).

Iovine, E.; Selva, A. (1985). El Laboratorio en la Clínica (3ra edición). Editorial Medica Panamericana. 1431.

Jacobson, E.R. (2007). Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. (Jacobson, E.R.). Taylor & Francis Group. Broken Sound Parkway NW. 131-167.

Janesick, A.; Blumberg, B. (2011). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. Birth Defects Res C Embryo Today. 93(1):34-50.

Jeyakumar, S.M.; Lopamudra, P.; Padmini, S.; Balakrishna, N.; Giridharan, N.V.; Vajreswari, A. (2009). Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rat strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. Nutr Metab (Lond). 11:6-27.

Jiménez, M.; Rivas, M.; Olea, F.; Olea, N. (2004). Pesticidas organoclorados en suero y tejido adiposo de mujeres del sureste español. Ecosistemas. Revista científica y técnica de ecología y medioambiente, 1-7.

Joanen, T.; McNeasen, L. (1987). Wildlife management: crocodiles and alligators. Alligator farming research in Louisiana, USA. (Webb, G.J.W.; Manolis, S.C.; Whitehead, P.J.). Surrey Beatty and Sons Pty, Chipping Norton. 32:329-340.

Jofré, M.B.; Antón, R.I.; Caviedes-Vidal, E. (2008). Organochlorine contamination in anuran amphibians of an artificial lake in the semiarid midwest of Argentina. Arch Environ Contam Toxicol. 55(3):471-80.

Jorgenson, J.L. (2001). Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ Health Perspect.* 109(1):113-39.

Junqueira, L.C.U.; Junqueira, M.M.S. (1983). *Técnicas básicas en citología e histología.* (Eds: Livraria Editora Santos) São Paulo, Brasil.

Kamijima, M.; Casida, J.E. (2000). Regional modification of Ethynylbicycloorthobenzoate binding in mouse brain GABA(A) receptor by endosulfan, fipronil, and avermectin B(1a). *Toxicol Appl Pharmacol.* 163(2):188-94.

Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (1993). Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395.

Keithmaleesatti, S.; Thirakhupt, K.; Pradatsudarasar, A.; Varanusupakul, P.; Kitana, N.; Robson, M. (2007). Concentration of organochlorine in egg yolk and reproductive success of *Egretta garzetta* (Linnaeus, 1758) at Wat Tan-en non-hunting area, Phra Nakhorn Si Ayuthaya Province, Thailand. *Ecotoxicol Environ Saf.* 68(1):79-83.

Kelce, W.R.; Monosson, E.; Gamcsik, M.P.; Laws, S.C.; Gray, L.E. (1994). Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126:276-285.

Kniewald, J.; Jakominic, M.; Tomljenovic, A.; Simic, B.; Romac, P.; Vranesic, D.; Kniewald, Z. (2000). Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol.* 20:61-68.

Knobil, E.; Chair. Committee on hormonally active agents in the environment. (1999). *Hormonally active agents in the environment.* (National Research Council). National Research Council, Washington, DC.

Krishnan, A.V.; Starhis, P.; Permuth, S.F.; Tokes, L.; Feldman, D.; (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.

Kuiper, G.G.J.M.; Lemmen, J.G.; Carlsson, B.; Corton, J.C.; Safe, S.H.; Van der Saag, P.T.; Van der Burg, B.; Gustafsson, J. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.

Lajmanovich, R.C.; Izaguirre, M.F.; Casco, V.H. (1998). Paraquat tolerance and Alteration of internal gills structures of *Scinax nasica tadpoles* (Anura: Hylidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34 (4): 364-369.

Lajmanovich, R.; Lorenzatti, E.; de la Sierra, P.; Marino, F.; Peltzer, P. (2002). First records of organochlorine pesticide residues in amphibians of the mesopotamic region, Argentina. *Froglog* 54.

Lajmanovich, R.; Lorenzatti, E.; Lenardón, A.; de la Sierra, P.; Marino, F.; Peltzer, P. (2003). Residuos de pesticidas clorados en fauna silvestre de agroecosistemas de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, Argentina. Libro de resúmenes VI congreso SETAC Latinoamérica. 44.

Lajmanovich, R.C.; Sandoval, M.T.; Peltzer, P.M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70:612-618.

Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Peltzer, P.M.; Stringhini, G.A.; Attademo, A.M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587 (1-2): 67-72.

Lang, J.W.; Andrews, H.V. (1994). Temperature dependent sex determination in crocodylians. *J. Exp. Zool.* 270:28-44.

Larriera, A. (1995). La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina, Vol. 1. Áreas de nidificación y momento óptimo de cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. 221-232.

Leal de Moura, W.; Oliveira, L.W.; Egami, M.I. (1997). Aspectos ultraestructurales de trombocitos eosinófilos y heterofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Revista Chilena de Anatomía* 15:201–208.

Le Petit-Thevenin, J.; Lérique, B.; Nobili, O.; Boyer, J. 1991. Estrogen modulates phospholipid acylation in red blood cells: relationship to cell aging. *Am J Physiol.* 423-427.

Levy, G.; Lutz, I.; Kruger, A.; Kloas, W. (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res.* 94:102-111.

Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A. (2003). Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75 (5): 631–681.

Lundholm, C.D. (1997). DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 118(2):113-28.

Maitre, M.I.; de la Sierra, P.; Lenardon, A.; Enrique, S.; Marino, F. (1994). Pesticide residue levels in Argentinian pasteurised milk. *Sci. Total Environ.* 155:105-108.

Mañosa, S.; Mateo, R.; Freixa, C.; Guitart, R. (2003). Persistent organochlorine contaminants in eggs of northern goshawk and Eurasian buzzard from northeastern Spain: temporal trends related to changes in the diet. *Environ Pollut.* 122(3):351-9.

Margni, R.A. 1980. Inmunología e inmuoquímica: fundamentos. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 976.

Markey, C.M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.M.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; (2001a). In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* 65:1215-1223.

Martin, M.B.; Reiter, R.; Pham, T.; Avellanet, Y.R.; Camara, J.; Lahm, M.; Pentecost, E.; Pratap, K.; Gilmore, B.A.; Divekar, S.; Dagata, R.S.; Bull, J.L.; Stoica, A. (2003). Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144:2425-2436.

Mast, M.A.; Foreman, W.T.; Skaates, S.V. (2007). Current-use pesticides and organochlorine compounds in precipitation and lake sediment from two high-elevation national parks in the Western United States. *Arch Environ Contam Toxicol.* 52(3):294-305.

Mateo, M.R.; Roberts, E.D.; Enright, F.M. (1984). Morphologic, cytochemical, and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *American Journal of Veterinary Research* 45:1046-1053.

Matsushita, S.; Yamashita, J.; Iwasawa, T.; Tomita, T.; Ikeda, M. (2006). Effects of in ovo exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. *Poult Sci.* 85(9):1641-1647.

Matter, J.M.; Crain, D.A.; Sills-McMurry, C.; Pickford, D.B.; Rainwater, T.R.; Reynolds, K.D.; Rooney, A.A.; Dickerson, R.L.; Guillette, L.J. Jr. (1998). Effects of endocrine-disrupting contaminants in reptiles: alligators. (Kendall, R.; Dickerson, R.; Giesy, J.; Suk, W.). *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife.* SETAC Pr, Pensacola, FL. 267-289.

McLachlan, J.A. (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 22:319-341.

MC-Pherson, R.A.; Pincus, M.R. (2007). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.

Menone, M.L.; Aizpun de Moreno, J.E.; Moreno, V.J.; Lanfranchi, A.L.; Metcalfe, T.L.; Metcalfe, C.D. (2000). PCBs and organochlorines in tissues of silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a coastal lagoon in Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol*. 38:202-208.

Menone, M.L.; Aizpún De Moreno, J.E.; Moreno, V.J.; Lanfranchi, A.L.; Metcalfe, T.L.; Metcalfe, C.D. (2001). Organochlorine pesticides and PCBs in a southern Atlantic coastal lagoon watershed, Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol*. 40(3):355-62.

Menone, M.L.; Miglioranza, K.S.; Botto, F.; Iribarne, O.; Aizpún de Moreno, J.E.; Moreno, V.J. (2006). Field accumulative behavior of organochlorine pesticides. The role of crabs and sediment characteristics in coastal environments. *Mar Pollut Bull*. 52(12):1717-1724.

Merchant, M.E.; Roche, C.; Thibodeaux, D.; Elsey, R.M.; Prudhomme, J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 136:505-513.

Merchant, M.E.; Roche, C.M.; Thibodeaux, D.; Elsey, R.M., (2005). Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 141:281-288.

Merchant, M.; Leger, N.; Jerkins, E.; Mills, K.; Pallansch, M.B.; Paulman, R.L.; Ptak, R.G. (2006a). Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immunol. Immunopathol*. 110:221-228.

Merchant, M.; Mills, K.; Leger, N.; Jerkins, E.; Vliet, K.; McDaniel, N.; (2006b). Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143:133-137.

Meucci, V.; Arukwe, A. (2005). Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquat Toxicol.* 73:1-10.

Micucci, P.A.; Waller, T. (1995). La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina, Vol. 1. Los yacarés en Argentina: hacia un aprovechamiento sustentable. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. 221-232.

Millan, J.M.; Janmaat, A.; Richardson, K.C.; Hambers, L.K.C.; Formiatti K.R. (1997). Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Australian Veterinary Journal* 75:814–817.

Milnes, M.R.; Woodward, A.R.; Rooney, A.A.; Guillette, L.J. (2002). Plasma steroid concentrations in relation to size and age in juvenile alligators from two Florida lakes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131:923-930.

Milnes, M.R.; Bryan, T.A.; Medina, J.G.; Gunderson, M.P.; Guillette, L.J. Jr. (2005). Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in Alligator mississippiensis. *Gen Comp Endocrinol.* 144:257-263.

Milnes, M.R.; Bermudez, D.S; Bryan, T.A.; Edwards, T.M.; Gunderson, M.P.; Larkin, I.L.V.; Moore, B.C.; Guillette, L.J. Jr. (2006). Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environ Res* 100:3-17.

Mittendorf, R. (1995). Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology* 51:435-445.

Miyagawa, S.; Sato, M.; Iguchi, T. (2011). Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127(1-2):51-7.

Mizuhashi, S.; Ikegaya, Y.; Matsuki, N. (2000). Pharmacological property of tributyltin in vivo and in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 8:205-212.

Monje, L.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2009). Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod Toxicol.* 28(4):435-442.

Monje, L.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2010). Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod Toxicol.* 30(4):625-634.

Montenegro, M.A.; Rojas, M. (2005). Aspectos moleculares en la formación de la cara y del paladar. *International Journal of Morphology* 23(2):185-194.

Moore, A.; Waring, C.P. (1998). Mechanistic Effects of a Triazine Pesticide on Reproductive Endocrine Function in Mature Male Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62:41-50.

Moore, B.C.; Mathavan, K.; Guillette, L.J. Jr. (2012). Morphology and histochemistry of juvenile male American alligator (*Alligator mississippiensis*) phallus. *Anat Rec (Hoboken).* 295(2):328-37.

Morales-Arango, J.; Duarte-Guerrero, M.; Zúñiga, H. (2007). Caracterización físico-química del huevo del caimán llanero, *Crocodylus intermedius*, graves 1819. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 23(3):17-27.

Multigner, L.; Oliva, A. (2001). Environment as a risk factor for male infertility. *Scientific World Journal* 1:576-578.

Multigner, L.; Oliva, A. (2002). Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad. Saude Publica* 18:403-412.

Munger, R.; Isacson, P.; Hu, S.; Burns, T.; Hanson, J.; Lynch, C.F.; Cherryholmes, K.; Van Dorpe, P.; Hausler, W.J. Jr. (1997). Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environ Health Perspect* 105:308-314.

Munkittrick, K.R.; McCarty, L.S. (1995). An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up, or middle-out? *J. Aquatic Ecosystem Health* 4:77-90.

Muñoz-de-Toro, M.; Beldoménico, H.R.; García, S.R.; Stoker, C.; De Jesús, J.J.; Beldoménico, P.M.; Ramos, J.G.; Luque, E.H. (2006). Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ Res.* 102(1):107-12.

Muñoz-de-Toro, M.; Markey, C.M.; Wadia, P.R.; Luque, E.H.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146(9):4138-4147.

Mussart, N.B.; Barboza, N.N.; Fioranelli, S.A.; Koza, G.A.; Prado, W.S.; Coppo J.A. (2006). Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacaré* (Crocodylia: Alligatoridae). *Revista Veterinaria* 17:3-10.

N.R.A., National registration authority for agriculture and veterinary chemical (1998). Existing chemicals review program. Review of endosulfan 2:1-10.

Nagel, S.C.; vom Saal, F.S.; Welshons, W.V. (1999). Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6):343-57.

Naqvi, S.M.; Vaishnavi, C. (1993) Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp Biochem Physiol C.* 105:347-361.

Nikaido, Y.; Yoshizawa, K.; Danbara, N.; Tsujita-Kyutoku, M.; Yuri, T.; Uehara, N.; Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring *Reprod. Toxicol.* 18:803-811.

Nuñez otaño, N.; Imhof, A.; Bolcatto, P.; Larriera, A. (2010). Sex Differences in the Genitalia of Hatchling Caiman latirostris. *Herpetological Review* 41:32-35.

O'Hallorana, J.; Irwina, S.; Harrisona, S.; Smiddyb, P.; O'Mahonyc, B. (2003). Mercury and organochlorine content of Dipper *Cinclus cinclus* eggs in south-west Ireland: trends during 1990-1999. *Environmental Pollution* 123(1):85-93.

O'Brien, M.L.; Park, K.; In, Y.; Park-Sarge, O.K. (1999). Characterization of estrogen receptor- $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) messenger ribonucleic acid and protein expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* 140:4530-4541.

Oehlmann, J.; Markert, B.; Stroben, E.; Schulte-Oehlmann, U.; Bauer, B.; Fioroni, P. (1996). Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 354:540-554.

Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Tillmann, M.; Markert B. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the

laboratory. Part I: bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397.

Oka, T.; Nishimura, Y.; Zang, L.; Hirano, M.; Shimada, Y.; Wang, Z.; Umemoto, N.; Kuroyanagi, J.; Nishimura, N.; Tanaka, T. (2010). Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 21:10-21.

Olafsson, P.J.; Bryan, A.M.; Bush, B.; Stone, W. (1983). Snapping turtles: a biological screen for PCBs. *Chemosphere* 12:1525-1532.

Olea, N.; Pulgar, R.; Perez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M.; Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104:298-305.

Olea Serrano, N.; Fernández Cabrera, M.F.; Martín Olmedo, P. (2001). Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos Estrogénicos I. Estrógenos naturales. *Salud Ambient.* 1:6-11.

Oliva, A.; Spira, A.; Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16:1768-1776.

Oliveira-Junior, A.A.; Tavares-Dias, M.; Marcon J.L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science* 86:146–151.

Ondarza, P.M.; Gonzalez, M.; Fillmann, G.; Miglioranza, K.S. (2011). Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compound levels in brown trout (*Salmo trutta*) from Andean Patagonia, Argentina. *Chemosphere* 83(11):1597-1602.

Pandey, A.C. (1986). Response of corticosteroidogenic, catecholamine-secreting cells, corpuscles of Stannius, and Dahlgren cells of snake headed murrel *Ophiocephalus punctatus* (Bloch) to thiodan treatment. A karyometric investigation. *Ecotoxicol Environ Saf* 12: 101-104.

Pepper, C.B.; Rainwater, T.R.; Platt, S.G.; Dever, J.A.; Anderson, T.A.; McMurry, S.T. (2004). Organochlorine pesticides in chorioallantoic membranes of Morelet's crocodile eggs from Belice. *Journal of Wildlife Disease*. 40(3):493-500.

Petty, J.D.; Jones, S.B.; Huckins, J.N.; Cranor, W.L.; Parris, J.T.; McTague, T.B.; Boyle, T.P. (2000). An approach for assessment of water quality using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioindicator tests. *Chemosphere* 41:311-321.

Piazza, Y.G.; Pandolfi, M.; Lo Nostro, F.L. (2011). Effect of the organochlorine pesticide endosulfan on GnRH and gonadotrope cell populations in fish larvae. *Arch Environ Contam Toxicol*. 61(2):300-310.

Pieau, C.; Dorizzi, M.; Richard-Mercier, N. (1999). Temperature dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell. Mol. Life Sci*. 55:887-900.

Piña, C.; Larriera, A. (2007). Caiman latirostris growth: the effect of a management technique on the supplied temperature. *Aquaculture* 211:387-392.

Prado, W. (2003). Estado de conservación y aspectos poblacionales de los yacarés overo *Caiman latirostris* (Daudín, 1802) y negro *Caiman yacare* (Daudín, 1802) en relación a su hábitat en el Chaco oriental. Seminario de licenciatura. Universidad CAECE. 8-18.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Muñoz De Toro, M.; Luque, E.H. (2001). Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the

periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biol. Reprod.* 65:1271-1277.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Costabel, L.; Muñoz De Toro, M.; Luque, E.H. (2003). Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144:3206-3215.

Rauschenberger, R.H.; Sepúlveda, M.S.; Wiebe, J.J.; Szabo, N.J.; Gross, T.S. (2004). Predicting maternal body burdens of organochlorine pesticides from eggs and evidence of maternal transfer in *Alligator mississippiensis*. *Environ Toxicol Chem.* 23(12):2906-2915.

Rauschenberger, R.H.; Wiebe, J.J.; Sepúlveda, M.S.; Scarborough, J.E.; Gross, T.S. (2007). Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in American alligators. *Environ Sci Technol.* 41(15):5559-5563.

Rayner, J.L.; Word, C.; Fenton, S.E. (2004). Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195:23-34.

Regueiro-González, J.R.; López-Larrea, C.; Gonzalez-Rodríguez, S.; Martínez-Naves, E. (2003). *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. Editorial Médica Panamericana. 248.

Reizis, A.; Hammel, I.; Ar, A. (2005). Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane. *J Exp Biol.* 208(13):2483-2488.

Rey, F.; Ramos, J.G.; Stocker, C.; Bussmann, L.E.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.M. (2006). Vitellogenin detection in *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). A tool to assess environmental Estrogen exposure in wildlife. *J Comp Physiol.* 176:243-251.

Rey, F.; Gonzáles, M.; Zayas, M.A.; Stoker, C.; Durando, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2009). Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology* 162:286-292.

Richter, C.A.; Birnbaum, L.S.; Farabollini, F.; Newbold, R.R.; Rubin, B.S.; Talsness, C.E.; Vandenberg, J.G.; Walser-Kuntz, D.R.; vom Saal, F.S. (2007) In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24:199-224.

Rippen, G. (1999). *Handbuch Umweltchemikalien. Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften*, 3rd ed. 49th supplement issue. Landsberg, Ecomed. 98-142.

Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod Toxicol*. 32(3):304-12.

Rodríguez, H.A.; Kass, L.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Ortega, H.H.; Durando, M.; Muñoz-De-Toro, M.; Luque, E.H. (2003). Collagen remodelling in the guinea-pig uterine cervix at term is associated with a decrease in progesterone receptor expression. *Mol Hum Reprod*. 9(12):807-13.

Ross, P.S.; De Swart, R.L.; Reijnders, P.J.H.; Van Loveran, H.; Vos, J.G.; Osterhaus, A.D.M.E. (1995). Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environ Health Perspect* 103(2):162-167.

Routledge, E.J.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. (2000). Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem*. 275(46):35986-35993.

Russel, L.D.; Bartke, A.; Goh, J.C. (1989). Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the

rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *AMER. J. Anat.* 184:179-189.

Safe, S. (2000). Endocrine disruptors and human health-is there a problem? An update. *Environ. Health Perspect.* 108:487-493.

Safe, S. (2002). Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev. Environ. Health* 17:253-262.

Saiyed, H.; Dewan, A.; Bhatnagar, V.; Shenoy, U.; Shenoy, R.; Rajmohan, H.; Patel, K.; Kashyap, R.; Kulkarni, P.; Rajan, B.; Lakkad, B. (2003). Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ Health Perspect* 111:1958-1962.

Santos, S.A.; Nogueira, M.S.; Pinheiro, M.S. (1996). Diets of *Caiman crocodilus* yacare from different habitats in the Brazilian Pantanal. *Herpetological J.* 6:111-117.

Savabieasfahani, M.; Kannan, K.; Astapova, O.; Evans, N.P.; Padmanabhan, V. (2006). Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* 147(12):5956-5966.

Schoeb, T.R.; Heaton-Jones, T.G.; Clemmons, R.M.; Carbonneau, D.A.; Woodward, A.R.; Shelton, D.; Poppenga, R.H. (2002). Clinical and necropsy findings associated with increased mortality among American Alligators of Lake Griffin, Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 38:320-337.

Segre, M.; Arena, S.M.; Greeley, E.H.; Melancon, M.J.; Graham, D.A.; French, J.B. Jr. (2002). Immunological and physiological effects of chronic exposure of *Peromyscus leucopus* to Aroclor 1254 at a concentration similar to that found at contaminated sites. *Toxicology* 174:163-172.

Sepúlveda, M.S.; Del Piero, F.; Wiebe, J.J.; Rauschenberger, H.R.; Gross, T.S. (2006). Necropsy findings in American alligator late-stage embryos and hatchlings from northcentral Florida lakes contaminated with organochlorine pesticides. *J Wildl Dis.* 42(1):56-73.

Shaharabany, M.; Gollop, N.; Ravin, S; Golomb, E.; DeMarco, L.; Ferreira, P.C.; Boson, W.L.; Friedman, E. (1999). Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. *J Antimicrob Chemother* 44(3):416-8.

Sharpe, R.M.; Skakkebaek, N.E. (1993). Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders on the male reproductive tract?. *Lancet* 341:1392-1395.

Sharpe, R.M.; Fisher, J.S.; Millar, M.M.; Jobling, S.; Sumpter, J.P. (1995). Gestational and Lactational Exposure of Rats to Xenoestrogens Results in Reduced Testicular Size and Sperm Production. *Environ. Health Perspect.* 103:1136-1143.

Sharpe, R.M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:91-110.

Shi, Y.Q.; Wang, Y.P.; Song, Y.; Li, H.W.; Liu, C.J.; Wu, Z.G.; Yang, K.D. (2010). p,p'-DDE induces testicular apoptosis in prepubertal rats via the Fas/FasL pathway. *Toxicol Lett.* 193(1):79-85.

Shimabukuro, R.H.; Swanson, H.R. (1969). Atrazine metabolism, selectivity, and mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 17:199-205.

Shono, T.; Suita, S.; Kai, H.; Yamaguchi, Y. (2004). The effect of a prenatal androgen disruptor, vinclozolin, on gubernacular migration and testicular descent in rats. *J. Pediatr. Surg.* 39:213-216.

Siegel, S. (1956). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill Book Company, New York. 312.

Silbergeld, E.K.; Flaws, J.A.; Brown, K.M. (2002). Organizational and activational effects of estrogenic endocrine disrupting chemicals. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 18:495-504.

Silva, E.; Rajapakse, N.; Kortenkamp, A. (2002). Something from "nothing"-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*. 36:1751-1756.

Silva, M.H.; Gammon, D. (2009). An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 86(1):1-28.

Singer, P.L. (1949). Occupational Oligospermia. *JAMA* 140:1249.

Singh, S.K.; Pandey, R.S. (1990). Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. *Indian J Exp Biol* 28:953-956.

Singh, N.D.; Sharma, A.K.; Dwivedi, P.; Patil, R.D.; Kumar, M. (2007). Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. *J Appl Toxicol*. 27(6):589-601.

Sinha, N.; Narayan, R.; Saxena, D.K. (1997). Effect of endosulfan on the testis of growing rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 58:79-86.

Siroski, P.A.; Merchant, M.; Parachú Marcó, M.V.; Piña, C.I.; Ortega, H.H. (2010). Characterization of the Serum Complement Activity of the Broad-Snouted Caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Zoological Studies* 49(1): 64-70

Siroski, P.A.; Piña, C.I.; Larriera, A.; Merchant, M.E.; Di-Conza, J. (2009). Susceptibility of *Escherichia coli* to *Caiman latirostris* plasma. Zool. Stud. 48: 238-242.

Smith, G.; Lemos-Espinal, J.; Ballinger, R. (1997). Sexual dimorphism in two species of Knob-scaled lizards (Genus *Xenosaurus*) from Mexico. Herpetologica 53(2):200-205.

Smits, J.E.; Fernie, K.J.; Bortolotti, G.R.; Marchant, T.A. (2002). Thyroid hormone suppression and cell-mediated immuno- modulation in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. Arch Environ Contamin Toxicol 43:338-344.

Sohoni, P.; Sumpter, J.P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol. 158(3):327-39.

Sone, K.; Hinago, M.; Kitayama, A.; Morokuma, J.; Ueno, N.; Watanabe, H.; Iguchi, T. (2004). Effects of 17beta-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. Gen Comp. Endocrinol. 138:228-236.

Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 65:143-150.

Soto, A.M.; Justicia, H.; Wray, J.W.; Sonnenschein, C. (1991). p-nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. Environ. Health Perspect. 92:167-173.

Soto, A.M.; Chung, K.L.; Sonnenschein, C. (1994). The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. Environ. Health Perspect. 102:380-383.

Soto, A.M.; Sonnenschein, C.; Chung, K.L.; Fernandez, M.F.; Olea, N.; Serrano, F.O. (1995). The E-screen assay as a tool to identify estrogens-an

update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspect. 103:647-654.

Spanó, L.; Tyler, C.R.; van Aerle, R.; Devos, P.; Mandiki, S.N.; Silvestre, F.; Thomé, J.P.; Kestemont, P. (2004). Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). Aquat Toxicol. 66(4):369-79.

Stacy, B.A.; Whitaker, N. (2000). Hematology and biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 31:339-347.

Stafford, D.P.; Plapp, F.W.; Fleet, R.R. (1976). Snakes as indicators of environmental contamination: relation of detoxifying enzymes and pesticide residues to species occurrence in three aquatic ecosystems. Arch Environ Contam Toxicol. 5:15-27.

Stahl, R.G. (1997). Can mammalian and non-mammalian "sentinel species" data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants. Hum Ecol Risk Assess 3:329-335.

Stamper, M.A.; Craig, H.; Sheryan, P.; Braun-McNeill, J.; Avens, L.; Stoskopf, M.K. (2005). Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 36:635–641.

Stoker, C.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Ramos, J.G.; Sirosky, P.; Larriera, A.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2003). Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. Gen Comp Endocrinol 133:287-296.

Stoker, C. (2004). *Caiman latirostris* como monitor biológico de contaminación ambiental por xenoestrógenos. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral.

Stoker, C.; Beldoménico, P.M.; Bosquiazzo, V.L.; Zayas, M.A.; Rey, F.; Rodríguez, H.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2008). Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology* 156:603-612.

Stoker, C.; Repetti, M.R.; García, S.R.; Zayas, M.A.; Galoppo, G.H.; Beldoménico, H.R.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2011) Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. *Chemosphere* 84(3):311-317.

Stone, R. (1994). Environmental estrogens stir debate. *Science* 265:308-310.

Sultan, C.; Balaguer, P.; Terouanne, B.; Georget, V.; Paris, F.; Jeandel, C.; Lumbroso, S.; Nicolas, J. (2001). Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 178(1-2):99-105.

Sumpter, J.P. (1998). Xenoendocrine disrupters environmental impacts. *Toxicol Lett.* 102-103:337-42.

Suzawa, M.; Ingraham, H.A. (2008). The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS One.* 3(5):2117-2121.

Swan, S.H.; Elkin, E.P.; Fenster, L. (1997). Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105:1228-1232.

Tabb, M.M.; Blumberg, B. (2006). New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol.* 20(3):475-82.

Tada, N.; Sada, M.; Ueda, Y.; Hoshi, H.; Uemura, T.; Kamata, Y. (2004). Comparative analyses of serum vitellogenesis in male and female Reeves' pond turtles (*Chinemys reevesii*) by an immunological assay. *J. Comp. Physiol. B* 174:13-20.

Takahashi, O.; Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2Bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect.* 108:931-935.

Takayanagi, S.; Tokunaga, T.; Liu, X.; Okada, H.; Matsushima, A.; Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett.* 167(2):95-105.

Tavera-Mendoza, L.; Ruby, S.; Brousseau, P.; Fournier, M.; Cyr, D.; Marcogliese, D. (2002). Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ Toxicol Chem* 21:527-531.

Thomas, P.; Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102(1-5):175-9.

Thurman, E.; Cromwell, A. (2000) Atmospheric transport, deposition, and fate of triazine herbicides and their metabolites in pristine areas at Isle Royale National Park. *Environ Sci Technol* 34:3079–3085.

Tillmann, M.; Schulte-Oehlmann, U.; Duft, M.; Markert, B.; Oehlmann, J. (2001). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10:373-388.

Timms, B.G.; Howdeshell, K.L.; Barton, L.; Bradley, S.; Richter, C.A.; vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt

development of the fetal mouse prostate and urethra. Proc Natl Acad Sci USA. 102:7014-7019.

Trentacoste, S.V.; Friedmann, A.S.; Youker, R.T.; Breckenridge, C.B.; Zirkin, B.R. (2001). Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. J Androl. 22:142-148.

Turner, R.T.; Wakley, G.K.; Hannon, K.S. (1990). Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. Journal of Orthopaedic Research 8:612-617.

United State Environmental Protection Agency U.S.E.P.A. (1997). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Endocrine Disruptor Glossary. Definition of Endocrine Disruptor, as defined by EDSTAC. U.S. Environmental Protection Agency. Disponible: <http://www.epa.gov/oscpmont/sap/meetings/1998/may/edstac/ch3.pdf> (acceso13-06-06)

U.S. EPA (2002). Registration Eligibility Decision for Endosulfan. 1-224.

Van den Steen, E.; Eens, M.; Geens, A.; Covaci, A.; Darras, V.M.; Pinxten, R. (2010). Endocrine disrupting, haematological and biochemical effects of polybrominated diphenyl ethers in a terrestrial songbird, the European starling (*Sturnus vulgaris*). Sci Total Environ. 408(24):6142-7.

Van der Schalie, W.H.; Gardner, H.S.Jr.; Bantle, J.A.; De Rosa, C.T.; Finch, R.A.; Reif, J.S.; Reuter, R.H.; Backer, L.C.; Burger, J.; Folmar, L.C.; Stokes, W.S. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. Environ. Health Perspect. 107:309-315.

Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Schaeberle, C.M.; Ucci, A.A.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S.; Soto, A.M. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. Reprod Toxicol. 26(3-4):210-9.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazso, V.L.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2008). Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149(11):5848-5860.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazso, V.L.; Lower, M.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology* 152(3):1101-1111.

Verdade, L.M. (1995). La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina, Vol. 1. Biología reproductiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em Sao Paulo, Brasil. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. 57-79.

Verdade, L.M. (2000). Allometry of reproduction in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Braz. J. Biol.* 61:431-435.

Verdade, L.M. (2003). Cranial dimorphism in captive adult broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Amphibia Reptilia* 24:92-99.

Vismari, L.; Alves, G.J.; Palermo-Neto, J. (2010). Amitriptyline and acute inflammation: a study using intravital microscopy and the carrageenan-induced paw edema model. *Pharmacology* 86(4):231-9.

Volkel, W.; Colnot, T.; Csanady, G.A.; Filser, J.G.; Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res Toxicol.* 15:1281-1287.

vom Saal, F.S.; Cooke, P.S.; Buchanan, D.L.; Palanza, P.; Thayer, K.A.; Nagel, S.C.; Parmigiani, S.; Welshons, W.V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health* 14:239-260.

vom Saal, F.; Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for new risk assessment. *Environ. Health Perspect* 113:926-933.

Vonier, P.M.; Crain, D.A.; McLachlan, J.A.; Guillette, L.J. Jr.; Arnold, S.F. (1996). Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect.* 104(12):1318-22.

Vos, J.G.; Dybing, E.; Greim, H.A.; Ladefoged, O.; Lambre, C.; Tarazona, J.V.; Brandt, I.; Vethaak, A.D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30:71-133.

Waye, H.L.; Mason, R.T. (2008). A combination of body condition measurements is more informative than conventional condition indices: temporal variation in body condition and corticosterone in brown tree snakes (*Boiga irregularis*). *Gen Comp Endocrinol.*155(3):607-12.

Webb, G.J.W.; Messel, H. (1978). Abnormalities and injuries in the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*. *Australian Wildlife Research* 4:311-317.

Weiss, D.L.; Wardrop, K.J. 2010. Schalm's veterinary hematology. (Weiss, D.L.; Wardrop, K.J) 6th ed Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA. 1004.

Wetherill, Y.B.; Petre, C.E.; Monk, K.R.; Puga, A.; Knudsen, K.E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 1:515-524.

Wickman, D.S.; Siebert, J.R.; Benjamin, D.R. (2007). Nitrofen-induced congenital diaphragmatic defects in CD1 mice. *Teratology* 47(2):119-25.

Wilhelms, K.W.; Cutler, S.A.; Proudman, J.A.; Anderson, L.L.; Scanes, C.G. (2005). Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: studies in male Japanese quail. *Toxicol Sci* 86:152-160.

Willingham, E.; Crews, D. (1999). Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113:429-435.

Willingham, E.; Rhen, T.; Sakata, J.T.; Crews, D. (2000). Embryonic treatment with xenobiotics disrupts steroid hormone profiles in hatchling red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Environ Health Perspect.* 108:329-332.

Wink, C.S.; Elsey, R.M.; Bouvier, M. (1990). Porosity of egg-shells from wild and captive, pen-reared alligators (*Alligator mississippiensis*). *J. Morphol.* 203:35-39.

Wu, T.A.; Rainwater, T.R.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Anderson, T.A. (2000). Organochlorine contaminants in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize. *Chemosphere* 40:671-678.

Wu, T.H.; Cañas, J.E.; Rainwater, T.R.; Platt, S.G.; McMurry, S.T.; Anderson, T.A. (2006). Organochlorine contaminants in complete clutches of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize. *Environ Pollut.* 144(1):151-157.

Yanosky, A. (1990). Histoire naturelle du Caiman á museau large (*Caiman latirostris*), un alligatoriné mal connu. *Revue Francais d'Aquariologie Herpetologie* 17:19 31.

Yanosky, A.A.; Mercolli, C. (1995). La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina, Vol. 1. *Caiman latirostris* y *Caiman*

*yacare* en la Reserva Ecológica El Bagual (Formosa, Argentina). (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. 113-122.

Zhou, J.; Zhu, X.S.; Cai, Z.H. (2001). The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. *Chemosphere* 82(3):443-50.

Ziegler, T.; Olbort, S. (2007). Genital structures and sex identification in crocodiles. *Crocodile Specialist Group Newsletter* 26:16–17.