

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**Efecto de la exposición a compuestos  
agro-industriales sobre la vitelogénesis y  
las características histo-funcionales del  
oviducto de *Caiman latirostris***

Mag. Germán Hugo Galoppo

Directora de Tesis: Dra Mónica Muñoz de Toro

Co-directora de Tesis: Dra Cora Stoker

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

2016

# AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL y la Dirección de Posgrado, Secretaría de Ciencia y Técnica, por su disposición y trabajo en busca de la calidad en las carreras de posgrado.

Al programa de becas para docentes de la Universidad Nacional del Litoral, gracias al cual se nos permite a los que ejercemos la actividad docente, superarnos, perfeccionarnos y enriquecernos con los aportes de la investigación.

Al Dr Enrique Luque, director del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, por poner los recursos, instalaciones y el personal del Instituto a disposición para alcanzar los objetivos del presente trabajo.

A la Dra Mónica Muñoz de Toro, mi directora, por confiar en mis capacidades, estimular mi curiosidad, compartir sus conocimientos y experiencias y ver en las adversidades nuevas oportunidades.

A la Dra Cora Stoker, mi co-directora por acompañarme en este camino.

Al grupo humano del ISAL y Patología Humana, por su aliento, asistencia, ayuda, respeto y, sobretodo, por esa capacidad de vivir mis logros como propios.

A los AMIGOS, por siempre estar ahí.

A mi FAMILIA, la de sangre y la otra. Gracias por estar, complementar incapacidades, encauzar el desborde, suplir ausencias, enderezar lo que se tuerce, arreglar lo que se rompe, poner en pie lo que se cae y empujar lo que se detiene.

A mis padres, Hugo y Nuri, por hacer de mi persona la mejor versión posible a través de sus continuos e inagotables sacrificios.

A mi familia; mi mujer Damiana, por estar siempre, estimular y apoyar incondicional y contantemente mi vocación, respetar mis silencios, entender mis ausencias, apoyar mis luchas, sotenerme en mis fracasos y vivir mis éxitos; y mis hijos; Lucía, Francisco y Mariano, por hacer de cada llegada a casa un soplo renovador de energías con cada “hola papiiii!!!!”.

A aquellos que por diversas razones ya no están, porque de ellos también he aprendido.

A Dios, por nunca soltarme de su mano.

# LISTADO DE PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

## FULL PAPERS

*Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (Caiman latirostris) and correlation with measures of reproductive performance.* Stoker, C.; Repetti, M.R.; García, S.R.; Zayas, M.A.; **Galoppo, G.H.**; Beldoménico, H.R.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Chemosphere 84: 311-317, 2011.

*Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (Caiman latirostris).* Zayas, M.A.; Rodríguez, H.A.; **Galoppo, G.H.**; Stoker, C.; Durando, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.M. J. Herpetol. 45:516-524, 2011.

*Sexually dimorphic expression of receptor-alpha in the cerebral cortex of neonatal Caiman latirostris (Crocodylia, Aligatoridae).* Varayoud, J.; Monje, L.; Moreno-Piovano, G.; **Galoppo, G.**; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Ramos, J.G. Gen. Comp. Endocrinol. 179:205-213, 2012.

*The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (Caiman latirostris) are associated with the egg burden of organochlorine compounds.* Stoker, C.; Zayas, M.A.; Ferreira, M.A.; Durando, M.; **Galoppo, G.H.**; Rodríguez, H.A.; Repetti, M.R.; Beldoménico, H.R.; Caldini, E.G.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Ecotoxicol. Environ. Saf. 98:191-195, 2013.

*Histomorphological changes in testes of broad-snouted caimans (Caiman latirostris) associated with in ovo exposure to endocrine-disrupting chemicals.* Durando, M.; Canesini, G.; Cocito, L.L.; **Galoppo, G.H.**; Zayas, M.A.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro M. J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 325:84-96, 2016.

*Postnatal development and histofunctional differentiation of the oviduct in the Broad-Snouted Caiman (Caiman latirostris).* **Galoppo, G.H.**; Stoker, C.; Canesini, G.; Schierano-Marotti, G.; Durando, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro M. Gen. Comp. Endocrinol. 236:42-53, 2016.

## RESÚMENES EN PUBLICACIONES PERIÓDICAS

*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. Medicina (Buenos Aires), vol 70 supl. II, p213, 2010.

*Alteraciones en genitales externos de yacarés overos expuestos in ovo a agroquímicos,* Zayas, M.; Durando, M.; **Galoppo, G.**; Stoker C.; Rodríguez, H.; Luque, E.; Muñoz-de-Toro, M. Medicina (Buenos Aires), vol 70 supl. II, p213, 2010.

*Eventos celulares y moleculares que caracterizan al oviducto de Caiman latirostris en estadíos pre y peri-adenogénesis.* **Galoppo, G.H.**; Stoker, C.; Canesini, G.; Zayas, M.A.; Durando, M.; Luque, E.H; Muñoz-de-Toro, M., Medicina (Buenos Aires), vol 71 supl. III, p158, 2011.

*Vitellogenin induction in immature Caiman latirostris females in response to early postnatal exposure to Bisphenol A.* **Galoppo, G.H.**; Ramos, J.G.; Stoker, C.; Canesini, G.; Durando, M.; Osti, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Biocell (Buenos Aires), vol 37. p10., 2012.

*Caracterización del yacaré como modelo para el estudio de obesógenos ambientales,* Canesini, G.; Durando, M.; **Galoppo, G.** Luque, E.; Muñoz-de-Toro, M., Medicina (Buenos Aires), vol 73 supl. III, p298, 2013.

*Temporal and spatial expression pattern of estrogen receptor alpha, progesterone receptor and wnt7a in Caiman latirostris oviducts.* **Galoppo, G.H.**; Osti, M.; Stoker, C.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Biocell (Buenos Aires), vol 38 (Suppl. 2), A106, 2014.

*Postnatal exposure to xenoestrogens alters wnt7a expression and oviductal radial pattern in Caiman latirostris.* **Galoppo, G.H.**; Canesini, G.; Vigezzi, L.; Tschopp, M.V.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. Biocell (Buenos Aires), vol 38 (Suppl. 2), A120, 2014.

*Advanced Caiman latirostris oviductal maturation after postnatal exposure to xenoestrogens.* **Galoppo, G.H.**; Canesini, G.; Durando, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro M. Biocell (Buenos Aires), vol 39 (Suppl.2), A87, 2015.

*Characterization of embryonic reproductive tract in Caiman latirostris.* Canesini, G.; **Galoppo, G.H.**; Osti, M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Durando, M. Biocell (Buenos Aires), vol 39 (Suppl.2), A32, 2015.

*Evaluación del desarrollo y crecimiento de yacarés overos (Caiman latirostris) expuestos in ovo a atrazina.* Ibarra Bouzada, L.; Schierano Marotti, G.; **Galoppo, G.**; Canesini, G.; Luque, E.; Muñoz-de-Toro, M. Scientia Interfluvius (Paraná), p103, 2015.

*Histoarquitectura funcional de la glándula tiroides del yacaré overo (Caiman latirostris). Efectos de la exposición in ovo a endosulfán.* Schierano Marotti, G.; Osti, M.; **Galoppo, G.**; Canesini, G.; Ibarra Bouzada, L.; Luque, E H.; Muñoz-de-Toro, M. Scientia Interfluvius (Paraná), p111, 2015.

# INDICE GENERAL

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	Presencia ambiental de compuestos hormonalmente activos	1
1.2	Yacaré Overo ( <i>Caiman latirostris</i> )	2
1.2.1	Características ecofisiológicas	2
1.2.2	Biología reproductiva	5
1.2.3	Ciclo reproductivo de cocodrilidos hembra	6
1.2.4	Exposición y sensibilidad de <i>Caiman latirostris</i> a PEs	7
1.3	Monitoreo de contaminación ambiental por PEs	10
1.3.1	<i>Caiman latirostris</i> como organismo centinela de contaminación	10
1.4	Bisfenol A	11
1.4.1	Estructura química, usos y producción	11
1.4.2	Presencia de BPA en el ambiente	12
1.4.3	Estabilidad y persistencia ambiental del BPA	13
1.4.4	Efectos del BPA	14
1.5	Estudio del fenómeno de perturbación endocrina en yacaré overo utilizando como blancos la vitelogénesis y el desarrollo histofuncional del oviducto	16

## II. HIPOTESIS 17

## III. MATERIALES Y METODOS GENERALES

3.1	Animales	18
3.1.1	Recolección y traslado de los huevos	18
3.1.2	Procedimiento de incubación de los huevos	21
3.1.3	Nacimiento, identificación y registro de variables biométricas	22
3.1.4	Cría de caimanes neonatales	23
3.1.5	Cría de animales hasta juveniles	24
3.2	Obtención de muestras y procesado histológico	25

3.3	Evaluación de biomarcadores por inmunohistoquímica	26
3.4	Digitalización y análisis de imágenes	26
3.5	Análisis estadístico	26

#### IV. CAPITULO 1

4.1	INTRODUCCIÓN	
4.1.1	Descripción general del oviducto de reptiles	28
4.1.2	Regiones del oviducto	29
4.1.3	Cambios estacionales y hormonodependencia del oviducto	30
4.1.4	Diferenciación y maduración del tubo uterino de <i>Caiman latirostris</i>	30
4.1.5	Rol de la vía de señalización wnt en la diferenciación organogenética del oviducto	33
4.2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	
4.3.1	Diseño experimental	37
4.3.2	Evaluación de biomarcadores de la vía de señalización wnt	39
4.3.3	Análisis estadístico	40
4.4	RESULTADOS	
4.4.1	Animales	41
4.4.2	Expresión de WNT-7a durante el desarrollo oviductal.	41
4.4.3	Expresión de WNT-5a durante el desarrollo oviductal	42
4.4.4	Expresión epitelial de $\beta$ -catenina durante el desarrollo oviductal normal.	43
4.4.5	Relación entre la expresión oviductal de las moléculas de la vía de señalización wnt y la diferenciación morfogénica oviductal	44
4.5	DISCUSIÓN	46

#### V. CAPITULO 2

5.1	INTRODUCCIÓN	
-----	--------------	--

5.1.1	Antecedentes de efectos de PEs sobre el TRF	49
5.2	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	51
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.3.1	Animales	52
5.3.2	Diseño experimental	52
5.3.3	Toma de muestras y procesado histológico	53
5.3.4	Estudio de la histoarquitectura e histofuncionalidad del oviducto	53
5.3.4.1	Tinciones histoquímicas	53
5.3.4.2	Altura de epitelio oviductal	54
5.3.4.3	Organización de las fibras de colágeno en el subepitelio oviductal	55
5.3.4.4	Expresión de proteínas asociadas al tejido muscular	56
5.3.4.5	Cuantificación de cambios histomorfológicos y tintoriales	56
5.3.4.6	Actividad proliferativa del epitelio luminal	58
5.3.4.7	Expresión de receptores de hormonas esteroides sexuales	58
5.3.5	Estudio de biomarcadores de la vía de señalización wnt	60
5.4	RESULTADOS	
5.4.1	Animales	61
5.4.2	Histoarquitectura e histofuncionalidad oviductal	61
5.4.2.1	Altura de epitelio	61
5.4.2.2	Organización del colágeno subepitelial	63
5.4.2.3	Expresión de proteínas asociadas al tejido muscular	64
5.4.2.3.1	Expresión subepitelial de $\alpha$ -actina	64
5.4.2.3.2	Expresión subepitelial de desmina	65
5.4.2.4	Histofuncionalidad de la mucosa oviductal	66
5.4.2.5	Actividad proliferativa	67
5.4.2.6	Hormonodependencia	68

5.4.2.6.1	Expresión epitelial de ER $\alpha$	68
5.4.2.6.2	Expresión subepitelial de ER $\alpha$	69
5.4.2.6.3	Expresión epitelial de PR	69
5.4.3	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre mecanismos de diferenciación morfogénica oviductal de <i>Caiman latirostris</i>	70
5.4.3.1	Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión de WNT-7a	71
5.4.3.2	Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión de WNT-5a	72
5.4.3.3	Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión epitelial de $\beta$ -catenina	73
5.4.4	Resumen de resultados y comparación respecto a la diferenciación morfogénica oviductal normal	74
5.5	DISCUSIÓN	75

## VI. CAPITULO 3

6.1	INTRODUCCIÓN	
6.1.1	Estructura y función de la vitelogenina	87
6.1.2	Vitelogénesis	89
6.1.3	Control hormonal de la vitelogénesis	89
6.1.4	Importancia de la detección de VTG circulante	90
6.2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
6.3	MATERIALES Y MÉTODOS	
6.3.1	Animales	92
6.3.2	Diseño experimental	92
6.3.3	Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción génica de VTG	93
6.3.3.1	Extracción de muestras	93
6.3.3.2	Extracción de RNAm total y transcripción reversa (RT-PCR)	93

6.3.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	94
6.3.3.4	Determinación de los niveles de expresión relativa de ARNm-VTG	95
6.3.3.5	Análisis estadístico	96
6.3.4	Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la síntesis proteica de VTG	96
6.3.4.1	Extracción de muestras	96
6.3.4.2	Determinación de VTG <i>in situ</i>	97
6.3.5	Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la liberación de VTG	97
6.3.5.1	Extracción de muestras	97
6.3.5.2	Cuantificación de las muestras por ELISA	97
6.4	RESULTADOS	
6.4.1	Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción génica de VTG	99
6.4.2	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión hepática de VTG	99
6.4.3	Efecto de la exposición postnatal a xenoestrógenos sobre los niveles circulantes de VTG	101
6.5	DISCUSIÓN	102
	VII. CONCLUSIONES	106
	VIII. BIBLIOGRAFÍA	107
	IX. ANEXOS	104

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

µg	Microgramo
µm	Micrómetro
ANP	Area nuclear positiva
ANT	Area nuclear total
ATZ	Atrazina
BPA	Bisfenol A
BrdU	Bromo-deoxiuridina
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
ct	Ciclo umbral
DAB	diaminoazobenzidina
DDT	Diclorodifenil tricloroetano
DES	Dietilestilbestrol
dNTPs	Desoxinucleótidos
DOI	Densidad óptica integrada
Dsh	Proteína de señalización <i>Dishevelled</i>
E2	17-beta estradiol
EE2	Etinil-estradiol
Ef	Eficiencia
ELISA	Enzimoimmunoensayo
END	Endosulfán
ERα	Receptor de estrógeno-alfa
ERβ	Receptor de estrógeno-beta
Fz	Receptor de membrana <i>frizzled</i>
GAM	Complejo Gónada-adrenal-mesonefros
IHQ	Inmunohistoquímica
ILM	Intensidad lumínica media
JNK	Quinasa Jun-N-terminal
KDa	Kilodaltons
LT	Largo total

LvH	Cadena pesada de lipovitelina
LvL	Cadena liviana de lipovitelina
MEC	Matriz extracelular
mM	milimolar
MMP	Metaloproteinasa
mRNA	ARN mensajero
NP	Nonilfenol
OCCLs	Compuestos organoclorados
P	Progesterona
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución buffer de fosfatos
PCBs	Bisfenilos policlorados
PEs	Perturbadores endocrinos
PET	Polietiléntereftalatos
PKC	Proteinquinasa C
PMSF	Fluoruro de fenil-metilsulfonilo
PR	Receptor de progesterona
Pv	Fosvitina
PVCs	Polivinilclorados
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
ROCK	Quinasa asociada a Rho
rVTG	Receptor de vitelogenina
SDS	Duodecilsulfato sódico.
SD	Desvío estándar
SVL	Longitud hocico cloaca
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TRF	Tracto reproductor femenino
UGT	UDP- glucuronisiltransferasa
UIT	Unidades inhibidoras de tripsina

VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VTG	vitelogenina
vtg	Gen que codifica para vitelogenina
vWfd	Dominio de Von Willebrand tipo D
X	Media
$\alpha$ -actina	Alfa actina
$\beta$ -catenina	Beta-catenina

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efectos de la exposición natural y experimental a PEs sobre <i>Caiman latirostris</i> .	9
Tabla 2	Efectos de la exposición experimental a BPA en distintos órganos, sistemas y especies.	15
Tabla 3	Características de los huevos y variables alométricas al nacimiento de hembras de <i>Caiman latirostris</i> .	41
Tabla 4	Características de los huevos y variables biométricas al nacimiento de hembras de <i>Caiman latirostris</i> utilizadas en experimento de exposición postnatal a xenoestrógenos.	61
Tabla 5	Resumen de resultados del Capítulo 2.	74
Tabla 6	Número de animales utilizados en el estudio de vitelogénesis	92
Tabla 7	Especies y número de código de las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de cebadores utilizados en RT-PCR	94
Tabla 8	Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real	94
Tabla 9	Protocolo de ciclado para PCR de tiempo real utilizado	95
Tabla A1	Procesado histológico hasta inclusión en parafina.	134
Tabla A2	Protocolo general de procedimientos pre y post tinción de cortes histológico.	135
Tabla A3	Tinción tricrómica de Ácido Peryódico-base de Schiff (PAS).	135
Tabla A4	Tinción tricrómica de picrosirius – hematoxilina de Harris	136
Tabla A5	Técnica de coloración de picrosirius – hematoxilina de Harris para luz polarizada	136
Tabla A6	Protocolo general utilizado para técnicas de IHQ	137
Tabla A7	Biomarcadores de inmunofenotipo, hormono-dependencia	138

y vía de señalización WNT. Anticuerpos y particularidades metodológicas para su evaluación.

Tabla A8 Protocolo utilizado para ELISA de VTG.

139

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i>	3
Figura 2	Estructura química de BPA	12
Figura 3	Esquema de hidrólisis del BPA	13
Figura 4	Distribución geográfica de los sitios de recolección de huevos de <i>Caiman latirostris</i>	19
Figura 5	Procedimientos durante la recolección de huevos en hábitat natural	20
Figura 6	Registro de características de los huevos	20
Figura 7	Características de las incubadoras	21
Figura 8	Registro de variables antes y durante el nacimiento de <i>C. latirostris</i>	23
Figura 9	Características de los acuarios para cría de caimanes neonatales	24
Figura 10	Características de los acuarios para cría de caimanes juveniles	25
Figura 11	Esquema representativo de las distintas capas del oviducto en un corte transversal	28
Figura 12	Esquema representativo de las distintas regiones del oviducto de <i>Alligator mississippiensis</i>	29
Figura 13	Secuencia de cambios en la histoarquitectura durante la diferenciación morfogénica del oviducto de <i>Caiman latirostris</i>	32
Figura 14	Vías de señalización wnt	34
Figura 15	Ontogenia de la expresión de miembros de la vía de señalización wnt en oviducto de <i>C. latirostris</i> . Esquema del diseño experimental	37
Figura 16	Obtención de muestras de oviducto de <i>C. latirostris</i> de diferentes edades	38

---

Figura 17	Evaluación de la expresión de $\beta$ -catenina	39
Figura 18	Patrón témporo-espacial de la expresión oviductal de WNT-7 <sup>a</sup>	42
Figura 19	Patrón témporo-espacial de expresión de WNT-5a en los distintos estadios madurativos de <i>Caiman latirostris</i>	43
Figura 20	Patrón témporo-espacial de expresión oviductal de $\beta$ -catenina en los distintos estadios madurativos de <i>Caiman latirostris</i>	44
Figura 21	Relación entre la expresión de proteínas miembros de la vía de señalización wnt y el proceso de diferenciación postnatal oviductal de <i>Caiman latirostris</i>	45
Figura 22	Efectos de la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales sobre la histofuncionalidad del oviducto de <i>C. latirostris</i> . Esquema del diseño experimental	52
Figura 23	Altura del epitelio luminal del oviducto	54
Figura 24	Organización de las fibras de colágeno en el sub-epitelio oviductal	55
Figura 25	Características histológicas y patrones de tinción utilizados en el sistema se score histofuncional	57
Figura 26	Evaluación de expresión de receptores de hormonas esteroides	59
Figura 27	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la altura del epitelio luminal oviductal	62
Figura 28	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la organización del colágeno subepitelial oviductal	63
Figura 29	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de $\alpha$ -actina en oviducto de <i>Caiman latirostris</i>	64
Figura 30	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de desmina en oviducto de <i>Caiman latirostris</i>	65
Figura 31	Cambios histofuncionales en oviducto de <i>Caiman latirostris</i>	66

---

debido a la exposición a xenoestrógenos

Figura 32	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la actividad proliferativa del epitelio luminal oviductal	67
Figura 33	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de ER $\alpha$ epitelial	68
Figura 34	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de ER $\alpha$ subepitelial	69
Figura 35	: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de PR epitelial	70
Figura 36	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de WNT-7a epitelial	71
Figura 37	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de WNT5a en oviducto de <i>Caiman latirostris</i>	72
Figura 38	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión epitelial de $\beta$ -catenina	73
Figura 39	Estructura de la vitelogenina	88
Figura 40	Efectos de la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales sobre la vitelogénesis	92
Figura 41	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción hepática de VTG	99
Figura 42	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión hepática de VTG	100
Figura 43	Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre los niveles circulantes de VTG	101

---

# RESUMEN

La exposición ambiental a compuestos capaces de interferir con la homeostasis del sistema endocrino, llamados perturbadores endocrinos (PEs), y sus efectos deletéreos son hechos ampliamente reconocidos. El bisfenol A (BPA) es un PE presente en el medioambiente, posee acción estrogénica y antiandrogénica y es utilizado en la industria del plástico y resinas epoxi. Se ha documentado la exposición de yacaré overo (*Caiman latirostris*) a PEs, caracterizando diferentes blancos de acción de los mismos y demostrado la utilidad de esta especie como organismo centinela de contaminación.

El oviducto, segmento del tracto reproductor femenino (TRF), es un órgano blanco de la acción hormonal. En vertebrados mamíferos se ha demostrado que la exposición a PEs modifica el patrón témporo-espacial de desarrollo del TRF. Previamente establecimos la ontogenia de expresión de biomarcadores y de los cambios en la histofuncionalidad del oviducto de *C. latirostris* controles, desde neonatos hasta juveniles.

La vitelogénesis, proceso que involucra la síntesis y transporte de vitelogenina (VTG), proteína hepática que aporta nutrientes al huevo en formación es un proceso estrógeno dependiente. La VTG ha sido utilizada como marcador de exposición a PEs con acción estrogénica en diversas especies. En nuestro laboratorio hemos inducido experimentalmente el proceso de vitelogénesis en *C. latirostris* y generado un anticuerpo específico y desarrollado un sistema de detección de VTG.

Dados estos antecedentes; nuestra hipótesis general fue “La exposición postnatal temprana a compuestos clasificados como PEs induce vitelogénesis hepática y modifica las características histofuncionales del oviducto de *C. latirostris* prepuberales.” Para poner a prueba esta hipótesis, propusimos diferentes objetivos, abordados en esta tesis en tres capítulos.

En el Capítulo 1 complementamos la caracterización histofuncional del oviducto. Dado que los procesos de diferenciación postnatal del TRF en vertebrados mamíferos están regulados por moléculas de la vía de señalización wnt; nos propusimos caracterizar los patrones de expresión témporo-espacial de moléculas representativas de esta vía (WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina) en el

oviducto de *C. latirostris*. Utilizamos cortes histológicos de tubos uterinos provenientes de hembras libres de tratamiento en cuatro estadios madurativos, neonatal, postnatal temprano, postnatal avanzado y juveniles. Además establecimos la relación entre el grado de diferenciación oviductal evaluado por *score* histofuncional, -definido en trabajos previos- y la expresión de WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina (test de correlación de Spearman). La presencia de WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina se detectó mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) y la cuantificación se expresó como porcentaje de células inmunomarcadas (WNT-7a) o área relativa de inmunomarcación (WNT-5a y  $\beta$ -catenina). WNT-7a se expresó en epitelio y posee un patrón de marcación nuclear. Sus niveles muestran un aumento gradual desde neonatos hasta postnatal avanzado. WNT-5a se expresó tanto en epitelio como en subepitelio exhibiendo marcación citoplasmática. La expresión subepitelial de WNT-5a mostró un descenso desde neonatal a postnatal temprano seguido de un continuo aumento en estadios madurativos posteriores. La  $\beta$ -catenina tiene un claro patrón de inmunomarcación de membrana restringido al epitelio luminal que no se modificó en los diferentes estadios madurativos. A diferencia de WNT-7a y WNT-5a, cuya expresión se correlacionó con el *score* histofuncional, los cambios en la expresión de  $\beta$ -catenina no se correlacionan con el grado de desarrollo oviductal evaluado por *score*. Nuestros resultados sugieren que la vía de señalización wnt interviene en la diferenciación postnatal del tubo uterino de *C. latirostris* a través de una vía no-canónica ( $\beta$ -catenina independiente).

Una vez completada la caracterización histofuncional del oviducto, evaluamos los efectos a nivel oviductal (Capítulo 2) y sobre la vitelogénesis (Capítulo 3) de la exposición post natal temprana a BPA. Hembras de yacaré overo se expusieron a dos dosis subcutáneas de BPA (1,4 o 140ppm), vehículo (aceite de maíz) o 17 $\beta$  estradiol (E2), (0,014 o 1,4ppm) los días postnatales 26 y 33. Los animales se sacrificaron a los 40 días de edad y se extrajeron muestras de plasma, oviducto e hígado que se procesaron para evaluación histológica y/o para análisis de expresión de ARN mensajero (mRNA). Para determinar los efectos de la exposición a nivel de la histoarquitectura oviductal se evaluó por análisis de

imágenes digitalizadas de cortes histológicos, la altura del epitelio luminal, el grado de organización de colágeno subepitelial y la expresión de alfa-actina ( $\alpha$ -actina) y desmina. Para identificar cambios en la histofuncionalidad oviductal se determinó el *score* histofuncional, la actividad proliferativa y expresión de receptor de progesterona (PR) y receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ). Con el objetivo de determinar si los posibles cambios histofuncionales se relacionan con cambios en la vía de señalización wnt, se evaluó la expresión de WNT-7a, WNT-5a y  $\beta$ -catenina. Todos los tratamientos modificaron la histoarquitectura, se observó aumento de la altura epitelial, desorganización del colágeno y aumento de la capa muscular. Además, todos los tratamientos, a excepción de E2 0,014ppm produjeron un aumento del *score* histofuncional. Tanto E2 1,4ppm como BPA 1,4ppm produjeron aumento de la actividad proliferativa y disminución en la expresión de ER $\alpha$ , mientras que la exposición a BPA 140ppm aumentó la expresión de ER $\alpha$ . Los niveles de expresión de PR no se modificaron como consecuencia de los tratamientos. Respecto a la evaluación de la vía de señalización wnt, se observó disminución en la expresión de WNT-7a para los grupos E2 0,014ppm, E2 1,4ppm y BPA 140ppm; y de WNT-5a para E2 1,4ppm y BPA 1,4ppm. La  $\beta$ -catenina solo se modificó ante la exposición a BPA 1,4ppm. Estos resultados muestran cambios en el patrón temporal de diferenciación morfogénica del tubo uterino de *C. latirostris* que involucrarían a miembros de la vía de señalización wnt y que junto al aumento de *score* histo-funcional sugieren un adelantamiento de la maduración oviductal.

Finalmente, para evaluar los efectos de la exposición a BPA sobre la vitelogénesis, se estudió la transcripción del gen que codifica para VTG (vtg) por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), la VTG almacenada en el hepatocito por IHQ y la VTG en circulación periférica por enzimoimmunoensayo (ELISA). Como consecuencia de la exposición a E2 1,4ppm observamos inducción de vitelogénesis a nivel de mRNA, depósitos de VTG *in situ* y niveles circulantes de VTG; mientras que la exposición a BPA 1,4ppm produjo aumento de los niveles plasmáticos de VTG. Esto demuestra que tanto E2 1,4ppm como BPA 1,4ppm indujeron vitelogénesis y que la exposición postnatal a dosis

ambientalmente relevantes de BPA activa este proceso en hembras inmaduras. La VTG circulante fue el biomarcador más sensible para detectar exposición a PEs en los tiempos elegidos.

Los resultados de esta tesis aportan conocimiento acerca de las vías involucradas en la diferenciación del oviducto de *C. latirostris*, así como el adelantamiento del proceso de maduración oviductal como consecuencia de la exposición postnatal temprana a PEs, alertando sobre posibles efectos que pueden afectar su función reproductiva. Finalmente, convalida a la detección de VTG circulante como una herramienta útil para la detección de exposición a contaminantes ambientales con acción estrogénica.

# ABSTRACT

Environmental exposure to compounds that interfere with the endocrine system, named endocrine disrupting compounds (EDCs) and its deleterious effects have extensively been documented. Bisphenol A (BPA) is an environmental EDC with both estrogenic and antiandrogenic effects, widely used in the manufacture of plastics and epoxy resins. Previous works have documented environmental exposure of Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*) to EDCs, characterized different targets of EDCs' action and suggested its role as a sentinel of environmental pollution.

The female reproductive tract (FRT), named oviduct in oviparous species, is a target organ of EDCs. It has been described that exposure to EDCs can modify the FRT developmental temporo-spatial pattern in mammals. We have previously established the ontogeny of *Caiman latirostris* (*C.latirostris*) oviductal histofunctional changes from neonatal to juvenile.

Vitellogenesis is an estrogen-dependant process that involves hepatic synthesis and plasma transport of the protein vitellogenin (VTG). VTG have been used as a biomarker of estrogenic EDCs exposure in several species. In our lab, we have experimentally induced vitellogenesis in adult *C.latirostris*, developed an antibody against caiman VTG and an ELISA for VTG.

Based on previous results, our hypothesis was that "early postnatal exposure to EDCs induces vitellogenesis and modifies oviductal histofunctional features in prepuberal *C. latirostris*". This hypothesis was addressed following different objectives that were structured in three chapters.

On Chapter I, we complemented the histofunctional characterization of the oviduct. Given that vertebrate FRT postnatal differentiation processes are controlled, at least in part, by wnt signaling pathway proteins, we sought to characterize the temporo-spatial expression pattern of three wnt family members (WNT-5a, WNT-7a and beta catenin –CTNNB-) in *C latirostris* from neonatal to juvenile. Furthermore we established the relationship between the oviductal differentiation degree (stated by oviductal histofunctional score system previously developed in our lab) and WNT-5a, WNT-7a and CTNNB expressions. Five microns thick oviductal sections from free-treatment females in neonatal, early

postnatal, late postnatal and juvenile stages were used. Wnt family members and CTNNB assessment were performed by immunohistochemistry (IHC) techniques and their expressions were evaluated as the percentage of immunostained luminal epithelial cells (for WNT-5a) or relative immunostained area (WNT-5a and CTNNB). The relationship between WNT-5a, WNT-7a and CTNNB expressions and the oviductal differentiation degree was established using Spearman correlation test. WNT-7a shows an epithelial nuclear staining pattern and its expression level shows a gradual increase from neonatal to late postnatal stage. WNT-5a is present both in epithelium and in subepithelium and shows cytoplasmatic staining pattern. Subepithelial WNT-5a expression follows a continuous increase from early postnatal to juvenile stages. Both WNT-7a and WNT-5a expressions significantly correlates with oviduct developmental degree stated as histofunctional score. CTNNB is restricted to the epithelium, its staining pattern is clearly membrane-associated and its expression doesn't show a clear development-associated pattern. Our results suggest that a CTNNB-independent (no-canonical) wnt signaling pathway controls *C. latirostris* oviductal postnatal development.

Once the histofunctional characterization of the *C. latirostris* oviduct was completed, our next objective was to assess the early postnatal BPA exposure effects on both oviduct (chapter 2) and vitellogenesis (chapter 3). Female hatchlings were injected subcutaneously with BPA 1,4ppm or 140ppm; 17 beta-estradiol (E2) 0,014ppm or 1,4ppm and vehicle (corn oil) at postnatal days 26 and 33. Oviduct, liver and plasma samples were obtained 7 days after the last injection. Liver samples were collected both in RNase-free and standard conditions. Oviducts were dissected. Both oviducts and standard-condition collected liver samples were paraffin processed. Plasma samples were collected with protease inhibitors.

In order to asses the exposure effects on oviductal histoarchitecture, we evaluated the epithelial cell height, the degree of subepithelial collagen remodeling (using histochemical techniques) and the expressions of desmin and smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $\alpha$ -SMA) (by IHC). Changes in oviduct histofunctional features were

achieved by assessing histofunctional score (as previously described), proliferative activity of the luminal epithelium and expression of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and progesterone receptor (PR) by IHC. Given that we have previously shown that oviduct postnatal development depends on wnt signaling pathways, we were encouraged to evaluate the effect of BPA exposure on Wnt signalling pathway members. All the treatments modified the histoarchitecture-related parameters when comparing with the control group. Regarding histofunctional parameters assessment, all the treatments but E2 0,014ppm resulted in a raise of the histofunctional score. Both E2 1,4ppm and BPA 1,4ppm increased epithelial proliferative activity and decreased ER $\alpha$  epithelial expression, while BPA 140ppm exposure raised ER $\alpha$  expression epithelial levels. No treatment modified PR expression. In relation to wnt signaling pathway assessment, exposures all the treatments but BPA 1,4ppm reduced WNT-7a expression, while E2 1,4ppm and BPA 1,4ppm decreased WNT-5a subepithelial levels. No treatment but BPA 1,4ppm modified CTNNB epithelial expression. Our results show that BPA exposure alters temporal differentiation patterning, possibly acting by wnt signaling disruption, suggesting an advanced oviductal maturation process.

For the assessment of E2 and BPA exposures on vitellogenesis process, hepatic Vtg mRNA and protein were assessed by qPCR and IHC, respectively. VTG plasma levels were measured by ELISA. Animals treated with E2 1,4ppm showed increased levels of Vtg mRNA, VTG plasma concentration and presence of hepatic VTG granules. BPA 1,4ppm exposure showed increased VTG plasma levels. These results show that both E2 1,4ppm and BPA 1,4ppm exposures induced vitellogenesis. Moreover, environmentally relevant doses of BPA can induce this process in immature female caimans. VTG detection was the most sensitive biomarker of BPA exposure in this model.

Taken together, these results provide evidence on *C. latirostris* oviductal postnatal differentiation pathways and EDCs-induced changes. Among the effects, we found evidence of EDCs-mediated advanced oviductal maturation process. These contributions may become an alert-sign of possible activational effects that could impair *C latirostris* reproductive health. In addition, we confirm plasma VTG

detection in immature caiman females as a useful tool to monitor estrogen-like EDCs environmental exposure.

# I- INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1- Presencia ambiental de compuestos hormonalmente activos

A partir de la revolución industrial, se sintetizaron gran variedad y cantidad de compuestos que de diversas maneras se incorporan cotidianamente al medioambiente. Los efectos de estos compuestos sobre la salud de los ecosistemas, de los cuales el hombre forma parte, han sido documentados por Rachel Carson en 1962, en su libro “Primavera Silenciosa”. En esta obra se describieron los efectos del insecticida organoclorado DDT, de amplia producción y uso durante la segunda guerra mundial, sobre la fauna silvestre. En los años 70 se establece la actividad estrogénica de organoclorados análogos al DDT (Bulger y col., 1978; Nelson y col., 1978), así como de otros biocidas estructuralmente muy diferentes (Hammond y col., 1979). En 1991, se descubre las propiedades estrogénicas del nonilfenol (NP), tras su liberación desde recipientes plásticos de poliestireno utilizados en procedimientos de rutina en laboratorios (Soto y col., 1991). En 1993 se identificó la actividad estrogénica de otro componente del plástico capaz de ser liberado al medio, el bisfenol A (BPA) (Krishnan y col., 1993). A partir de entonces, se ha demostrado actividad hormonal no sólo estrogénica en diversos compuestos presentes en plásticos y que pueden liberarse al medio tales como ftalatos, carboxilatos y mercaptanos (Teuten y col., 2009). Estos estudios llevaron a reconocer que “Muchos compuestos introducidos en el medioambiente por la actividad humana son capaces de alterar el sistema endócrino de animales y el hombre” (Colborn y Clement, 1992) y a definir a este tipo de compuestos como perturbadores endocrinos (PEs). Según la sociedad de endocrinología, “Un PE es un compuesto químico exógeno, o una mezcla de compuestos químicos exógenos que interfieren con cualquier aspecto de la acción de una hormona” (Zoeller y col, 2012).

Los efectos de la exposición ambiental a los PEs sobre la fauna están ampliamente documentados (Guillette y col., 1994; Lind y col., 2004; de Solla y col., 2008; Stoker y col., 2011, 2013; Meijide y col., 2016). Los avances del conocimiento en el campo de la perturbación endócrina han permitido determinar además, efectos sobre el metabolismo y su capacidad de actuar como obesógenos (Grün y Blumberg, 2006). Actualmente, se reconoce que la

exposición a PEs durante etapas críticas del desarrollo pueden generar una mayor susceptibilidad hacia enfermedades no transmisibles tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes mellitus (Gore y col., 2015). Estudios hechos en aves indican que el desarrollo gonadal de aves urbanas se da más tempranamente que el de las rurales, y esta diferencia se debe a un aumento de la actividad endócrina de las mismas (Davies y col., 2015). Aunque se reconoce que deberían realizarse más estudios, se ha relacionado la exposición a diversos PEs con la pubertad precoz en niños y niñas de Europa y los Estados Unidos de América (Mouritsen y col., 2010; Gore y col., 2015). Estos hallazgos sugieren que la exposición a PEs además, modifica el patrón temporal de los procesos de desarrollo. Debido a la presencia ambiental de PEs y la gran variedad de efectos que estos pueden tener sobre los ecosistemas y en particular el hombre, es necesario detectar su presencia a través de signos tempranos de alerta.

## **1.2- Yacaré Overo (*Caiman latirostris*)**

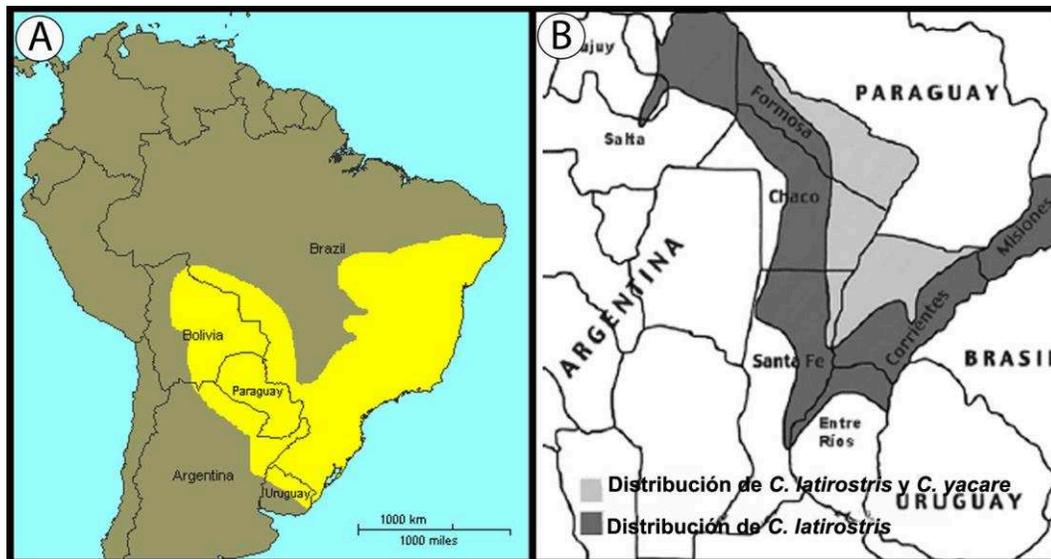
### **1.2.1- Características ecofisiológicas**

Durante años, los reptiles han sido útiles como biomonitores de contaminación de numerosos compuestos, entre los cuales se encuentran los PEs (Crain y Guillette, 1998). Los cocodrilidos pertenecen a la clase reptiles y en Argentina, habitan dos especies de cocodrilidos; el yacaré overo, ñato o de hocico ancho (*Caiman latirostris*) y el yacaré negro (*Caiman yacare*) (Waller y Micucci, 1994). Estos animales son vertebrados poiquiloterms, que alternan su vida entre los ambientes acuático y terrestre, permaneciendo la mayor parte de su vida en el agua (Freiberg y Carvalho, 1985). Pueden alcanzar una longitud máxima aproximada de 2,5 m con un peso de 80-90kg y son depredadores oportunistas (Santos y col., 1996).

Ambas especies comparten gran parte de su distribución pero *Caiman latirostris* (*C. latirostris*) llega más al sur que *Caiman yacaré* (*C. yacaré*) (Larriera e Imhof, 2000). Se registró la existencia de *C. yacaré* en Chaco, Corrientes, Formosa y Santa Fe, mientras que el yacaré overo además llega a Entre Ríos,

Misiones, Salta y Jujuy (figura 1). La mayor distribución de *C. latirostris* dentro del país y su alcance más austral se debe a que esta especie tiene una mayor tolerancia climática (Waller y Micucci, 1994).

Ambas especies se pueden diferenciar con cierta facilidad basándose en las estructuras craneanas y escutelares. Cuando estas especies habitan la misma región, se reparten el ambiente de tal forma que el yacaré negro es más visible, pues ocupa los ambientes donde el agua corre, con menos vegetación y mayor accesibilidad. Por su parte, *C. latirostris* se encuentra en ambientes de aguas más calmas, con abundante vegetación y de más difícil acceso (Piña y col [http://insugeo.org.ar/libros/misc\\_12/35.htm](http://insugeo.org.ar/libros/misc_12/35.htm)).



**Figura 1: Distribución geográfica de *Caiman latirostris*.** A: Distribución continental. B: Distribución dentro del territorio argentino. En B también se muestra la región que *C. latirostris* comparte con *C. yacaré*. Figuras tomadas y modificadas de: [http://crocodilian.com/cnhc/cst\\_clat\\_dh\\_map.htm](http://crocodilian.com/cnhc/cst_clat_dh_map.htm); Poletta y col., 2011.

En Argentina a partir del año 1990, la situación poblacional de *C. latirostris* ha mejorado debido al desarrollo y aplicación de programas de rancheo que promueven el uso sustentable del yacaré fomentando la conservación de la especie y su hábitat al otorgarle valor económico. En el marco de estos programas se realiza la cría de ejemplares en cautiverio, los cuales son identificados al nacimiento, para luego realizar un seguimiento de los individuos en su hábitat

natural. En Argentina, *C. latirostris* ha sido transferido al apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) (<http://www.cites.org/esp/app/index.php>), lo cual significa que es una especie que no está amenazada de extinción (Prado y col, 2012).

Debido a la marcada estacionalidad de su hábitat, los yacarés experimentan también patrones estacionales de disponibilidad de alimentos (Starck y col., 2007) y en consecuencia de reproducción. Durante la estación lluviosa (de enero a mayo), se alimentan de peces, cangrejos, moluscos y vertebrados terrestres en ríos y bañados. Además, depredan sobre otros reptiles y juveniles de su misma especie ubicándose en una posición superior en la red trófica (Prado, 2003). Durante la estación seca (de junio a diciembre) la disponibilidad de alimentos disminuye y su alimentación es menos abundante, enfrentando períodos más o menos largos de ayuno. Durante esta época, tienden a hacinarse en bañados y permanecer enterrados en el barro (Starck y col., 2007) hasta la llegada de las lluvias.

Los neonatos, una vez que han reabsorbido los restos del saco vitelino, comienzan a alimentarse principalmente de insectos y otros invertebrados que encuentran en las proximidades del nido. De esta manera, la ingesta alimenticia comienza desde muy temprano, pudiendo estar expuesto a contaminantes a través de la red trófica en todas las etapas de su vida. Durante la etapa juvenil se incorporan a la dieta gasterópodos acuáticos, crustáceos y pequeños vertebrados. La principal presa de los adultos son los peces, también se alimentan de crustáceos y tortugas acuáticas (Prado, 2003; Borteiro y col., 2009).

Distintos muestreos poblacionales hechos tanto en Argentina (Piña y col.; 2009), Bolivia (Aparicio y Rios, 2008), Brasil y Uruguay (Borteiro y col., 2008) durante los años 2008-2009, han enumerado varias causas de disminución de especímenes de *C. latirostris*. Entre las principales, se encuentran el drenaje de humedales para cultivos, la construcción de represas hidroeléctricas y la contaminación de cursos y espejos de agua (Verdade y col, 2010); revelando que la exposición de *C. latirostris* a contaminantes urbanos y/o agroindustriales es una realidad.

### 1.2.2- Biología reproductiva

La madurez sexual del yacaré ocurre una vez que los animales alcanzan un tamaño aproximado de 120 a 140 cm. En animales silvestres esto puede tener lugar entre los 6 y 10 años de edad, en función del ambiente y el estado nutricional siendo la expectativa de vida del yacaré semejante al humano (Micucci y Waller, 1995; Verdade, 1995; Prado, 2003).

La reproducción es estacional, el cortejo y la cópula se producen durante la primavera (octubre-diciembre); la construcción del nido y la postura se llevan a cabo durante el verano (diciembre-febrero), y los nacimientos ocurren a fines del verano y principios del otoño (febrero-abril) (Simoncini y col 2013). Sin embargo, pueden producirse desfases debidos a irregularidades en las precipitaciones, temperaturas ambientales y en el nivel de las aguas (Micucci y Waller, 1995). Durante la época de apareamiento los individuos con capacidad reproductiva se congregan en cuerpos de agua con cierta profundidad donde ocurren la cópula y fecundación. Las hembras grávidas construyen, en horario nocturno, 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 ella (Verdade, 1995; Yanosky y Mercolli, 1995).

La ovipostura es única (Piña, 2002), con número de huevos que oscila entre 18 y 50 huevos (Verdade y col., 2010). Durante la incubación, la hembra desarrolla el comportamiento de vigilancia del nido, mantiene la correcta humedad del mismo, sea mojándolo o facilitando la escorrentía del agua luego de lluvias. La temperatura de incubación se mantiene, promoviendo el proceso de descomposición del material de nido a través de la orina o deposiciones que efectúa sobre él. Sin embargo, la hembra no tiene contacto directo con los huevos hasta el momento de la eclosión (Piña y col [http://insugeo.org.ar/libros/misc\\_12/35.htm](http://insugeo.org.ar/libros/misc_12/35.htm)).

El logro de una incubación exitosa ocurre cuando la humedad de la cámara de incubación está cerca del 95% y la temperatura promedio entre los 30°C y los 32°C. *C. latirostris* es una especie en la cual el sexo no se determina por la

presencia de cromosomas sexuales, sino que muestra determinación sexual por temperatura. Huevos incubados a 33 °C producen 100% de machos, huevos incubados a 30 °C producen 100% hembras; mientras que temperaturas de incubación intermedias dan porcentajes variables de ambos sexos. La determinación sexual se da cerca del estadio embrionario 20 (Stoker y col., 2003). Los huevos resisten temperaturas entre 25 °C y 36 °C, siempre que estas condiciones no se prolonguen en el tiempo (Piña, 2002), dependiendo de la temperatura media, el período de incubación dura entre 65 y 90 días. Las temperaturas de incubación mayores aceleran el proceso, temperaturas bajas lo retardan (Piña y Donayo, 2000). Al aproximarse el final de la incubación, los animales empiezan a emitir sonidos dentro del huevo, llamando a la hembra que ayuda a sus pichones a salir del nido y en la apertura de los huevos si fuese necesario. La hembra cuida a su progenie por lo menos durante el primer año de vida y aunque todavía no está probado, hay indicios de que las hembras no se reproducen nuevamente hasta que dejan de cuidar la progenie anterior (Piña y col [http://insugeo.org.ar/libros/misc\\_12/35.htm](http://insugeo.org.ar/libros/misc_12/35.htm)).

Como sucede con la mayoría de los cocodrilidos, la pérdida de individuos durante el proceso de incubación y el primer año de vida en la naturaleza alcanza el 90 % de los huevos depositados en una temporada (Micucci y Waller, 1995). Los factores más influyentes en esta situación son la depredación e inundación durante la incubación, y se suma la sequía, frío y depredación durante el primer año de vida (Larriera y Piña, 2000).

La estrategia reproductiva de la especie, como en el caso de la mayoría de los reptiles, es producir una vulnerable, pero abundante descendencia, lo que garantiza que al menos unos pocos individuos lleguen a la adultez.

### **1.2.3- Ciclo reproductivo de cocodrilidos hembra**

Estudios observacionales de la biología reproductiva indican un claro patrón estacional (Simoncini y col 2013), similar al observado en *Alligator mississippiensis* (*A. mississippiensis*). En hembras de *A. mississippiensis* en edad reproductiva se describen en 4 grandes etapas (Guillette y col, 1997).

Etapa vitelogénica: Una hembra entra en etapa vitelogénica cuando las gónadas comienzan a sintetizar estrógeno. A nivel hepático, el aumento de los niveles circulantes de estrógeno estimulan la producción y secreción de proteína vitelogenina (VTG) que es transportada al ovario e incorporada a los oocitos (Gist, 2011). A nivel ovárico esta etapa se caracteriza por un importante crecimiento folicular, y la presencia y acumulación de plaquetas de VTG dentro de vacuolas en el folículo. En el tracto reproductor se observa hipertrofia, aumento de la vascularidad, aumento de la altura del epitelio luminal y crecimiento glandular. Aspectos relacionados al oviducto y la vitelogénesis se profundizan en los capítulos 1 y 3 respectivamente.

Etapa de gravidez y ovipostura: Definida por la existencia de huevos dentro del tracto reproductor y su postura en el nido. Esta etapa se caracteriza por presentar niveles séricos bajos de estrógenos y altos de progesterona (P) acompañados de hipertrofia oviductal y crecimiento glandular.

Etapa post-ovipostura: Involucra el período que va desde la ovipostura hasta el momento de eclosión de los huevos y nacimiento de las crías. Según Guillete y col, (1997), este período puede extenderse un tiempo después de la eclosión, y se determina por la presencia en el ovario de cuerpos lúteos pequeños.

Etapa no reproductiva: Abarca el período en el cual no se observan cuerpos lúteos ni oocitos vitelogénicos.

#### **1.2.4- Exposición y sensibilidad de *Caiman latirostris* a PEs**

La presencia ambiental de compuestos con actividad hormonal (Asakura y col., 2004; Céspedes y col., 2005; Lei y col., 2009; Brix y col., 2010; Chen y col., 2014; Gorga y col., 2015; Valdés y col., 2015) y los efectos de la exposición de la fauna a este tipo de compuestos son hechos ampliamente documentados. La presencia de PEs en una gran cantidad y variedad de ecosistemas independientemente de la distancia a la que éstos se encuentren de las fuentes de emisión, les ha valido la calidad de ubicuos (Bergman y col., 2012). Esta ubicuidad es consecuencia de la persistencia de muchos de estos compuestos y de la capacidad de ser transportado a grandes distancias. La exposición natural de *C.*

*latirostris* a biocidas organoclorados utilizados en prácticas agrícolas ha sido demostrada por Stoker y col., (2011). El hallazgo de residuos de biocidas organoclorados y bisfenilos policlorados (PCBs) en huevos de *C.latirostris* provenientes de zonas de baja a moderada intervención antrópica evidencia esta realidad (Stoker y col., 2011).

En los últimos años ha adquirido importancia la contaminación ambiental por partículas plásticas de diámetro menor a 5mm denominadas microplásticos. Estos contaminantes, inicialmente estudiados en ecosistemas marinos, han sido hallados en aguas dulces (Eerkes-Medrano y col., 2015) y en regiones remotas como el mar ártico (Lusher y col., 2015). La asociación entre microplásticos y PEs está en la capacidad que tienen las micropartículas de adsorber compuestos orgánicos persistentes (COPs), de conocida actividad como PEs concentrándolos y actuando como medio de transporte. Al ser ingeridos por los organismos acuáticos y favorecidos por el pH ácido del contenido gástrico pueden además, liberarse de los plásticos ftalatos y BPA, compuestos utilizados en su manufactura y clasificados como PEs (Teuten y col., 2009; Muñoz de Toro, 2015).

*Caiman. latirostris* ha mostrado ser una especie sensible a la exposición de sustancias clasificadas como PEs, tanto en forma natural como experimental. Los efectos relacionados a la exposición natural y experimental, entre los cuales se encuentran aspectos relacionados a la modificación del dimorfismo sexual tales como la producción de VTG en machos, así como alteraciones en la histoarquitectura gonadal, se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1:** Efectos de la exposición natural y experimental a perturbadores endocrinos sobre *Caiman latirostris*

Tipo de exposición	Período	Sexo/ Estadio de evaluación	PE	Efecto	Referencia
Natural	Prenatal	-	OCCs	Disminución del número de huevos por nido	Stoker y col., 2011
				Reducción de porosidad de cáscara de huevos	Stoker y col., 2013
Experimental	Prenatal ( <i>in ovo</i> )	-	BPA	Nacimiento de hembras a partir de huevos incubados a temperatura productora de machos	Stoker y col., 2003
		-	ATZ END	Aumento pérdida de peso de huevo	Beldomenico y col., 2007
		Hembras neonatales	E2 BPA ATZ	Alteración de dinámica folicular	Stoker y col., 2008
			E2 BPA	Aumento de niveles de estrógeno circulante	Stoker y col., 2008
			E2	Síntesis de VTG	Rey y col., 2006
		Machos neonatales	ATZ END BPA	Alteración de la histoarquitectura testicular	Rey y col., 2009 Hayes y col., 2011 Durando y col., 2016
			ATZ END	Disminución del perímetro peritubular ocupado por células mioides	Rey y col., 2009 Hayes y col., 2011
				Alteración del recambio celular intratubular	
			END	Disminución de los niveles de testosterona circulante	Durando y col., 2013
		Machos postnatales avanzados	END	Disminución de la proliferación intratubular testicular	Durando y col., 2016
		Hembras juveniles	E2 BPA	Aumento en la incidencia de folículos poliovulares	Stoker y col., 2008
		Machos Juveniles	END BPA	Alteración de la histoarquitectura testicular	Durando y col., 2016
			BPA	Aumento de la proliferación intratubular testicular	Durando y col., 2016
			END	Cambios en el patrón de distribución de ER $\alpha$	Durando y col., 2016
			E2	Síntesis de VTG	Rey y col., 2006

OCCs: compuestos organoclorados; BPA: bisfenol A; ATZ: atrazina; END: endosulfán; E2: 17 $\beta$ estradiol

### 1.3- Monitoreo de contaminación ambiental por PEs

Puesto que la presencia de PEs en el medioambiente y sus efectos deletéreos son hechos ampliamente probados, es necesario el control y monitoreo del ecosistema para garantizar la salud del mismo. Una de las formas en la que este control puede realizarse es a través del estudio de distintas especies domésticas y/o silvestres denominadas organismos centinelas (Mörner y col., 2002). El concepto de organismo centinela fue definido por Stahl como “cualquier organismo no-humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que el contaminante impacte sobre los humanos” (Stahl, 1997).

Una de las formas en la cual los organismos centinelas ofrecen información es a través de indicadores precisos y tempranos de alerta o biomarcadores. Un biomarcador puede definirse como “una respuesta biológica a un químico o químicos que provee una medida de exposición y a veces, también de efectos tóxicos” (Peakall y Walker, 1994). Desde un punto de vista más específico, los biomarcadores son “medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante” (Shugart y col., 1992).

#### 1.3.1- *Caiman latirostris* como organismo centinela de contaminación

La selección de una especie para ser utilizada como centinela requiere de la consideración de los siguientes atributos (Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies, Toxicology, National Research Council, 1991; O’Brien y col., 1993, van der Schalie y col., 1999).

- Tener amplia distribución en la zona a ser evaluada.
- Ser una especie carismática, ampliamente reconocida por la población general, para la cual se tenga interés respecto de su preservación y no debe correr riesgos de extinción (Seston y col, 2009).
- Ser abundante y suficiente para hacer el muestreo estadísticamente significativo y logísticamente posible.

- Tener un tamaño suficientemente grande como para proporcionar adecuadamente las muestras de tejidos y fluidos biológicos necesarias para el estudio de los biomarcadores seleccionados.
- Tener sensibilidad al compuesto o grupo de compuestos que se desea evaluar. La sensibilidad debe ser mayor que la de los seres humanos, para proporcionar la alerta temprana a través de los biomarcadores.
- Debe bioacumular el compuesto que se desea evaluar a concentraciones medibles o tener cambios fisiológicos o conductuales medibles en respuesta al agente o tipo de agente en cuestión.
- Tener larga vida, suficiente como para demostrar tanto los efectos inmediatos como los efectos de la exposición en el tiempo, extraer conclusiones sobre la exposición crónica y también sobre posibles efectos a distintos grupos etarios.
- Ser preferentemente territorial y que no posea hábitos migratorios, porque esto refleja que el contaminante en estudio está presente en el lugar. Además esta característica permite evaluar las consecuencias de la exposición a los habitantes de ese preciso lugar.
- Estar en el tope de la red trófica. Esta condición le da el potencial de bioacumular contaminantes locales a lo largo de grandes períodos de tiempo

Las características ecofisiológicas de *C. latirostris* citadas en 1.2.1 (amplia distribución geográfica, longevidad, fidelidad al sitio geográfico y posición superior en la red trófica) lo hacen un buen candidato como organismo centinela. Además, como se ha señalado en 1.2.4, *C. latirostris* ha mostrado ser sensible a los contaminantes con actividad de PEs.

## **1.4- Bisfenol A**

### **1.4.1- Estructura química, usos y producción**

El BPA es uno de los químicos que posee mayor volumen comercial. Su uso se extiende a todas las latitudes del mundo, con lo cual puede considerarse

una sustancia de distribución mundial (Welshons y col., 2006). Este compuesto, cuyo nombre químico desarrollado es 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano, es una molécula de 228 KDa (figura 2) que se utiliza en la polimerización de distintos tipos de plásticos tales como policarbonatos, polivinil-clorados (PVCs) y en polietilén-tereftalatos (PET) (Teuten y col., 2009). El BPA también es empleado en la elaboración de resinas epoxi aplicadas en el recubrimiento interno de latas metálicas y en la fabricación de algunos sellantes dentales (Welshons y col., 2006).

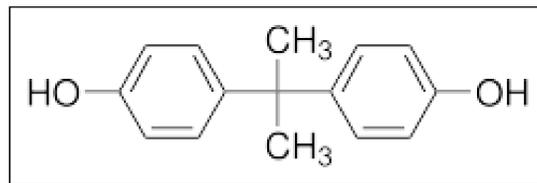


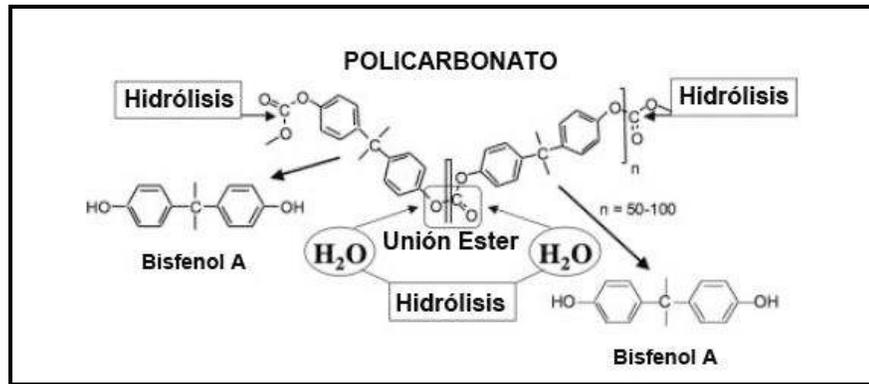
Figura 2: Estructura química de BPA.

Alrededor del 65% del BPA producido se destina a la producción de policarbonatos y aproximadamente el 25% se utiliza en la producción de resinas epoxi. El restante 10% encuentra aplicación como ignífugo y resinas especiales.

#### 1.4.2- Presencia de BPA en el ambiente

La presencia ambiental de BPA reconoce distintos orígenes, siendo el más importante su liberación desde los materiales de los cuales forma parte. La liberación del BPA puede deberse a procesos de polimerización incompletos, durante el cual quedan monómeros de BPA libres (Brotons y col., 1994), o bien debido a liberación desde el polímero por hidrólisis. La hidrólisis es acelerada por incrementos en la temperatura o en respuesta al contacto de sustancias ácidas o básicas (figura 3). El lavado repetido, calentamiento o exposición a condiciones ácidas de los productos que contienen BPA producen, en consecuencia, desprendimientos significativos del mismo (Welshons y col., 2006). El desprendimiento por hidrólisis es particularmente importante en los sitios de disposición final de residuos. La detección BPA junto con otros constituyentes del plástico en lixiviados de rellenos sanitarios han confirmado la importancia de esta vía en la presencia ambiental de BPA (Teuten y col., 2009). El rango de

concentración de BPA en lixiviados de sitios de disposición final de residuos sólidos varía ampliamente (desde 10 a 10000mg/L) (Fromme y col., 2002; Coors y col., 2003; Asakura y col., 2004; Teuten y col., 2009).



**Figura 3: Esquema de hidrólisis del BPA.** Modificado de Welshoms y col., 2006.

Finalmente, como se ha señalado anteriormente, no puede descartarse la presencia de BPA en microplásticos como forma de contaminación y presencia ambiental del mismo.

### 1.4.3- Estabilidad y persistencia ambiental del BPA

Las vías naturales de degradación de BPA son la fotodegradación, la oxidación química y la biodegradación microbiana. La oxidación química es la vía principal de degradación no biológica, y es cuantitativamente más importante en condiciones aeróbicas que en anaerobiosis (Abergues y col., 2013). La degradación biológica puede llevarse a cabo por una variedad de microorganismos entre los cuales las bacterias parecen ser los principales (Zhang y col., 2013). Aun así, el proceso de degradación del BPA es muy lento. El tiempo necesario para reducir la concentración inicial de BPA en un 50% en barros y aguas residuales va desde meses a años (Jurgens y col., 2014) lo que explica, en parte, la persistencia ambiental ubicua del mismo.

Contrariamente, el BPA es rápidamente biotransformado por los organismos superiores. Estudios hechos en humanos, ratas y ratones indican que la vía metabólica principal del BPA es la conjugación con ácido glucurónico a través de la enzima UDP-glucuroniltransferasa (UGT), siendo el

monoglucurónido de BPA el principal metabolito de excreción. El monoglucuronido del BPA no tiene actividad estrogénica (Snyder y col., 2000; Matthews y col., 2001; Zalko y col., 2003) o ésta es muy baja (Pottenger y col., 2000; Matsumoto y col., 2002), por lo tanto, solo el BPA no conjugado se considera biodisponible y biológicamente activo. El monoglucurónido de BPA puede ser desconjugado por la acción de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Ginsberg y Rice, 2009). En humanos, esta enzima se halla ampliamente distribuida en todo el organismo, incluyendo placenta, hígado, intestino y riñón (Sperker y col., 1997). Esto implica que no puede descartarse la recuperación de la actividad estrogénica del BPA por desconjugación.

#### **1.4.4- Efectos del BPA**

El BPA es descrito como un compuesto estrogénico débil y se ha demostrado que también tiene actividad anti-androgénica. Clásicamente los efectos del BPA sobre distintos sistemas biológicos se han estudiado por exposición experimental, ya sea *in vitro* o *in vivo* y empleando una serie de dosis que pueden dividirse en dos grandes grupos; bajas o altas. Se llaman dosis altas a aquellas superiores a 5 mg/kg/día; y dosis bajas a aquellas que se encuentran por debajo de este límite (Gore y col., 2015).

En la tabla 2 se citan algunos efectos del BPA, resultante de estudios de exposiciones experimentales *in vivo*, a dosis bajas, haciendo especial énfasis en los efectos relacionados a la reproducción. Entre estos efectos se cuentan los efectos del BPA sobre la histoarquitectura gónadal del yacaré overo.

**Tabla 2:** Efectos de la exposición experimental a BPA en distintos órganos, sistemas y especies

Sistema u órgano	Animal	Tipo de exposición	Efectos	Referencia
Nervioso	Ratones hembras	Prenatal	Defeminización o masculinización de conductas sexualmente dimórficas	Gioiosa y col., 2007 Adriani y col., 2003
	Ratones macho	Perinatal	Aumento de actividad locomotora como conducta dimórfica (feminización)	Xu y col., 2007
	Ratones	Postnatal	Cambios en la expresión de receptores de estrógeno alfa y beta	Ceccarelli y col., 2007 Monje y col., 2007
Mama	Ratas	Prenatal	Lesiones preneoplásicas, ductos hiperplásicos y carcinomas <i>in situ</i>	Durando y col., 2007 Murray y col., 2007
			Lesiones indicativas de aumento de susceptibilidad al desarrollo de tumores.y adelantamiento del grado de madurez mamaria	
Próstata	Ratas	Prenatal	Alteraciones histológicas y aumento en la proliferación de células basales implicadas en cáncer de próstata	Timms y col., 2005.
		Postnatal	Aumento en la incidencia y susceptibilidad a desarrollar lesiones neoplásicas intraepiteliales	Ho y col., 2006
		Prenatal	Cambios en el estroma periductal prostático y disminución de células estromales positivas para receptor de andrógenos	Ramos y col., 2003
Ovario	Ratas	Neonatal	Alteración de la dinámica folicular	Rodriguez y col., 2010
	Ovejas	Prenatal	Alteración de expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis	Veiga-López y col., 2013
		Postnatal	Aumento en la incidencia de folículos poliovulares Alteración de la dinámica folicular	Rivera y col., 2011
	Yacaré	Prenatal	Aumento en la incidencia de folículos poliovulares y retraso del desarrollo ovárico	Stoker y col., 2008
Utero	Ratones	Prenatal	Aumento del factor de transcripción HOXA 10	Bromer y col., 2010 Hiyama y col., 2011
	Ratas	Postnatal Perinatal	Disminución de la expresión de ER $\alpha$ y disminución de la proliferación endometrial	Varayoud y col., 2008b Bosquiazzo y col., 2010
Testículo	Ratones	Prenatal	Disminución en el número de espermátides elongadas	Okada y Kai, 2008
	Ratas	Prenatal	Disminución del recuento espermático	Salian y col., 2009
		Adulta	Disminución del recuento espermático	Jin y col., 2013 Tiwari y Vanage 2013
	Yacaré	Prenatal	Alteración de la histoarquitectura de túbulos seminíferos	Stoker y col., 2003 Rey y col., 2009

### **1.5- Estudio del fenómeno de perturbación endocrina en yacaré overo utilizando como blancos la vitelogénesis y el desarrollo histofuncional del oviducto**

El estudio de los efectos de PEs en distintas especies es de suma importancia para la salud de los ecosistemas y particularmente a la salud pública. Esta importancia es puntualizada por Hayes y col. (2011) en su revisión acerca de los efectos de la atrazina (ATZ) en machos de diferentes especies de vertebrados. Este trabajo destaca la consistencia de tales efectos entre las diferentes especies (Hayes y col., 2011). Esta analogía de efectos podría, en consecuencia, abarcar a los humanos transformándose en una cuestión de salud pública.

El estudio de los efectos de la exposición de un PE de amplia presencia ambiental como el BPA sobre un órgano blanco de perturbación endocrina como el oviducto, y un proceso sensible a estrógenos como la vitelogénesis en una especie altamente sensible puede brindar importantes herramientas en la determinación de la salud del ecosistema y detección de impactos ambientales antes de que estos impacten los demás componentes del mismo, dentro de los cuales están los humanos. Además, ante la sospecha de que la exposición a PE modifica los patrones temporales de desarrollo (Mouritsen y col, 2010; Gore y col., 2015), es importante conocer los procesos de desarrollo normales de los sistemas a estudiar para realizar aportes acerca de estos posibles efectos.

## II. HIPOTESIS

**La exposición neonatal temprana a compuestos clasificados como perturbadores endocrinos induce vitelogénesis hepática y modifica las características histofuncionales del oviducto de *Caiman latirostris* prepuberales.**

### III.- MATERIALES Y METODOS GENERALES

### 3.1- Animales

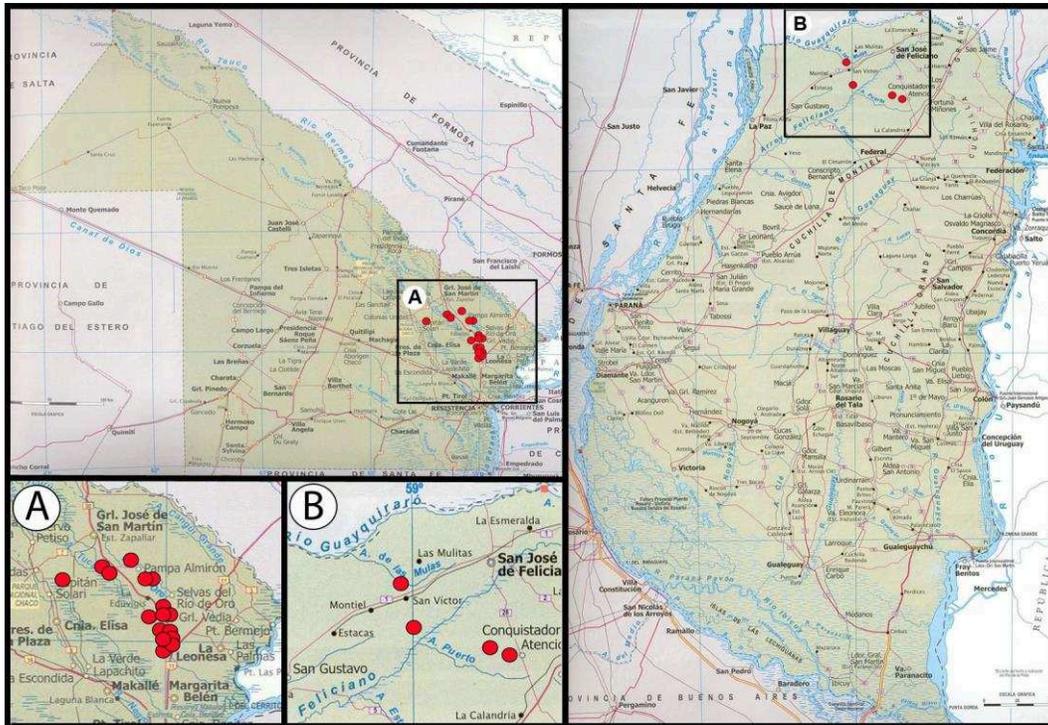
Utilizamos yacarés overos (*C. latirostris*) nacidos en el laboratorio de huevos recolectados en su hábitat natural en seis temporadas reproductivas (2005 a 2011).

Los huevos fueron recogidos y trasladados al laboratorio con los permisos otorgados por la Dirección de Fauna y Áreas Naturales Protegidas de la provincia del Chaco y la Dirección General de Recursos Naturales, Flora y Fauna de la provincia de Entre Ríos. Todos los procedimientos realizados a campo y en el laboratorio siguieron los lineamientos establecidos en la Guía para el uso de Anfibios y Reptiles vivos en investigación a campo y laboratorio (ASIH, 2004). Los protocolos de investigación fueron aprobados por Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

#### 3.1.1- Recolección y traslado de los huevos

Recolectamos huevos de *C. latirostris* en las provincias de Chaco y Entre Ríos. Con el fin de minimizar la exposición a efluentes urbanos o a derivados de la actividad agropecuaria y ganadera, se seleccionaron sitios de ovipostura en zonas consideradas de baja a moderada intervención antrópica, humedales situados en una reserva natural y/o aguas arriba de zonas urbanizadas o áreas de agricultura. En la figura 4 se ilustra la ubicación de los nidos.

Se contó con la colaboración de lugareños para localizar y monitorizar la construcción de los nidos (figura 5A). Una vez en el campo, se estableció la geoposición del nido según coordenadas de longitud y latitud y se registraron las características del ambiente natural tales como cercanía de ambientes acuáticos lóticos y lénticos, flora y fauna circundante y material con el cual fue hecho el nido. Para minimizar el posible aporte ambiental de contaminantes al embrión en desarrollo por pasaje de los mismos a través de la cáscara, la recolección de los huevos se realizó inmediatamente después de la ovipostura.



**Figura 4: Distribución geográfica de los sitios de recolección de huevos de *Caiman latirostris*. A: Detalle de las zonas de recolección en la provincia de Chaco, humedales de Río de Oro, Arroyos Guaycurú, Quiá y El Asustado. B: Detalle de las zonas de recolección en la provincia de Entre Ríos (Humedales de los Arroyos Puerto, Feliciano y Las Mulatas).**

Antes de retirar los huevos, cada uno se marcó con lápiz de grafito para registrar su posición original en el mismo (figura 5B). Destinamos el primer huevo extraído de cada nido para la determinación del estadio embrionario según criterios establecidos en nuestro laboratorio (figura 5C) (Stoker, 2004). Sólo se trasladaron al laboratorio huevos de nidos cuyos embriones se encontraron en estadio menor o igual a 18 (previo a la diferenciación sexual). El traslado de los huevos se realizó en bidones plásticos (trayecto nido-punto de encuentro, figura 5D) y luego para el traslado al laboratorio se usaron cajas de material aislante. Los huevos se ubicaron siempre en su posición original sobre cama hecha de goma espuma cubierta con material de nido (figuras 5E y 5F). La mantención de la posición original del huevo y la minimización de las vibraciones durante el traslado evitan la muerte del embrión por desprendimiento de las membranas internas de la cáscara.

Durante la cosecha, se registró el tamaño de la nidada distinguiendo por características externas los huevos viables de los no viables (rotos, putrefactos o depredados, localizados generalmente en la capa más basal del nido).



**Figura 5: Procedimientos durante la recolección de huevos en hábitat natural.** A: Identificación y acceso a nido. B: Apertura de nido y marcación de posición con lápiz de grafito. C: Determinación de estadio embrionario de la nidada. D, E y F: Acondicionamiento y transporte de los huevos.

Al llegar al laboratorio, se registró el peso de cada huevo, longitud de eje mayor y eje menor y espesor de banda opaca. El aumento del grosor de la banda opaca se utiliza como un signo de viabilidad embrionaria (figura 6).



**Figura 6: Registro de características de los huevos.** A: Determinación del peso. B: Medición de los ejes mayor y menor. C: Transiluminación y medición de la banda opaca.

Para establecer si los nidos recogidos para este trabajo (experimentales) son representativos de la población regional de yacarés se compararon las

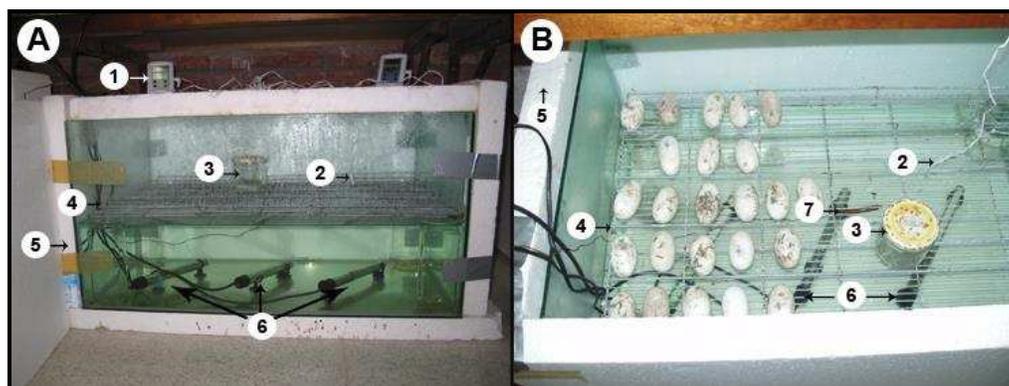
variables evaluadas (tamaño de la nidada, características de los huevos, entre otros) con las registradas en otras campañas (referencia).

### 3.1.2- Procedimiento de incubación de los huevos

Aproximadamente 30 días antes de la cosecha de huevos, las incubadoras fueron armadas, calibradas, y controladas siguiendo los criterios previamente descritos por Stoker, 2004 y Rey, 2007. Las incubadoras se estabilizaron a 30 °C, temperatura de obtención de 100% hembras (Stoker y col, 2003). La humedad relativa (HR%) se controló con los termohigrómetros de lectura externa (Alla<sup>®</sup>).

Las incubadoras cuentan con un sector ocupado con agua, por encima de cuya superficie se encuentra una cámara de aire húmedo (cámara de incubación). Como fuente de calor se colocaron tres aclimatadores sumergidos en el agua y equidistantes entre sí. La temperatura de la cámara de incubación se midió y controló diariamente mediante dos sistemas; a) utilizando termómetro de registro continuo de datos (sistema HOBO, Boxcar<sup>®</sup> for Windows Versión 3.6.0.6 Onset Computer Corp. Copyright 1999) y b) utilizando un termohigrómetro antes descrito (figura 7).

Durante la incubación, los huevos se examinaron diariamente para controlar signos de condensación de vapor de agua sobre la superficie de los mismos y/o signos de putrefacción.



**Figura 7: Características de las incubadoras.** A: Vista frontal. B: Vista superior. 1: Termohigrómetro. 2: Sensor de termohigrómetro. 3: Sistema de registro continuo de temperatura (sistema HOBO). 4: Parrilla de alambre galvanizado. 5: Paneles de material aislante. 6: Aclimatadores sumergibles. 7: Sensor de temperatura del termostato.

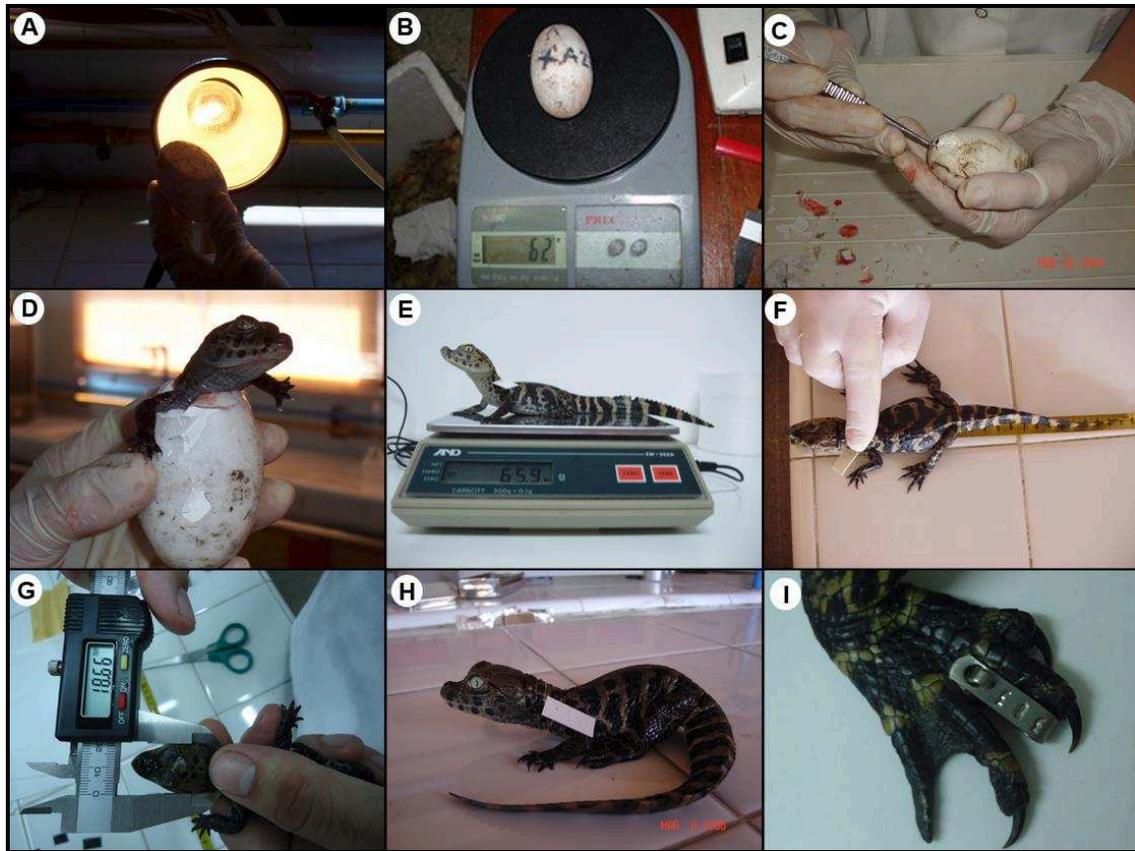
### **3.1.3- Nacimiento, identificación y registro de variables biométricas**

De acuerdo a datos recogidos previamente (Rey, 2007) la eclosión de los huevos incubados a 30 °C ocurre entre 43 y 45 días posteriores al estadio 20 del desarrollo embrionario. Durante la última semana de incubación, se examinaron los huevos dos veces por día en búsqueda de signos indicativos de eclosión inminente (llamado de la cría y/o movimiento). La verificación de estos signos en un huevo perteneciente a un nido determinó el nacimiento, por eclosión asistida, de todas las crías del mismo nido. Previo al nacimiento, se observó y registró la presencia de cámara de aire (figura 8A) y el peso de cada huevo (figura 8B).

Se determinó la masa corporal (figura 8E) y las variables biométricas largo total (LT), distancia hocico-cloaca (SVL) (figura 13F) y ancho occipital (figura 8G) de todos los neonatos. También se observó la morfología general de los animales en búsqueda de posibles malformaciones. Los valores registrados para estas variables se compararon con los provenientes de hembras nacidas de huevos libres de tratamiento en otras campañas (referencia).

Las crías se identificaron utilizando dos sistemas diferentes: a) con un collar con un código alfanumérico único para cada animal (figura 8H); b) con un número de identificación grabado en metal que se insertó en la membrana interdigital de la pata trasera derecha (figura 8I).

La posibilidad de exposición natural a agentes neurotóxicos (Kamijima y Casida, 2000), se descartó a partir de la evaluación de la postura, locomoción, recuperación de postura y reflejo ocular fotomotor.



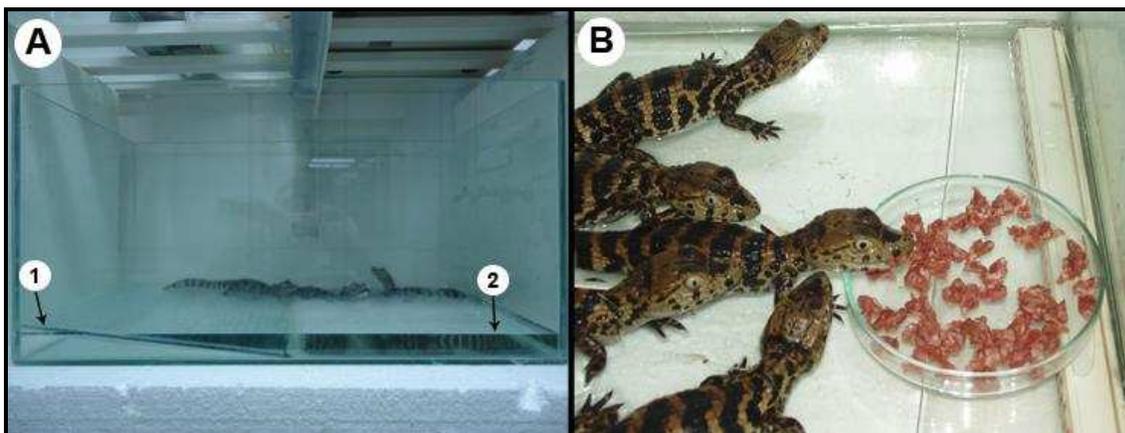
**Figura 8: Registro de variables antes y durante el nacimiento de *C. latirostris*.** A: determinación de cámara de aire. B: determinación de peso de huevo. C: eclosión asistida. D: nacimiento. E: determinación de masa corporal de cría. F: medición de largo total y longitud hocico-cloaca. G: medición de ancho occipital. H: identificación con collar de código alfanumérico. I: identificación mediante número gravado en pieza de metal (tag) inserta en membrana interdigital

### 3.1.4- Cría de caimanes neonatales

Los recién nacidos se mantuvieron en receptáculos de vidrio con una zona de vidrio liso horizontal plana y otra zona de vidrio texturado ubicada a modo de rampa. Esta disposición posibilita el desplazamiento de los animales desde el ambiente acuático hacia una zona seca y de esta manera regular su temperatura corporal. En los receptáculos se colocaron 10 cm de agua. Se revistieron todas sus caras, excepto en la superior, con planchas de material opaco de 5cm de grosor. Estas planchas aíslan visualmente a las crías protegiéndolas del estrés (figura 9).

Los receptáculos con las crías se ubicaron en sala con temperatura controlada a 30°C. La temperatura se registró con un termómetro digital cuyo sensor se ubicó suspendido a 5 cm de la superficie del agua.

Durante los primeros 10 días post nacimiento, no se suministró alimento a los neonatos. En este período el vitelo remanente (incorporado a la cavidad abdominal antes del nacimiento) les provee de todos los nutrientes necesarios. Luego fueron alimentados con carne vacuna picada “*premium*” con bajo contenido de grasa, para minimizar el aporte de contaminantes liposolubles.



**Figura 9: Características de los acuarios para cría de caimanes neonatales.** A: receptáculos de vidrio. 1: rampa de vidrio y zona seca. 2: zona húmeda; B: alimentación con carne vacuna bajo contenido de grasa (calidad *premium*).

### 3.1.5.-Cría de animales hasta juveniles

La cría de animales desde su nacimiento hasta los 45 días se realizó según fue descrito en la sección 3.1.4. Cuando los animales cumplieron los 45 días de edad, se ubicaron en piletones de cría de juveniles dentro de las instalaciones del bioterio de reptiles. Estos piletones fueron construidos evitando materiales que aportan sustancias clasificadas como PEs, por ejemplo las pinturas epoxi y materiales plásticos. Los piletones, cuentan con una zona húmeda y una zona plana seca comunicadas por una rampa que permite el libre paso de los animales desde el ambiente acuático al medio seco.

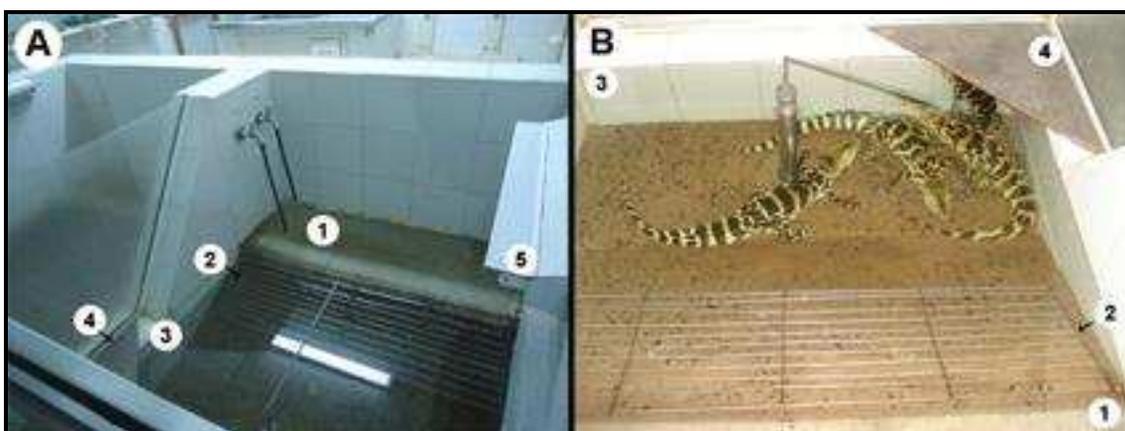
La temperatura de los piletones de cría (área seca y de inmersión) se controló mediante un sistema de flujo constante de agua a 30°C bajo una loza radiante. Un radiador garantiza la temperatura ambiental óptima para los animales ( $28,8 \pm 0,7$  °C).

Los piletones cuentan con un sector cubierto con una pieza desmontable que brinda un sitio donde el animal puede cobijarse cuando percibe peligro, como

forma de disminuir el estrés cuando ingresa personal al bioterio (figuras 10A 4 y 10B 4).

Los animales se alimentaron con carne vacuna picada *premium* suplementada con vitaminas y calcio (VIONATE<sup>®</sup> S, Novartis, Argentina; ReptoCal<sup>™</sup>, Tetra, Alemania). La dosis semanal de alimento representa el 20% del peso corporal de los animales de cada piletón. Está compuesta por 98,5% de carne vacuna picada y 1,5% de suplemento de vitaminas y minerales. Esta dosis de alimento se divide en 3 raciones semanales.

Con el fin de asegurar la correcta incorporación de calcio se expuso a los animales durante 30 minutos diarios a una fuente de luz UV (Sylvania Reptistar T-8; 15 Watts)



**Figura 10: Características de los acuarios para cría de caimanes juveniles.** A: piletones de cría vacíos. B: Animales juveniles en piletones de cría. 1: Zona seca. 2: Rampa y rejilla de comunicación entre zonas. 3: Zona húmeda. 4: Placa desmontable. 5: Fuente de luz UV.

### 3.2- Obtención de muestras y procesado histológico

La disección de órganos se realizó inmediatamente después del sacrificio.

Los órganos disecados se sumergieron en solución fijadora (formol buffer al 10%, pH 7,4 durante 6hs a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de fijación, se realizaron 2 lavados de las muestras con PBS (buffer fosfatos pH 7,5) de 10 minutos cada uno y luego se sumergieron en etanol 70% hasta su procesado. Brevemente, los órganos fueron colocados en series ascendentes de etanol,

clarificados en xilol e incluidos en parafina siguiendo técnicas histológicas de rutina (ver tabla A1).

En el Anexo, se detallan los protocolos de procesado histológico, desparafinización e hidratación de los cortes histológicos (tabla A1) así como el de deshidratación y montaje (tabla A2).

### **3.3- Evaluación de biomarcadores por inmunohistoquímica.**

La determinación de la expresión de diferentes biomarcadores se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Aplicamos el método extravidina-biotina peroxidasa y revelado con diaminobencidina (DAB), utilizando un protocolo previamente optimizado en nuestro laboratorio (Kass y col., 2000) (tabla A6) al que se le realizaron pequeñas modificaciones para cada marcador (tabla A7).

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue establecida con anterioridad.

### **3.4.- Digitalización y análisis de imágenes**

Mediante el uso de una cámara de video (Diagnostic Instruments Inc., USA) adaptada a un microscopio óptico (Olympus Optical, Tokyo, Japan), se capturaron imágenes de los cortes utilizando objetivo Dplan 10X, 20X, 40X o 100X según la variable a evaluar. Previamente el microscopio fue ajustado para iluminación Köehler. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas y almacenadas en formato electrónico utilizando el *software* Spot Advanced. El análisis digital de imágenes se realizó utilizando el *software* Image Pro-Plus 4.1.0.1® system (Media Cybernetics, Silver Spring, MA). La obtención de medidas espaciales se realizó calibrando previamente el sistema con reglas de referencia.

### **3.5- Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron sometidos a tests de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y test de homogeneidad de variancias (Test de Levene).

Se utilizaron tests paramétricos para aquellas variables con distribución normal (test de variancia múltiple (ANOVA) seguido de post test t de student de dos colas. Todos los test estadísticos se efectuaron utilizando un intervalo de confianza del 95%.

Para todos aquellos datos que no cumplieron con el test de normalidad, se emplearon tests de estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis seguido de post test de Mann Whitney).

## IV.- CAPITULO 1

Caracterización del patrón de expresión témporo-espacial de moléculas de la vía de señalización wnt y su relación con la diferenciación morfogénica oviductal en *Caiman latirostris*.

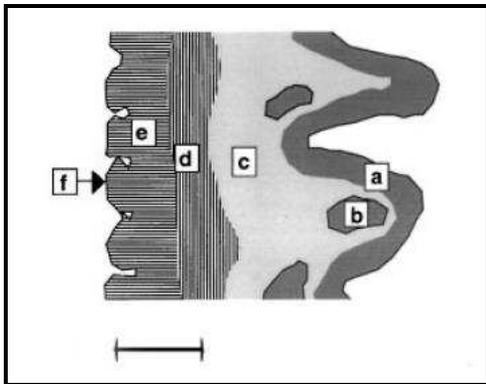
## 4.1- INTRODUCCIÓN

#### 4.1.1- Descripción general del oviducto de reptiles

El tracto reproductor femenino (TRF) en especies ovíparas, se denomina oviducto. En reptiles adultos, los oviductos son estructuras típicamente pares, abiertas rostralmente al celoma en la vecindad de los ovarios y caudalmente a la cloaca. Si bien las características histológicas varían a lo largo del eje céfalo-caudal; en cortes transversales, la estructura básica del oviducto en una hembra adulta consiste en tres diferentes capas; mucosa (también llamada endometrio), muscular (llamada miometrio) y serosa (figura 11) (Girling, 2002).

La mucosa o endometrio es la capa más interna. Está formada por un epitelio simple que recubre el lumen, y una lámina propia subyacente. La lámina propia consiste en tejido conectivo y glándulas mucosas. La capa muscular (miometrio) se encuentra debajo de la mucosa rodeando a la lámina propia, y está formada por una capa de musculo liso circular interna y una capa longitudinal externa. La capa serosa (perimetrio) recubre exteriormente al oviducto y es una continuación del peritoneo (Girling, 2002; Gist, 2011).

Los términos endometrio, miometrio y perimetrio son aplicados más correctamente a tejidos uterinos, pero en la literatura referente a reptiles también se han utilizado para describir a los tejidos oviductales en general. En el presente trabajo, siguiendo el criterio aplicado por Girling (Girling, 2002), utilizaremos los términos mucosa, capa muscular y serosa para describir las diferentes capas en todas las regiones oviductales.



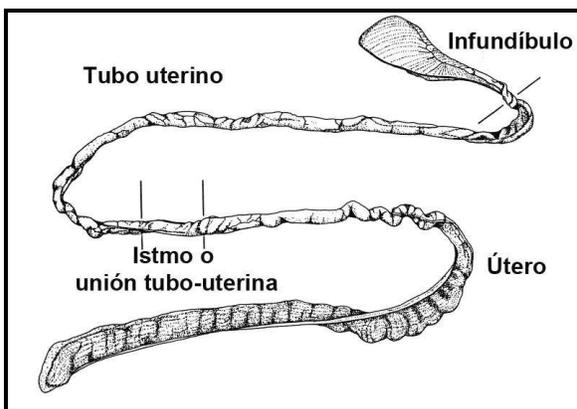
**Figura 11: Esquema representativo de las distintas capas del oviducto en un corte transversal:** a: epitelio. b: glándula mucosa, c: tejido conectivo, d: capa muscular circular, e: capa muscular longitudinal, f: serosa. Mucosa (a+b+c). Muscular (d+e). Barra 100µm. Modificado de Girling, 2002.

#### 4.1.2- Regiones del oviducto

Girling, 2002 propuso una división céfalo-caudal del oviducto de los reptiles, basada en características estructurales e histológicas en período vitelogénico. Según este criterio, los oviductos de los reptiles pueden dividirse en infundíbulo, tubo uterino, istmo o unión tubo-uterina, útero y vagina (figura12).

La región estudiada en esta tesis es el tubo uterino. Esta porción se encuentra en posición caudal al infundíbulo, y está ausente en algunos reptiles Escamosos (Squamata), en los cuales el infundíbulo se conecta directamente con el útero. Representa aproximadamente el 40% del largo total del oviducto tanto en aligátores como en tortugas (Gist, 2011).

En *C. latirostris*, el tubo uterino es similar a *A. mississippiensis*, y consiste de un epitelio luminal del tipo simple pseudoestratificado con células columnares ciliadas y no ciliadas, con núcleos apicales las primeras y centrales o basales las segundas. Las células no ciliadas poseen microvellosidades y son secretoras. Los gránulos presentes en las células secretoras se colorean intensamente con tinciones para glucosaminoglucanos (Galoppo, 2015).



**Figura 12: Esquema representativo de las distintas regiones del oviducto de *Alligator mississippiensis* sexualmente maduro:** Modificado de Palmer y Gillette, 1992. Las divisiones propuestas como comunes entre los reptiles coinciden con las descritas para *A. mississippiensis*, y consecuentemente representan al oviducto de *C. latirostris*.

En reptiles hembras sexualmente maduras, la mucosa posee numerosas glándulas que pueden ocupar entre el 80 y el 90% del grosor total del tubo uterino. Estas glándulas pueden ser compuestas tipo túbulo-alveolar, tubular ramificado o acinares ramificadas (Girling, 2002). Hacia ambos extremos del tubo uterino, las glándulas se vuelven menos numerosas y ocupan menos proporción de la lámina

propia. En cocodrilidos y tortugas, las glándulas del tubo uterino secretan albumen. El albumen está formado por las llamadas proteínas blancas del huevo que rodean al oocito previamente a la oviposición. De esta manera, el tubo uterino es la zona homóloga al *magnum* de las aves (Palmer y Guillette, 1990; Gist, 2011).

#### **4.1.3- Cambios estacionales y hormonodependencia del oviducto**

La reproducción en la mayoría de los reptiles es cíclica y está asociada a épocas reproductivamente favorables del año. La ciclicidad de factores ambientales (temperatura, fotoperiodo, y humedad) coordina vía hipotálamo la liberación de gonadotropinas que actúan sobre las gónadas para regular la secreción de hormonas sexuales en animales púberes y adultos. Está bien establecido que las funciones oviductales están influenciadas, también estacionalmente, por los esteroides sexuales ováricos (Gist, 2011).

La hormonodependencia del oviducto de reptiles ha sido puesta en evidencia a través de la administración exógena de hormonas en épocas naturalmente desfavorables a la reproducción o por privación de las mismas. En las tortugas *Chrysemys picta*, la administración de E2 durante el otoño estimuló las glándulas tubuloalveolares en la región del útero a niveles vistos en verano (Mutz y Callard, 1991). La ovariectomía o hipofisectomía en reptiles produce regresión oviductal y la administración exógena de E2, progesterona (P) o ambos en general revierten tal efecto (Gist, 2011).

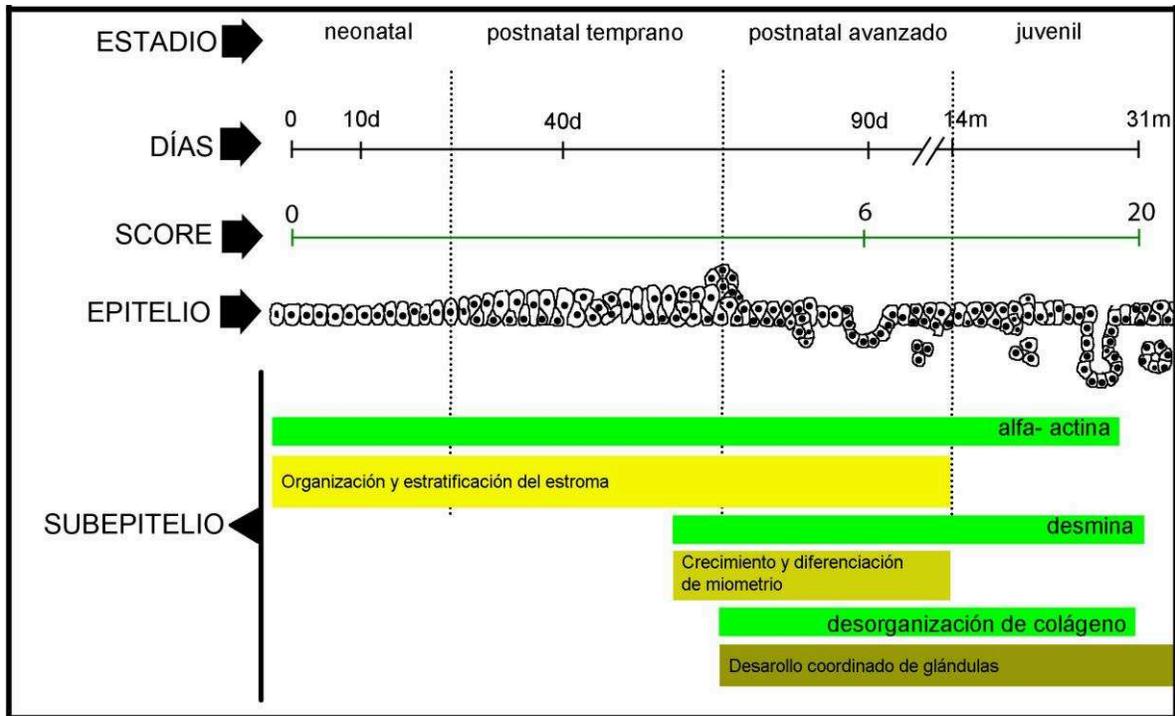
#### **4.1.4- Diferenciación y maduración del tubo uterino de *Caiman latirostris***

El TRF en todas las especies de vertebrados estudiadas es inmaduro al nacimiento y completa su maduración postnatalmente. La diferenciación postnatal del TRF en vertebrados se divide en dos grandes etapas; diferenciación organogenética y diferenciación funcional. La diferenciación organogenética es la etapa de diferenciación postnatal durante la cual se determina la identidad del epitelio Mülleriano. Los cambios que se dan durante esta etapa parecen ser irreversibles una vez que se alcanza la adultez (Kurita y col., 2001). La diferenciación funcional del oviducto es un proceso que, en el caso de especies

murinas, ocurre durante los ciclos estrales y está regulado por estrógenos y P (Kurita y col., 2001). Ampliando al resto de los vertebrados, se puede decir que la diferenciación funcional involucra a los cambios mediados por hormonas gonadales.

Previamente hemos caracterizado la maduración postnatal del tubo uterino de *C. latirostris* en cuatro estadios madurativos diferentes, definidos en función de la edad, masa corporal y largo total de los animales (Galoppo, 2015). Estos estudios confirmaron que, al igual que en los demás vertebrados estudiados, el oviducto de yacaré overo es inmaduro al nacimiento y su diferenciación ocurre postnatalmente. En esta especie los primeros signos de diferenciación se observan en el estadio postnatal temprano y los cambios oviductales pueden agruparse en las tres etapas descritas para la diferenciación organogenética de vertebrados mamíferos. Estas etapas son organización y estratificación del estroma endometrial; diferenciación y crecimiento del miometrio y desarrollo coordinado de glándulas endometriales (Gray y col., 2001).

La etapa de organización y estratificación del estroma se caracteriza por el aumento del grosor de la lámina propia a expensas de componentes celulares y fibrosos y por la desorganización de las fibras de colágeno en zonas adyacentes al epitelio luminal. Estos cambios son particularmente visibles a partir del estadio postnatal avanzado (alrededor de los 3 meses de edad). La diferenciación y crecimiento del miometrio consta de un proceso de regionalización periférica de células que expresan alfa-actina ( $\alpha$ -actina) y aparición y posterior intensificación de la expresión de desmina, especialmente en el estadio postnatal avanzado (figura 13).



**Figura 13: Secuencia de cambios en la histoarquitectura durante la diferenciación morfogénica del oviducto de *Caiman latirostris*.** Se esquematizan los cambios en el sistema de puntos o *score* histofuncional, en la organización de la matriz extracelular y en la expresión de  $\alpha$ -actina y desmina.

Respecto al desarrollo de glándulas, el proceso de adenogénesis involucra una serie de cambios histofuncionales que afectan principalmente al epitelio luminal. Estos cambios, de naturaleza cualitativa y descritos como desarreglos celulares, protuberancias, proyecciones subepiteliales, invaginaciones o *budding* y cambios en el patrón de PAS- positividad, fueron cuantificados a través de un sistema de *score* histomorfológico. La evaluación de estos cambios a través del sistema de *score*, permitió establecer un valor de corte entre oviductos preadenogénicos y adenogénicos. Además, permitió identificar al período postnatal avanzado como el momento a partir del cual el tubo uterino de *C. latirostris* comienza a mostrar indicios de un proceso de adenogénesis avanzado.

Los cambios en la organización y estratificación del estroma, diferenciación y crecimiento del miometrio y proceso de adenogénesis permitieron determinar al estadio postnatal temprano como el momento en el cual los primeros indicios de maduración comienzan a observarse.

#### 4.1.5 Rol de la vía de señalización wnt en la diferenciación organogenética del oviducto

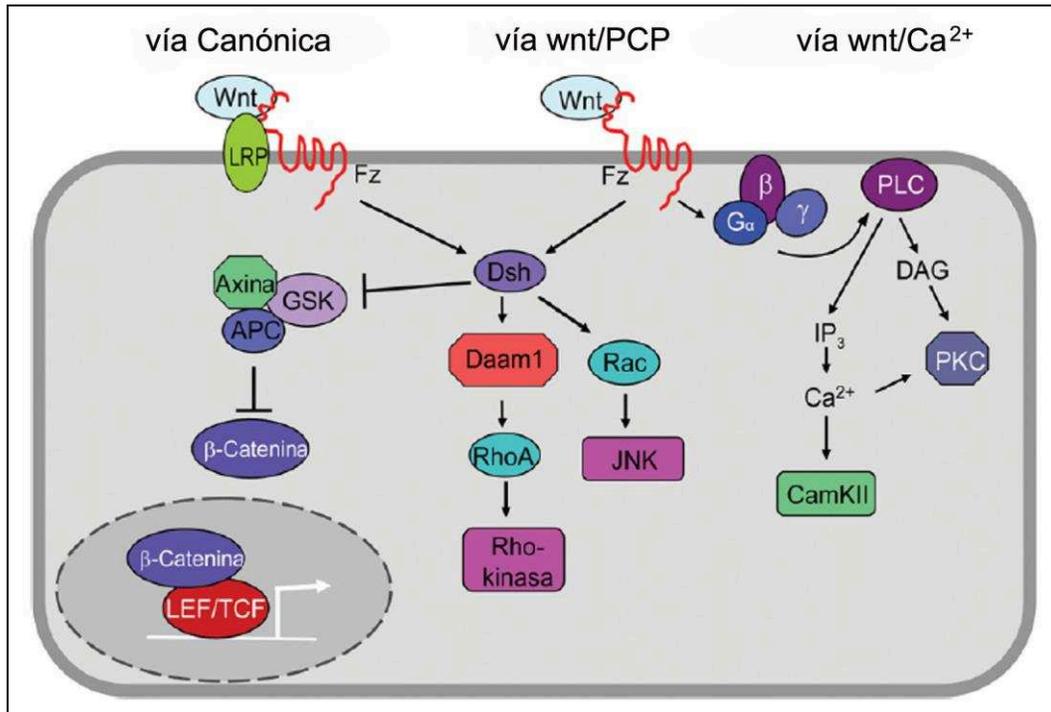
La plasticidad, propiedad característica de la diferenciación organogenética, permite la producción de diferentes fenotipos a partir de un genotipo dado; otorgando identidad a cada región del oviducto. Experimentos hechos en murinos han demostrado que el epitelio oviductal es plástico al inicio del desarrollo postnatal, y que esta plasticidad se va perdiendo a medida que la vida postnatal avanza (Kurita y col., 2001). Los procesos de diferenciación postnatal del TRF han sido estudiados principalmente en murinos, y se han descubierto diferentes moléculas que participan en este proceso, entre ellas las de la familia de proteínas WNT.

Las moléculas WNT son un grupo de glicoproteínas implicadas en los procesos de desarrollo en numerosos órganos. Estas proteínas ejercen su acción uniéndose a un grupo de receptores de membrana denominados *frizzled* (Fz). Esta unión produce la activación de una cascada de señales que se dividen en dos grandes grupos, la vía de señalización canónica y las vías no canónicas (Miller y McCrea en 2010). La vía de señalización canónica involucra a la beta-catenina ( $\beta$ -catenina). La  $\beta$ -catenina es una proteína que puede encontrarse libre en el citoplasma o como parte del complejo cadherina (Wheelock, y Johnson, 2003). La fracción libre, en ausencia de señales wnt, es rápidamente degradada por la vía de proteasoma. Cuando existen señales wnt, la unión de una proteína wnt a su receptor Fz produce la fosforilación y consiguiente estabilización de la  $\beta$ -catenina, llevando a su acumulación citoplasmática. La  $\beta$ -catenina fosforilada posteriormente puede ingresar al núcleo celular donde produce la desrepresión transcripcional de los genes *target* (figura 14) (Miller y McCrea, 2010).

Las vías no canónicas o  $\beta$ -catenina independientes son la vía wnt/ polaridad planar celular (wnt/PCP según sus siglas en inglés) y la vía wnt/calcio (wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ). En la vía wnt/PCP la unión de miembros de la familia wnt al receptor Fz recluta la proteína *Dishevelled* (Dsh) a la membrana celular, quien a su vez activa una vía que involucra a las GTPasas Rho y Rac. En vertebrados, la activación de Rho conduce a la posterior activación de la quinasa asociada a Rho (ROCK), la cual

media rearrreglos en el citoesqueleto. La activación de Rac por parte de Dsh, a su vez, activa la quinasa Jun N-terminal (JNK) que modula la organización del citoesqueleto (figura 14). Esta vía de señalización interviene en la división celular asimétrica, polaridad celular y migración celular.

Durante la activación de la vía  $wnt/Ca^{2+}$  la unión de miembros  $wnt$  al receptor Fz recluta proteína G, la cual traduce la señal a la proteína Dsh, causando activación posterior de la proteinquinasa C (PKC) y Cam quinasa (figura 14). Esta vía afecta principalmente la adhesión celular y contribuye a la especificación del destino celular. Una característica muy importante de esta vía es inhibir la vía canónica de señalización  $wnt$ .



**Figura 14: Vías de señalización  $wnt$ .** Modificado de Miller y McCrea, 2010.

La capacidad de unión de cada componente de la familia  $wnt$  con los receptores Fz, y su capacidad de activar una u otra vía de señalización no están completamente definidas, pero parecen ser dependiente del contexto o incluso yuxtaponerse (Miller y McCrea 2010). Algunos miembros de la familia  $wnt$ , como WNT-8 activarían principalmente la vía canónica. Otros, como WNT-5 y WNT-11,

en forma independiente, activarían principalmente la vía no canónica, pero actuando en forma conjunta activan la vía de señalización canónica (Miller y McCrea, 2010).

Las proteínas WNT son consideradas morfógenos en numerosos tejidos (Cadigan y Nusse, 1997), ejercen su acción a través de mecanismos muy conservados entre especies evolutivamente muy alejadas entre si (Teo y col., 2006) y controlan procesos esenciales del desarrollo, tanto en la etapa prenatal como postnatal. Dentro de los procesos regulados por la familia de proteínas WNT se encuentran el crecimiento, diferenciación, migración, determinación del destino celular y la interacción célula-célula (Hayashi y col., 2011). Respecto a la diferenciación postnatal del TRF, los miembros de la familia wnt tienen una gran importancia en la determinación del patrón anteroposterior y radial (Arango y Donahoe, 2010; Daftary y Taylor, 2006). Estudios hechos en murinos, han señalado la importancia de WNT-7a, WNT-5a y  $\beta$ -catenina en la morfogénesis postnatal uterina (Jeong y col, 2009; Mericskay y col., 2004; Miller y Sasoon, 1998). Estos miembros de la vía de señalización wnt están implicados en la mantención de la histoarquitectura del epitelio luminal, el proceso de adenogénesis y el correcto desarrollo y organización de la capa muscular. La alteración de la expresión de estos componentes ha resultado en hipertrofia del epitelio luminal, supresión de adenogénesis, desorganización de la capa muscular y posteriorización del TRF (Hayashi y col, 2011; Merickskay y col., 2004; Miller y Sasoon, 1998).

Se ha demostrado que, durante la etapa de diferenciación funcional del TRF murino, la vía de señalización wnt es regulada por estrógenos (Miller y col., 1998b). Además, la expresión de distintos miembros de la vía de señalización wnt puede ser blanco de la acción de PEs (Sasoon, 1999; Ingaramo y col., 2016). Dado que los mecanismos de acción de la vía de señalización wnt están conservados en especies muy diferentes entre si, posiblemente también lo estén la sensibilidad a hormonas y a PEs. Esto sugiere que la diferenciación postnatal del oviducto de *C. latirostris* estaría coordinada por lo menos en parte por moléculas de la familia wnt y sería un proceso sensible a la exposición a PEs.

## 4.2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **Hipótesis**

Las vías de señalización wnt están implicadas en la diferenciación oviductal posnatal de *Caiman latirostris*.

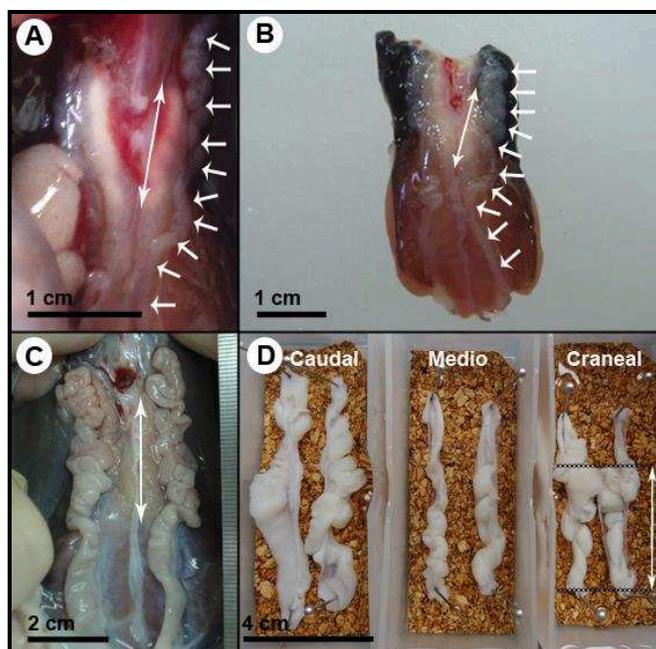
### **Objetivos Específicos**

Caracterizar los patrones de expresión témporo-espacial de moléculas WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina en el oviducto de *Caiman latirostris*

Establecer la relación entre el grado de diferenciación oviductal evaluado por *score* histofuncional y la expresión de WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina.

## 4.3- MATERIALES Y MÉTODOS





**Figura 16: Obtención de muestras de oviducto de *C. latirostris* de diferentes edades.** A: Complejo gonadal-adrenal-mesonefros (flecha doble punta) y oviducto (sucesión de flechas simples) de hembra de 40 días de edad. B: Complejo gonadal-adrenal-mesonefros disecado para posterior fijación. C: Complejo gonadal-adrenal-mesonefros y oviducto de hembra de 12 meses de edad. D: Oviductos de hembra de 12 meses de edad inmovilizados sobre planchas de corcho y seccionados en sus porciones caudal, media y craneal. La doble flecha señala la ubicación del tubo uterino, en el tercio craneal del oviducto.

Como se mencionó en la introducción, Gist (2011) propone la división anatómica del oviducto de reptiles en cinco regiones: infundíbulo, tubo uterino, istmo, útero y vagina. Nuestro estudio se focalizó en los cambios histofisiológicos que se producen en la sección del tubo uterino, ubicado en la porción craneal del oviducto (figura 16 D). En adelante cuando mencionamos oviducto nos referimos a la región del tubo uterino.

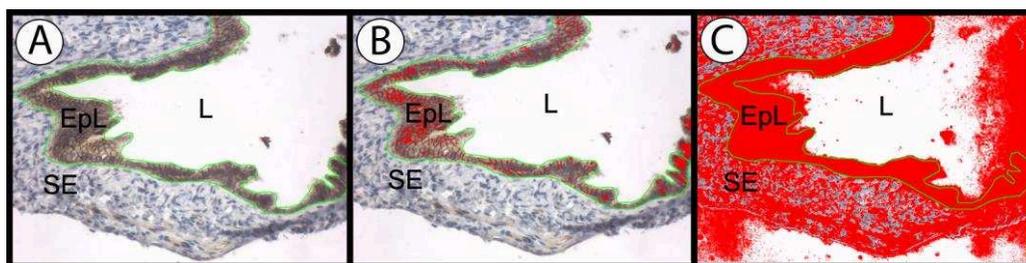
En muestras provenientes de hembras de hasta tres meses de edad, los bloques de parafina fueron desvastados hasta encontrar las tres estructuras características del complejo GAM (la gónada, la glándula adrenal y el mesonefros). La porción de oviducto que acompaña a estas cuatro estructuras se corresponde con el tubo uterino. Realizamos cortes transversales seriados de GAM de  $5\mu$  de espesor en micrótomo (Leica®), los cuales fueron montados sobre portaobjetos previamente tratados con adhesivo tisular (silano 0,5%). Cuando las muestras provenían de animales juveniles, se confeccionaron bloques conteniendo cada una de las diferentes porciones del oviducto por separado.

### 4.3.2- Evaluación de biomarcadores de la vía de señalización wnt

La expresión de los diferentes miembros de la vía de señalización wnt implicados en la diferenciación organogénica del TRF se realizó utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) según protocolo general descrito en tabla A6. Las condiciones utilizadas para cada marcador se encuentran descritas en tabla A7.

La cuantificación de la expresión de  $\beta$ -catenina y WNT-5a se realizó por análisis de imágenes utilizando el software Image pro plus. Se delineó manualmente el compartimiento de referencia para cada marcador (subepitelio para WNT-5a; y epitelio para  $\beta$ -catenina), utilizando una herramienta del *software* que permite seleccionar colores, se determinó el área inmunomarcada y el área de referencia total. La figura 17 ejemplifica los pasos seguidos para la cuantificación de  $\beta$ -catenina..

La cuantificación de estos marcadores se realizó a través de la relación porcentual entre el área total y el área inmunomarcada y se expresó como el porcentaje del área total de referencia ocupada por cada marcador.



**Figura 17: Cuantificación de la expresión de  $\beta$ -catenina.** A. Delineado del área de referencia (región delimitada por línea de trazo verde). B Selección del área inmunomarcada dentro del área de referencia (coloreada en rojo por el *software*). C. Determinación de área de referencia total (área total delimitada por línea de trazo verde y coloreada en rojo por el *software*). EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. IHQ para  $\beta$ -catenina revelada con DAB y contracoloreada con Hematoxilina de Mayer.

La expresión de WNT-7a se determinó por recuento diferencial de células inmunomarcadas respecto del número total de células del epitelio luminal oviductal. Los resultados se expresaron como % de células epiteliales WNT (+).

### 4.3.3- Análisis estadístico

Todos los resultados fueron sometidos a tests de normalidad. Se utilizaron tests paramétricos para aquellas variables con distribución normal (test de (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y test de homogeneidad de variancias (Test de Levene). variancia múltiple (ANOVA) seguido de post test t de student de dos colas. Todos los test estadísticos se efectuaron utilizando un intervalo de confianza del 95%.

Parar todos aquellos datos que no cumplieron con el test de normalidad, se emplearon tests de estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis seguido de post test de Mann Whitney). Para establecer la fuerza de relación lineal entre la expresión de WNT-5a, WNT-7a y  $\beta$ -catenina y el grado de diferenciación evaluado por *score* histofuncional, se realizó test de correlación de Spearman.

## 4.4- RESULTADOS

#### 4.4.1.- Animales

Los huevos y crías utilizados para la caracterización de la expresión de moléculas relacionadas con la morfogénesis oviductal (WNT-7a, WNT-5a,  $\beta$ -catenina) presentaron características similares al grupo tomado como referencia (tabla 3). Los valores de referencia se calcularon a partir de registros de variables de huevos obtenidos en ocho temporadas reproductivas provenientes de zonas con baja intervención antrópica y libres de tratamiento.

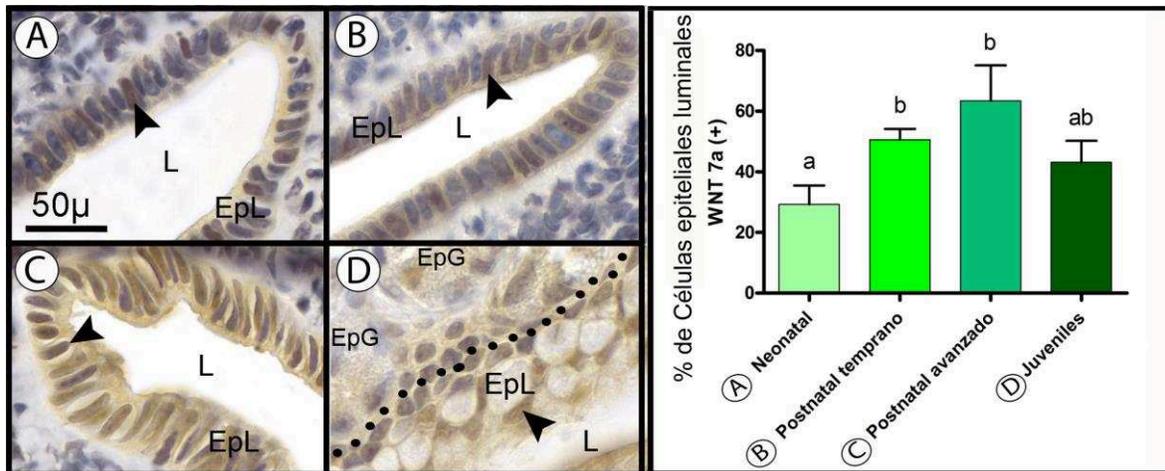
**Tabla 3:** Características de los huevos y variables alométricas al nacimiento de hembras de *Caiman latirostris*

	Variable	Referencia	Experimentales
HUEVOS	Número de huevos	146	26
	Masa (g)	73,01 $\pm$ 6,24	69,98 $\pm$ 6,45
	Eje mayor (cm)	68,34 $\pm$ 3,43	67,34 $\pm$ 3,61
	Eje menor (cm)	42,92 $\pm$ 1,53	42,40 $\pm$ 1,89
NEONATOS	Número de neonatos	146	26
	Masa corporal de neonatos (g)	47,05 $\pm$ 4,70	51,43 $\pm$ 4,03
	Largo total de neonatos (cm)	22,93 $\pm$ 0,81	23,19 $\pm$ 0,87
	Distancia hocico – cloaca (cm)	10,90 $\pm$ 0,43	11,2 $\pm$ 0,27
	Ancho occipital (mm)	16,92 $\pm$ 0,71	17,27 $\pm$ 0,27

Los resultados están expresados como  $X \pm SD$ . La comparación entre ambos grupos se realizó aplicando test t de student de dos colas con 95% de confianza.

#### 4.4.2.- Expresión de WNT-7a durante el desarrollo oviductal

WNT-7a es una de las moléculas que intervienen en la vía de señalización responsable del establecimiento del patrón radial oviductal. Además establece, junto con otras proteínas, el patrón de diferenciación anteroposterior. La expresión de la proteína WNT-7a en el oviducto postnatal de *C. latirostris* se restringe al epitelio luminal y se caracteriza por presentar un patrón de marcación nuclear (figura 18).

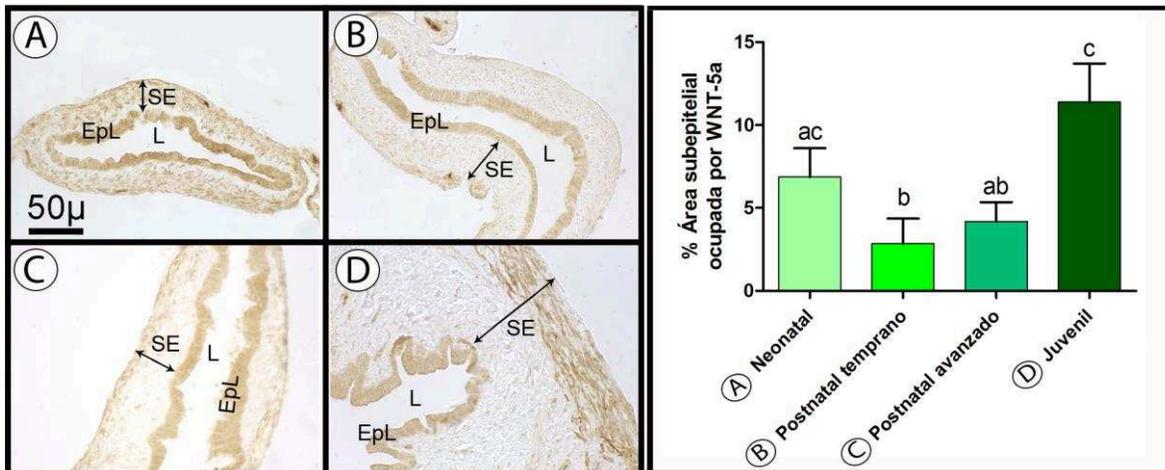


**Figura 18: Patrón témporo-espacial de la expresión oviductal de WNT-7a.** En cortes de tubo uterino se observa que la inmunomarcación para WNT-7a se localiza en el epitelio luminal. A: neonatal; B: postnatal temprano; C: postnatal avanzado; D: juvenil. Las IHQ se revelaron con DAB y se contracoloraron con hematoxilina de Mayer. EpL: Epitelio luminal, EpG: Epitelio glandular. Las puntas de flechas muestran núcleos positivos para WNT-5a. La línea de puntos en D muestra el límite entre Epitelio luminal y Epitelio glandular. Las barras muestran el patrón temporal de cambios en la expresión de WNT-7a. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los grupos que comparten letras no guardan diferencias estadísticas entre sí. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

El nivel de expresión de esta proteína aumenta significativamente desde el estadio neonatal manteniendo sus niveles máximos durante los estadios postnatal temprano y postnatal avanzado. Luego, la expresión de WNT-7a disminuye a niveles intermedios entre estos estadios y el neonatal.

#### 4.4.3. Expresión de WNT-5a durante el desarrollo oviductal

La proteína WNT-5a actúa en conjunto con WNT-7a y tiene, entre otras funciones, regular el proceso de adenogénesis oviductal. La expresión de la proteína WNT-5a, en el oviducto de *C. latirostris* es del tipo citoplasmática y se observa tanto en el epitelio luminal como en el subepitelio oviductales. En los estadios madurativos más tempranos, WNT-5a se encuentra dispersa en todo el subepitelio sin una compartimentalización definida (figura 19A). En el estadio juvenil, la expresión subepitelial de WNT-5a se localiza en la parte más externa del mismo (muscular) (figura 19D).

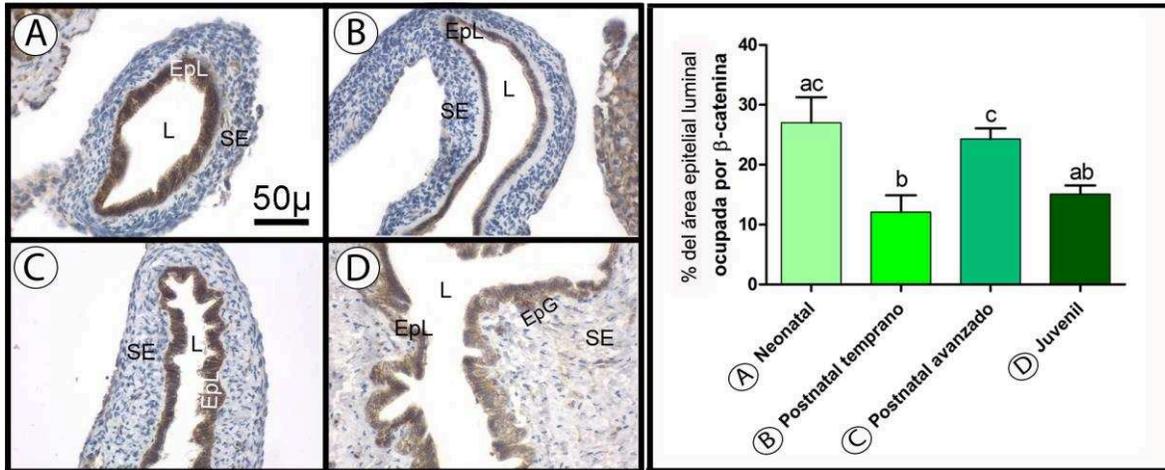


**Figura 19: Patrón témporo-espacial de expresión de WNT-5a en los distintos estadios madurativos de *Caiman latirostris*.** A-D: Cortes de tubo uterino correspondientes a distintos estadios madurativos inmunomarcados para WNT-5a. A: neonatal; B: postnatal temprano; C: postnatal avanzado; D: juvenil. Las IHQ se revelaron con DAB. EpL: Epitelio luminal, L: Lúmen; SE: Subepitelio. Las dobles flechas indican la extensión de la zona subepitelial. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los grupos que comparten letras no guardan diferencias estadísticas entre sí. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

Como muestra la figura 19, los niveles de expresión de WNT-5a en el compartimiento subepitelial disminuyen significativamente desde el estadio neonatal hacia el postnatal temprano. A esta caída, le sigue un aumento gradual que se vuelve significativo en el estadio juvenil, donde los niveles de expresión son comparables con los observados durante la etapa neonatal.

#### 4.4.4.- Expresión epitelial de $\beta$ -catenina durante el desarrollo oviductal normal.

La  $\beta$ -catenina es componente de la vía canónica de señalización wnt y además forma parte de un complejo con la proteína de membrana cadherina, sirviendo de unión entre ésta y el citoesqueleto. La evaluación de su expresión durante los diferentes estadios madurativos permitiría determinar la posible participación de la vía canónica de wnt en el desarrollo postnatal del oviducto.

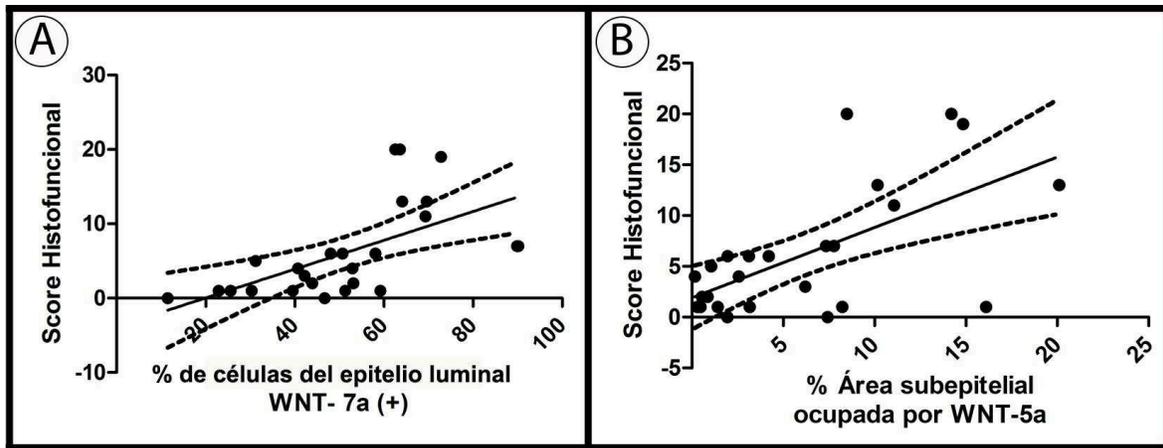


**Figura 20: Patrón-temporo-espacial de expresión oviductal de  $\beta$ -catenina en los distintos estadios madurativos de *Caiman latirostris*.** A-D: Cortes de tubo uterino correspondientes a distintos estadios madurativos inmunomarcados para  $\beta$ -catenina. A: neonatal; B: postnatal temprano; C: postnatal avanzado; D: juvenil. Las IHQ se revelaron con DAB y se contracoloraron con hematoxilina de Mayer. EpL: Epitelio luminal, EpG: Epitelio glandular; L: Lúmen; SE: Subepitelio. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los grupos que comparten letras no guardan diferencias estadísticas entre sí. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

La  $\beta$ -catenina muestra un claro patrón de expresión de membrana en el epitelio luminal. Durante los sucesivos estadios madurativos, se observa una relativa uniformidad en esta la expresión, excepto durante el estadio postnatal temprano, caracterizado por una disminución significativa de la misma.

#### 4.4.5- Relación entre la expresión oviductal de las moléculas de la vía de señalización wnt y la diferenciación morfogenética oviductal.

La diferenciación morfogenética del TRF en todos los vertebrados estudiados está coordinada por la vía de señalización wnt. Para determinar si estas mismas vías intervienen en la diferenciación oviductal de *C. latirostris*, se estudió la fuerza de relación entre la expresión de WNT-7a, WNT-5a y  $\beta$ -catenina con el score histofuncional (Galoppo, 2015).



**Figura 21: Relación entre la expresión de proteínas miembros de la vía de señalización wnt y el proceso de diferenciación postnatal oviductal de *Caiman latirostris*.** A: Correlación de Spearman para WNT-7a.  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,7577$ . B: Correlación de Spearman para WNT-5a.  $p = 0,002$ ;  $r = 0,6837$ . Test de Correlación de Spearman de dos colas; 95% de confianza.

Tanto la expresión de WNT-7a como de WNT-5a se correlacionan significativamente con el *score* histofuncional en todos los estadios de desarrollo (figura 21). La expresión epitelial de  $\beta$ -catenina, en cambio, no se correlaciona con el grado de desarrollo oviductal evaluado por *score* ( $p = 0,5140$ ;  $r = -0,1829$ ).

---

## 4.5- DISCUSIÓN

Los huevos y crías con los cuales se trabajó en la presente caracterización fueron estadísticamente idénticos respecto al grupo considerado de referencia en los parámetros evaluados. Previamente evidenciamos la exposición natural de madres y embriones a PEs debido a su presencia en huevos de yacaré provenientes de zonas de baja a moderada intervención antrópica (Stoker y col., 2011). Sin embargo, los niveles hallados son similares a los reportados para sitios de referencia en Estados Unidos de Norteamérica y Belice (Wu y col., 2000; Cobb y col., 2002). Esto sugiere que aunque existe exposición natural de yacarés overos a PEs, ésta es insuficiente para producir modificaciones en los parámetros evaluados. De esta manera, la probabilidad de que la misma actúe como factor de confusión en los resultados presentados en el presente trabajo es baja.

Actualmente se asume que las señales wnt actúan como morfógenos. Un morfógeno clásico forma un gradiente que determina el destino celular de una manera concentración-dependiente (Clevers y Nusse, 2012). La vía de señalización de las proteínas wnt está relacionada al crecimiento y desarrollo del TRF. La mayor parte del conocimiento de estas vías y su importancia en el desarrollo postnatal del TRF proviene de estudios en vertebrados mamíferos, principalmente murinos. Según estos estudios, los integrantes de la familia wnt que tienen mayor importancia en el desarrollo postnatal del TRF son los miembros WNT-7a y WNT-5a. WNT-7a interviene en el establecimiento del patrón anteroposterior y radial de TRF (Miller y Sasoon, 1998), está implicado en el proceso de adenogénesis (Miller y col., 1998b; Mericskay y col., 2004) e intervendría en el crecimiento y diferenciación del miometrio (Ma y Sasoon, 2006). WNT-5a, por su parte, está involucrado junto con WNT-7a en la adenogénesis (Mericskay y col., 2004). Estas glicoproteínas guardan cierta regionalización en el TRF murino postnatal. WNT-7a se caracteriza por expresarse en el epitelio, mientras que WNT-5a, aunque de ubicación principalmente subepitelial puede expresarse en el epitelio (Carta y Sasoon, 2004). Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos. Estudios hechos en ratones en edad reproductiva muestran que la expresión de WNT-5a se restringe al subepitelio en las etapas del ciclo estral caracterizadas por altas concentraciones de estrógenos circulantes

sugiriendo represión de la expresión epitelial de WNT-5a por parte de los estrógenos (Miller y col., 1998b). Probablemente la marcación epitelial observada para WNT-5a refleje los bajos niveles de estrógenos endógenos circulantes que caracterizan el período prepuberal.

Durante el proceso de diferenciación y desarrollo glandular en ratones, se ha propuesto una regulación mutua entre WNT-7a y WNT-5a. WNT-7a sería en primera instancia responsable de la mantención de altos niveles de moléculas que intervienen en la diferenciación, entre las cuales se encuentra WNT-5a. WNT-5a, a través de un factor desconocido X produciría la regulación en baja de WNT-7a. La represión de WNT-7a en zonas puntuales del epitelio luminal permitiría el cambio de destino del mismo, la invaginación y posterior formación de glándulas (Mericskay y col., 2004). La expresión de WNT-7a en el epitelio luminal de *C. latirostris* muestra un continuo aumento desde el estadio neonatal hasta el estadio postnatal avanzado. El aumento en WNT-7a epitelial se acompaña de una inicial caída de WNT-5a subepitelial seguida de un aumento en estadios sucesivos. Según lo propuesto por Mericskay y col., 2004, los altos niveles de WNT-7a que se observan en yacaré overo durante los estadios postnatal temprano y avanzado, colaborarían en el establecimiento de niveles de WNT-5a suficientes para facilitar el inicio del proceso de adenogénesis. La acción de WNT-5a se hace evidente durante el estadio postnatal avanzado a través de los cambios evaluados por medio del *score* histofuncional que indican un proceso de adenogénesis avanzada (Galoppo, 2015). La asociación temporal de altos niveles de WNT-7a, niveles de WNT-5a en aumento y ocurrencia de *scores* cercanos a 6 (adenogénicos) indica la participación de esta vía de señalización en la diferenciación oviductal de *C. latirostris*. Durante el estadio juvenil, la disminución, aunque no significativa desde el punto de vista estadístico, de los niveles de WNT-7a se corresponde con un aumento de los niveles de WNT-5a, sugiriendo que esta proteína habría alcanzado los niveles necesarios como para ejercer su retroalimentación negativa en el *loop* regulatorio propuesto por Mericskay y col., (2004). La regulación en baja de WNT-7a y el aumento de WNT-5a permiten que el proceso de adenogénesis, clave en la diferenciación morfogénica, continúe. La evidencia histomorfológica

de este proceso se traduce en *scores* superiores a 6, que llegan hasta 20, indicando la presencia de glándulas. Desconocemos las razones del aumento de WNT-7a desde el estadio neonatal hasta postnatal avanzado. En murinos, la variación de WNT-7a en el ciclo estral indica que ésta sería una proteína sensible a los niveles de esteroides circulantes (Miller y col., 1998b). Dado que los estadios madurativos de *C. latirostris* estudiados han sido caracterizados como prepuberales (Galoppo, 2015) y las concentraciones circulantes de hormonas esteroides endógenas serían bajas, el aumento de WNT-7a observado sería estrógeno o progesterona-independiente.

La  $\beta$ -catenina es una molécula involucrada en la vía canónica de señalización wnt y componente clave del complejo cadherina, encargado de controlar la adhesión intercelular y procesos de migración celular (Nelson y Nusse, 2004). Con el fin de determinar si la diferenciación postnatal del oviducto de *C. latirostris* involucra la activación de la vía canónica de señalización wnt, se estudió la expresión de esta molécula en los distintos estadios madurativos. La activación de la vía canónica de señalización wnt involucra el aumento de los niveles citoplasmáticos y nuclear de  $\beta$ -catenina (Nelson y Nusse, 2004) relacionados con los niveles de moléculas wnt capaces de unirse a los receptores y estimular esta vía. En yacaré overo, la expresión de  $\beta$ -catenina muestra un patrón de membrana y niveles oscilantes a lo largo de los diferentes estadios evaluados Tanto el patrón de expresión hallado en nuestro estudio como los niveles de expresión oscilantes de  $\beta$ -catenina que no se relacionan a los niveles de expresión de WNT-5a ni de WNT-7a, apoyan la idea de una regulación a través de una vía no canónica.

Los estudios de correlación entre la expresión de las proteínas miembros de la vía de señalización wnt y el proceso de diferenciación morfogénica evaluado por *score* histofuncional indican que tanto WNT-7a como WNT-5a están implicadas en este proceso. Estos resultados, además confirman que los cambios observados durante la diferenciación morfogénica del oviducto de *C. latirostris* son coordinados por una vía wnt  $\beta$ -catenina independiente.

## V.- CAPITULO 2

Efecto de la exposición postnatal temprana a xenoestrógenos sobre la histoarquitectura e histofuncionalidad del oviducto de *Caiman latirostris*.

## 5.1- INTRODUCCIÓN

### 5.1.1- Antecedentes de efectos de PEs sobre el TRF

La mayoría de los estudios acerca de los efectos de PEs sobre el TRF se realizaron en vertebrados mamíferos, especialmente ratas y ratones; y se focalizaron en la región uterina. En reptiles, los efectos de PEs han sido estudiados en los órdenes Escamosos (Squamatas) (lagartos) y Testudinados (Testudines) (tortugas). Aunque estos antecedentes son importantes, se ha demostrado que el oviducto de los cocodrílidos está estructural y funcionalmente más relacionado con el de las aves que con el de estos reptiles (Palmer y Guillete, 1992). Las razones de estas similitudes serían del tipo evolutivas, ya que ambos pertenecen al grupo *Archosauria*. Por esta razón es que, dentro de las especies ovíparas, los resultados de estudios hechos en oviductos de aves pueden ser similares a los obtenidos en cocodrílidos.

En aves, se ha demostrado que la exposición *in ovo* a etinil estradiol (EE2) (xenoestrógeno utilizado como anticonceptivo, de amplia distribución ambiental), BPA o dietilestilbestrol (DES) produjo anomalías estructurales en los oviductos. Algunos de los efectos en el TRF fueron visibles en etapas postnatales tempranas y otros evidentes solo cuando los animales alcanzaron la madurez sexual (Berg y col., 2001; Yigit y Daglioglu, 2010). Entre los efectos observados en oviductos inmaduros (prepuberales) se encuentran diferenciación precoz de epitelio luminal a epitelio glandular, aumento en el número de células secretoras, aumento en el número de células ciliadas, engrosamiento de la capa muscular y aumento de altura epitelial (Berg y col., 2001). En animales adultos previamente expuestos *in ovo*, se observó mayor altura del epitelio oviductal, reducción del número de glándulas uterinas y dificultades en la ovipostura, y disminución del grosor de la mucosa (Berg y col., 2001; Yigit y Daglioglu, 2010).

En ratones, la exposición a genisteína o la mezcla comercial de PCBs Aroclor produjo alteraciones locales significativas que incluyeron engrosamiento del compartimientos estromal y muscular a expensas principalmente de tejido muscular adicional; poca definición entre la capa muscular lisa interna y externa; presencia de seudoglándulas cerca de la superficie epitelial; incremento inicial en el número de glándulas seguido de una posterior disminución en estadíos de

desarrollo más avanzado; presencia de áreas localizadas de excesiva proliferación epitelial; presencia de áreas de desorganización epitelial y estratificación epitelial (Jefferson y col., 2011; Ma y Sasson, 2006).

En ovinos, la exposición neonatal a valerato de  $17\beta$  estradiol produjo, en la zona uterina del TRF; inhibición de adenogénesis; disminución del grosor endometrial; aumento del grosor del miometrio; aumento de altura epitelial luminal; disminución en la expresión de ER $\alpha$  y de factores de crecimientos derivados del estroma (Carpenter y col., 2003).

Estos resultados indicarían que el TRF es sensible a la exposición a PEs en distintas etapas del desarrollo, y que estas exposiciones pueden llevar distintos tipos de alteraciones, algunas visibles en el corto plazo y otras de aparición más tardía.

## 5.2- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:**

La exposición de yacarés overos a PEs durante las etapas tempranas del desarrollo produce modificaciones en el patrón de témporo-espacial de desarrollo oviductal y de las vías de señalización implicadas en la diferenciación morfogénica del TRF.

**Objetivos específicos:**

Determinar los efectos de la exposición postnatal temprana a PEs sobre la histoarquitectura oviductal a través del estudio de la altura del epitelio luminal, grado de organización del colágeno subepitelial y expresión de proteínas asociadas al tejido muscular ( $\alpha$ -actina y desmina).

Identificar cambios en biomarcadores de histofuncionalidad oviductal (*score* histofuncional, actividad proliferativa, expresión de receptores de hormonas esteroideas sexuales).

Analizar los posibles cambios en la histoarquitectura y la histofuncionalidad respecto del patrón témporo-espacial normal del desarrollo oviductal.

Determinar cambios en el patrón témporo-espacial de moléculas de la vía de señalización WNT-7a, WNT-5a y  $\beta$ -catenina como consecuencia a la exposición a xenoestrógenos.

## 5.3- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1- Animales

La cría de animales desde su nacimiento hasta el momento del sacrificio se realizó según fue descrito en la sección 3.1.4.

### 5.3.2- Diseño experimental

Con el fin de observar los cambios oviductales ante la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales, 76 hembras provenientes de 14 nidos fueron distribuidas al nacimiento equitativamente en 5 grupos experimentales, vehículo (-matriz en la cual se disuelven los estrógenos ambientales para ser inyectados- aceite de maíz; n=15); control positivo de exposición a estrógenos (E2 0,014ppm; n=16 y E2 1,4ppm; n=15); y exposición a un estrógeno ambiental (BPA 1,4ppm; n= 16 y BPA 140ppm; n=14). BPA y 17β estradiol, ambas Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA se disolvieron en etanol absoluto (Merck, Alemania) y en aceite de maíz. Los tratamientos se administraron en inyecciones subcutáneas aplicadas los días post nacimiento 26 y 33 (figura 22).

La distribución de huevos provenientes del mismo nido en los distintos grupos permite evitar sesgos en los resultados atribuibles a características propias del nido (“efecto nido”).

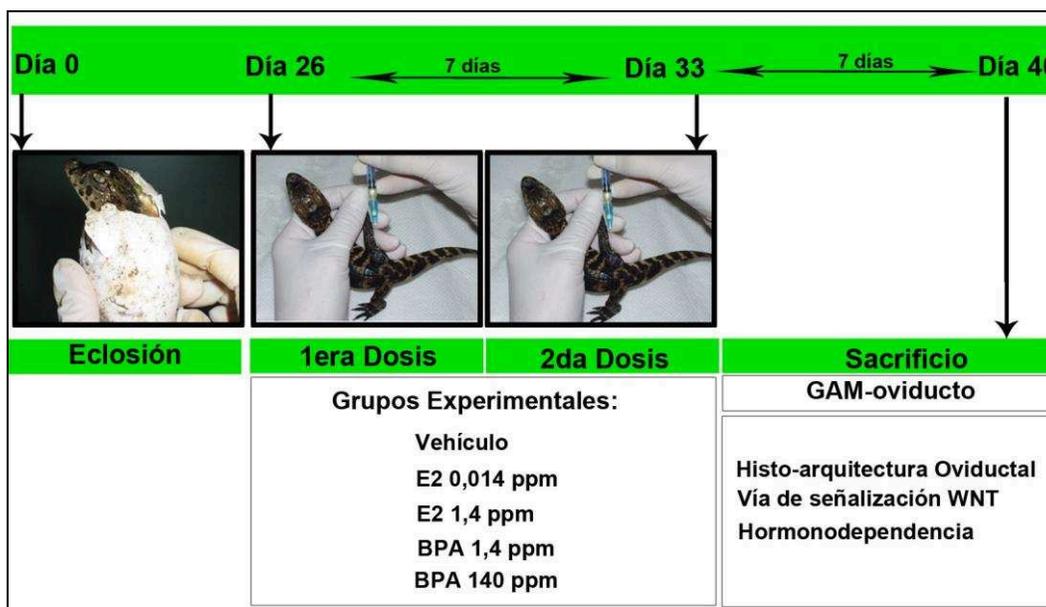


Figura 22: Efectos de la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales sobre la histofuncionalidad del oviducto de *C. latirostris*. Esquema del diseño experimental.

Los animales se pesaron 24hs antes de cada inyección. Utilizando la masa corporal promedio de los animales, se prepararon las soluciones a administrar de forma tal que el volumen de inyección para cada animal sea de aproximadamente 0,8 ml. Cuatro horas antes del sacrificio los animales se inyectaron con 6 mg/kg de masa corporal de BrdU vía intraperitoneal.

### **5.3.3- Toma de muestras y procesamiento histológico**

Inmediatamente después del sacrificio los GAM fueron disecados y procesados para histología según protocolo general (tabla A1) detallado en 3.2.

### **5.3.4- Estudio de la histoarquitectura e histofuncionalidad del oviducto**

#### **5.3.4.1- Tinciones histoquímicas**

Para describir la histoarquitectura del oviducto se emplearon las tinciones histoquímicas tricrómica de picrosirius - hematoxilina de Harris (tabla A4) (Junqueira y Junqueira, 1983), picrosirius – hematoxilina de Harris para luz polarizada (tabla A5) y ácido peryódico – base de Schiff (PAS) (tabla A3).

La tinción de picrosirius-hematoxilina de Harris permite observar claramente la morfología celular así como la presencia y disposición de las fibras de colágeno, facilitando la identificación de los diferentes compartimientos histológicos en el oviducto (figura 23).

La tinción de picrosirius-polarización permite reconocer, debido a diferentes colores de birrefringencia bajo luz polarizada, distintos grados de organización de las fibras de colágeno (Montes y Junqueira, 1991). Con esta herramienta se evaluaron cambios en la organización del colágeno en el compartimiento subepitelial (figura 24).

La tinción de PAS marca macromoléculas que contienen alta proporción de carbohidratos y glicoconjugados (glucógeno, glucoproteínas y proteoglucanos) que se encuentran típicamente en tejidos conectivos, mucus y membranas basales. Esta técnica permitió la visualización y ubicación de secreciones glucoproteicas.

Todas las tinciones se realizaron sobre tres cortes transversales consecutivos del tubo uterino, de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, separados 150  $\mu\text{m}$  uno de otro, tomando como referencia el complejo GAM.

#### 5.3.4.2- Altura de epitelio oviductal

Cortes transversales provenientes de tres diferentes profundidades separadas se tiñeron con tricrómica de picrosirius y se contracoloraron con hematoxilina de Harris (Junqueira y Junqueira, 1983) (ver detalles en tabla A4). Las muestras se evaluaron al microscopio óptico y se capturaron y digitalizaron imágenes utilizando objetiva de 40X que abarcó la totalidad del epitelio oviductal.

Como se ilustra en la figura 23, para establecer la altura epitelial, se delineó manualmente el recorrido de los bordes apical y basal del epitelio luminal. La altura de epitelio se calculó automáticamente como el promedio de la longitud de los segmentos perpendiculares que unen en cada punto las dos líneas trazadas. La altura epitelial final se calculó como el promedio de todos los promedios obtenidos para cada una de las imágenes analizadas.

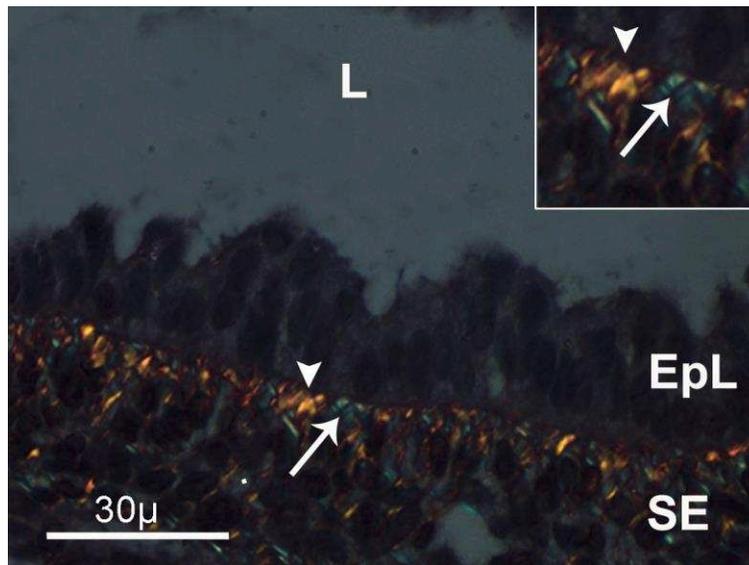


**Figura 23. Altura del epitelio luminal del oviducto.** Tinción tricrómica picrosirius-hematoxilina de Harris. Delineado de los bordes que limitan el compartimento epitelial utilizando *software* Image pro Plus. EpL: Epitelio Luminal; SE: Subepitelio; L: Lúmen. Las dobles flechas indican extensión aproximada de los compartimentos Epitelial luminal y Subepitelial.

### 5.3.4.3- Organización de las fibras de colágeno en el subepitelio oviductal

Siguiendo el protocolo detallado en la tabla A5, se colorearon cortes histológicos según el método picrosirius-polarización. La técnica de picrosirius-polarización permite, a través de la capacidad de birrefringencia que tienen las fibras colágenas bajo luz polarizada, distinguir el grado de organización de las mismas. Las especies de colágeno con alto grado de organización se caracterizan por presentar alta intensidad de birrefringencia de color rojo, naranja o amarillo. Los tipos de colágeno menos organizados exhiben baja intensidad de birrefringencia, de color verde (Montes y Junqueira, 1991).

Los cortes fueron observados en microscopio óptico bajo luz polarizada utilizando filtro de polarización modelo BH-POL, Olympus Optical Co., LTD. Las imágenes se obtuvieron por captura y digitalizaron utilizando objetiva de 40X y 100X.



**Figura 24: Organización de las fibras de colágeno en el sub-epitelio oviductal.** Imagen principal: Patrones de birrefringencia característica de colágeno con distinto grado de organización. Punta de flecha: birrefringencia naranja, característica de colágeno altamente organizado. Flecha: birrefringencia verde, característica de colágeno pobremente organizado. Inserto: Detalle de distintos patrones de birrefringencia. EpL: Epitelio luminal; SE: Subepitelio; L: Lúmen Tinción de picrosirius-polarización.

Utilizando *software* de análisis de imágenes digitalizadas, se determinó el área ocupada por colágeno con birrefringencia verde (área ocupada por colágeno

de bajo nivel de organización), y el área de birrefringencia roja, naranja y amarilla (área ocupada por colágeno altamente organizado). Por suma de ambas áreas se obtuvo el área subepitelial total ocupada por colágeno (colágeno subepitelial total). El grado de organización de colágeno subepitelial se calculó como el porcentaje del colágeno total representado por colágeno con bajo nivel de organización.

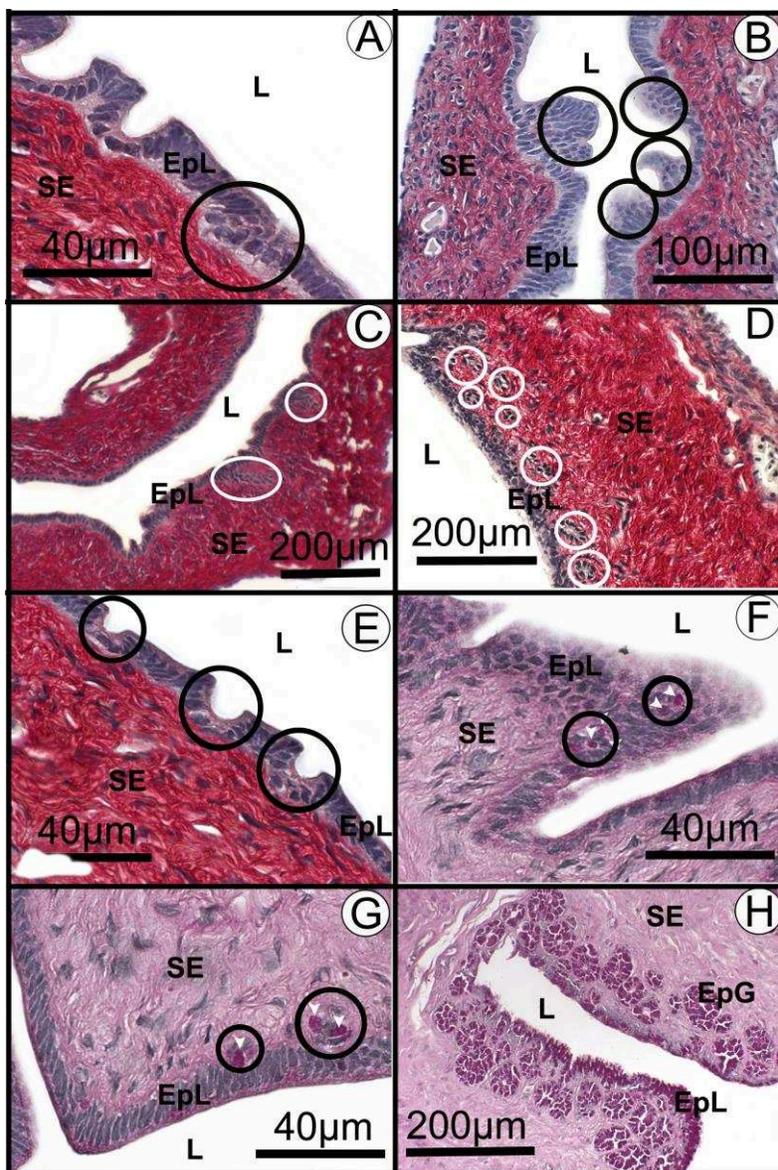
#### **5.3.4.4- Expresión de proteínas asociadas al tejido muscular**

Con el fin de determinar si la exposición a xenoestrógenos tiene efectos sobre el proceso de crecimiento y organización del miometrio, se utilizaron técnicas IHQ para identificar la expresión de  $\alpha$ -actina y desmina según condiciones detalladas en tablas A6 y A7. La cuantificación se realizó por análisis de imágenes utilizando el *software* Image pro plus de forma similar a lo explicado en 4.3.2 para la cuantificación de la expresión de WNT-5a. Brevemente, se delineó manualmente el compartimiento de referencia (subepitelio) y a través de la selección de colores, se determinó el área inmunomarcada (área ocupada por color marrón) y el área subepitelial total. La expresión de estos marcadores se realizó a través de la relación porcentual entre ambas áreas y se expresó como el porcentaje del subepitelio ocupada por cada marcador.

#### **5.3.4.5.- Cuantificación de cambios histomorfológicos y tintoriales.**

Para evaluar los cambios histofuncionales debido a la exposición a xenoestrógenos, se utilizó el sistema de puntaje o *score* histofuncional previamente establecido (Galoppo, 2015). Este sistema se basa en la identificación de una serie de características histomorfológicas y cambios en los patrones espaciales de tinción útiles para el estudio de los procesos madurativos del oviducto (la adenogénesis entre ellos). Cada sección histológica se evaluó identificando cada una de las características histológicas ilustradas en la figura 25 y registrando el número de veces que la misma apareció en cada muestra (n). Se calculó la media (X) y desvío estándar (SD) para cada una de tales características en cada estadio madurativo. Con las X y los SD se diseñaron rangos, y a cada rango se les asignó un puntaje o *score* parcial. Se asignó un puntaje parcial de

cero (0) cuando la característica evaluada no se observó; un puntaje parcial de uno (1) cuando el número de veces que aparece la característica en estudio ( $n$ ) se encontró entre 0 y medio desvío estándar ( $0 < n \leq SD/2$ ); un puntaje parcial de dos (2) cuando la característica se registró un número de veces entre la media y medio desvío estándar ( $SD/2 < n \leq X$ ) y un puntaje de tres (3) cuando la característica se observó un número de veces mayor a la media ( $n > X$ ). El puntaje o *score* histofuncional final se calculó sumando los puntajes o *scores* parciales obtenidos para cada característica evaluada. Dado que el máximo puntaje obtenido para oviductos sin presencia de glándulas fue 19; se asignó un puntaje final de 20 a aquellos oviductos que presenten glándulas (figura 25H), independientemente de la presencia de cualquier otra característica histológica (figura 25A-G)



**Figura 25: Características histológicas y patrones de tinción utilizados en el sistema de puntaje o score histofuncional** A: Desorden epitelial. B: Protuberancias. C: Proyecciones subepiteliales. D: Grupos de células epiteliales en subepitelio. E: invaginaciones o budding. F: PAS positividad intraepitelial. G: PAS positividad subepitelial. H: Glándulas mucosas. A-E: Tinción de picosirius-hematoxilina de Harris. F-H: Tinción de PAS. EpL: Epitelio luminal; EpG: Epitelio glandular; L: Lúmen; SE: Subepitelio

#### 5.3.4.6- Actividad proliferativa del epitelio luminal

La actividad proliferativa del epitelio luminal oviductal se evaluó mediante la incorporación de bromo-deoxiuridina (BrdU), revelada por técnica IHQ detallada en tablas A6 y A7. La cuantificación se realizó por recuento diferencial de células totales y células inmunomarcadas y los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas respecto de las células totales.

#### 5.3.4.7- Expresión de receptores de hormonas esteroides sexuales

La expresión oviductal de ER $\alpha$  se determinó en los compartimientos epitelial y subepitelial y la expresión del receptor de progesterona (PR) en el

compartimiento epitelial. La determinación de ER $\alpha$ , se realizó sobre cortes histológicos recién obtenidos (la edad de los cortes afecta la conservación de la antigenicidad). El protocolo general de IHQ y las condiciones particulares para cada marcador se consignan en la tabla A6 y en la tabla A7. La evaluación de la expresión de ER $\alpha$  se realizó utilizando un anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio. El anti-ER $\alpha$  se generó siguiendo un protocolo utilizado previamente (Rey y col. 2006). La evaluación de la expresión de PR se llevó a cabo utilizando un anticuerpo comercial de probada utilidad en muestras de rata y humanos (Traish y col, 1990; Varayoud y col, 2008a; Monje y col, 2010).

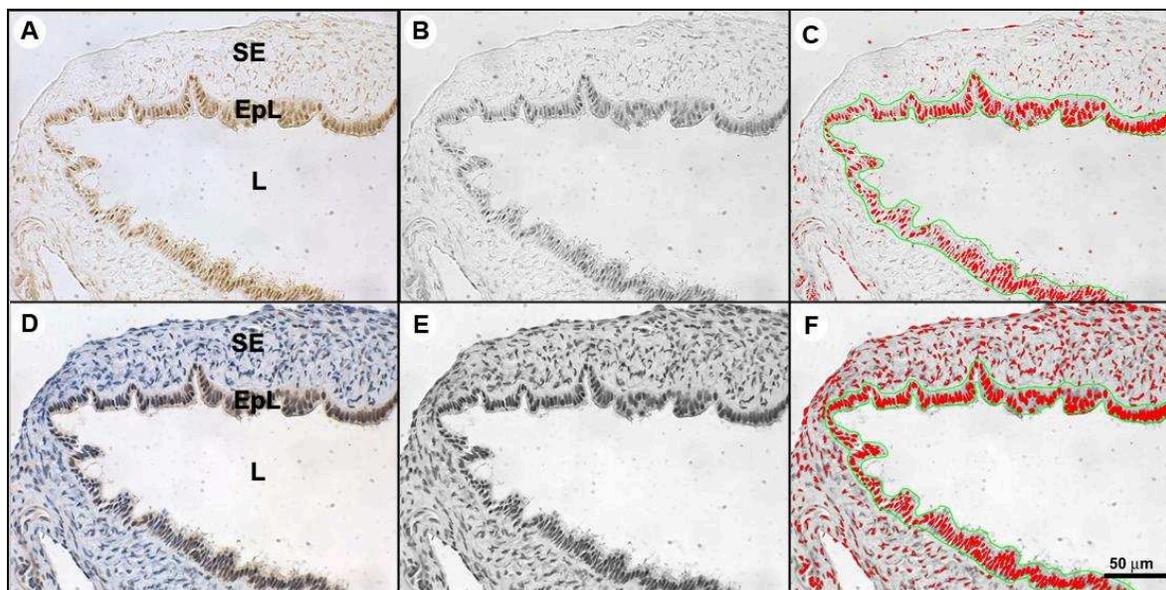
Una vez revelada la reacción IHQ, las muestras fueron deshidratadas, y montadas sin contracolorar. La totalidad del oviducto fue fotografiada por captura y digitalización de imágenes (figura 26A). Luego, las muestras fueron contracoloradas y se capturaron nuevamente las imágenes (figura 26D). Las imágenes digitalizadas obtenidas fueron convertidas a escala de grises (figuras 26B y 26E) y el área epitelial en análisis fue delimitada manualmente. En el caso de la evaluación de la expresión de ER $\alpha$  y PR en el epitelio oviductal, se delineó el borde luminal y borde basal estudiándose el área comprendida entre estos dos trazos (figura 26C). Para el caso de la evaluación de ER $\alpha$  en el espacio subepitelial, el área en estudio quedó comprendida entre el borde de la unión del epitelio con la membrana basal y el borde exterior del órgano.

En las muestras sin contracolorar, se determinó en forma automática la intensidad lumínica media (ILM) y el área nuclear positiva (ANP) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . La ILM es un número adimensional que expresa el promedio de intensidad de grises de las zonas marcadas positivamente en la reacción IHQ. En las muestras contracoloradas con hematoxilina de Mayer el análisis se realizó siguiendo los procedimientos antes descriptos y se determinó además el área nuclear total (ANT) expresada en  $\mu\text{m}^2$ . La presencia de receptores hormonales se expresó en densidad óptica integrada (DOI) calculada según la siguiente relación matemática:

$$\text{DOI} = \text{ANP} \times \text{ILM} / \text{ANT}$$

ANP: Área Nuclear Positiva.; ILM: Intensidad Lumínica Media.; ANT: Área Nuclear Total.

Dado que la DOI es un número adimensional, la misma se expresó en unidades arbitrarias. De este modo se tiene en cuenta tanto la proporción relativa de positividad de marcación para cada receptor hormonal así como su intensidad de su expresión.



**Figura 26: Evaluación de expresión de receptores de hormonas esteroides.** El panel muestra un corte histológico inmunomarcado para ER $\alpha$  revelado con DAB. La secuencia fotográfica ilustra los pasos del proceso de evaluación en el compartimento epitelial. A: Imagen obtenida sin contracolorar, se observan la expresión nuclear de ER $\alpha$ . B: Imagen sin contracolorar convertida a escala de grises. C: delimitado del compartimiento epitelial. D: Imagen luego de la contracoloración. E: Imagen contracolorada convertida a escala de grises. F: Delimitación del compartimiento epitelial. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. La utilización del *software* Image Pro Plus permitió determinar Área Nuclear Positiva e Intensidad Lumínica Media (C) y Área Nuclear Total (F) para obtener Densidad Óptica Integrada.

### 5.3.5- Estudio de biomarcadores de la vía de señalización wnt

El estudio de la presencia de los miembros de la vía de señalización wnt WNT-7a, WNT-5a, y  $\beta$ -catenina se realizó por IHQ, según protocolo general detallado en tabla A6 y condiciones particulares de reacción en tabla A7. La evaluación de la expresión de WNT-5a y  $\beta$ -catenina se realizó sobre imágenes digitalizadas según lo detallado en 4.3.2., siendo para cada uno las áreas de referencia el área subepitelial y epitelial respectivamente. La expresión de WNT 7a se determinó por recuento diferencial de células inmunomarcadas respecto del número total de

células del epitelio luminal oviductal. Los resultados se expresaron como % de células epiteliales WNT (+).

## 5.4- RESULTADOS

### 5.4.1.- Animales

Los huevos y crías utilizados en la evaluación de los efectos de la exposición postnatal a xenoestrógenos presentaron características similares al grupo de referencia (tabla 4).

**Tabla 4:** Características de los huevos y variables biométricas al nacimiento de hembras de *Caiman latirostris* utilizadas en experimento de exposición postnatal a xenoestrógenos.

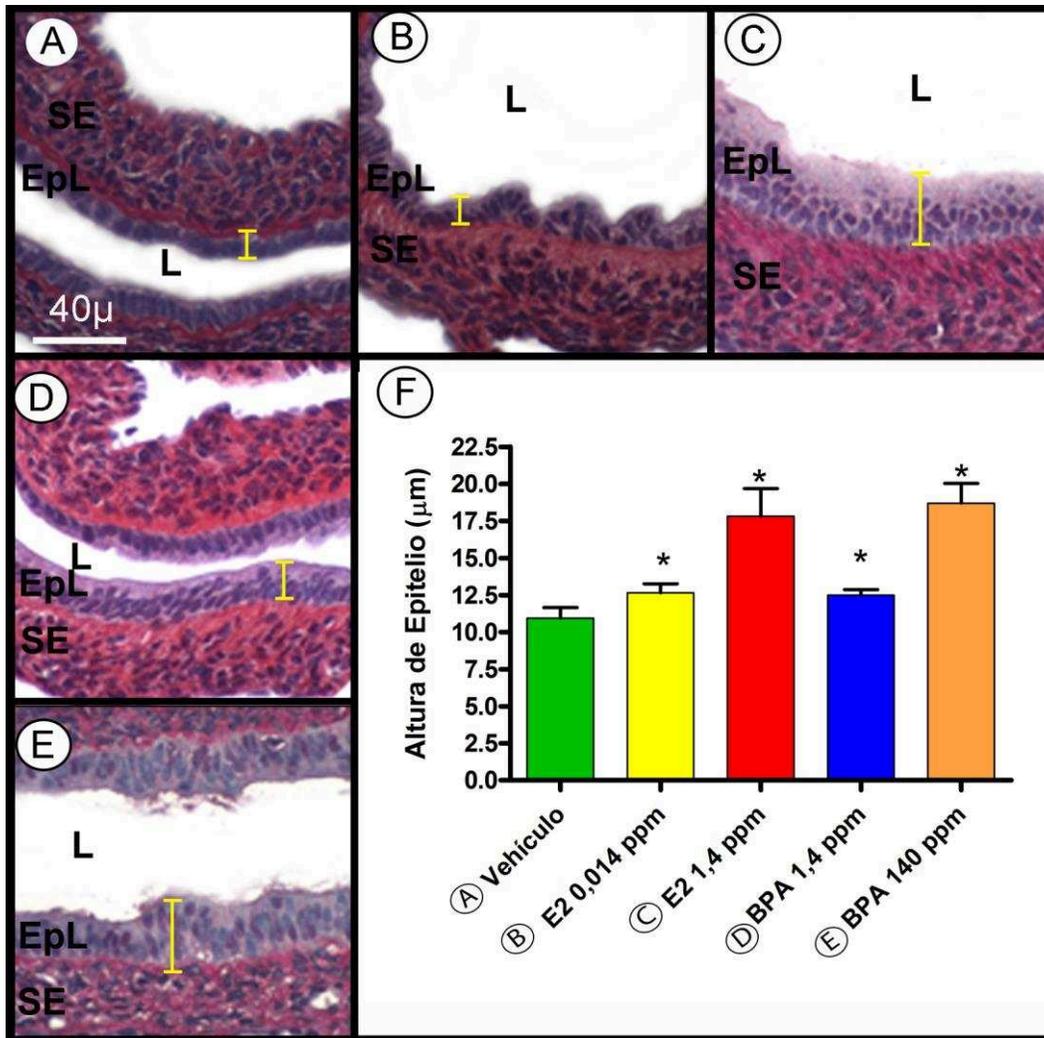
	Variable	Referencia	Experimentales
HUEVOS	Número de huevos	146	76
	Masa (g)	73,01 ± 6,24	76,62 ± 3,18
	Eje mayor (cm)	68,34 ± 3,43	70,10 ± 2,18
	Eje menor (cm)	42,92 ± 1,53	43,29 ± 1,12
NEONATOS	Número de neonatos	146	76
	Masa corporal de neonatos (g)	47,05 ± 4,70	51,43 ± 4,03
	Largo total de neonatos (cm)	22,93 ± 0,81	23,25 ± 1,34
	Distancia hocico – cloaca (cm)	10,90 ± 0,43	10,95 ± 0,95
	Ancho occipital (mm)	16,92 ± 0,71	17,36 ± 0,90

Los rangos están expresados como  $X \pm SD$ . La comparación entre ambos grupos se realizó aplicando test t de student de dos colas con 95% de confianza.

### 5.4.2.- Histoarquitectura e histofuncionalidad oviductal

#### 5.4.2.1.- Altura de epitelio

La altura del epitelio luminal del oviducto de aves y reptiles, incluidas hembras maduras de *A. mississippiensis*, es sensible a las variaciones de los niveles de hormonas esteroides endógenas y consiguientemente a PEs. La exposición postnatal a xenoestrógenos produjo un incremento en esta variable en todos los grupos experimentales (figura 27).

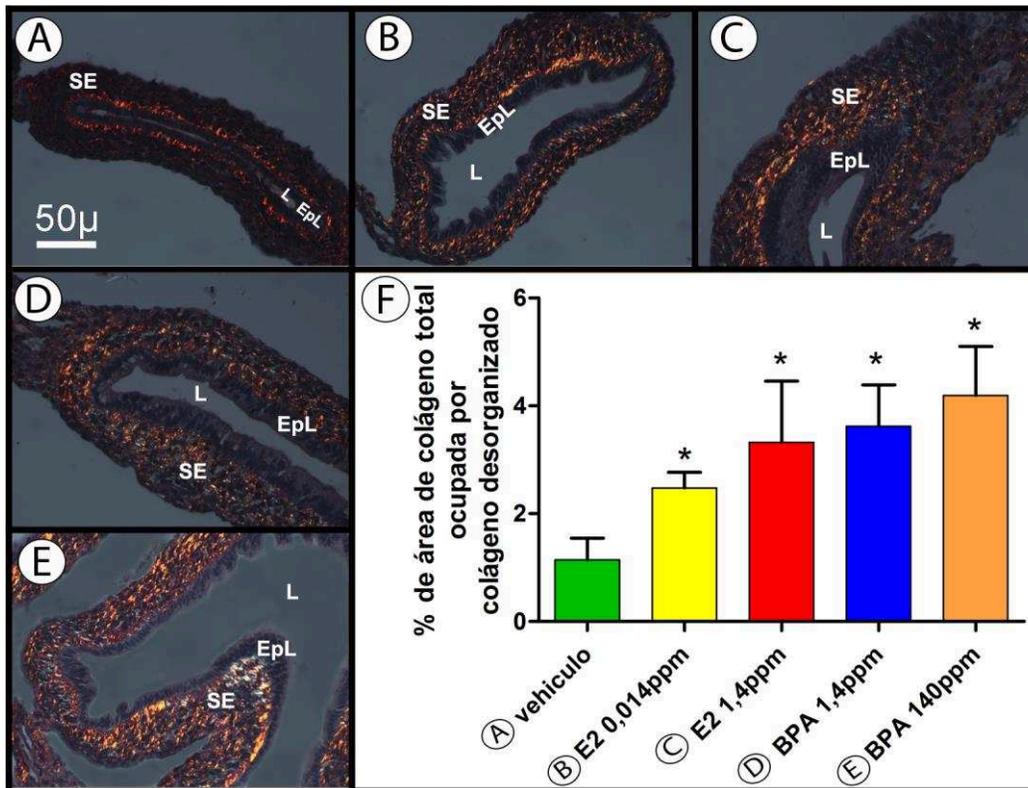


**Figura 27: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la altura del epitelio luminal oviductal.** A-E: Cortes de tubo uterino teñidos con Picrosirius-hematoxilina de Harris. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L; Lúmen; SE; Subepitelio. Las barras amarillas indican la altura del epitelio en un punto dado. F: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$ SEM. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas respecto del grupo control (vehículo). Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza.

En oviductos expuestos a las dosis más bajas de E2 y BPA, el aumento de la altura epitelial corresponde más a un incremento del tamaño de las células debido a una mayor actividad secretora o pseudoestratificación que a procesos de estratificación. En oviductos expuestos a dosis altas de E2 o BPA, se observa más frecuentemente una aparente estratificación (figura 27C y E)

#### 5.4.2.2.- Organización del colágeno subepitelial.

La correcta diferenciación del oviducto inmaduro en un órgano funcionalmente activo depende de la fluida comunicación entre el compartimiento epitelial y el estroma subepitelial. Dentro de los elementos del estroma que intervienen en esta comunicación se encuentran las fibras de colágeno.



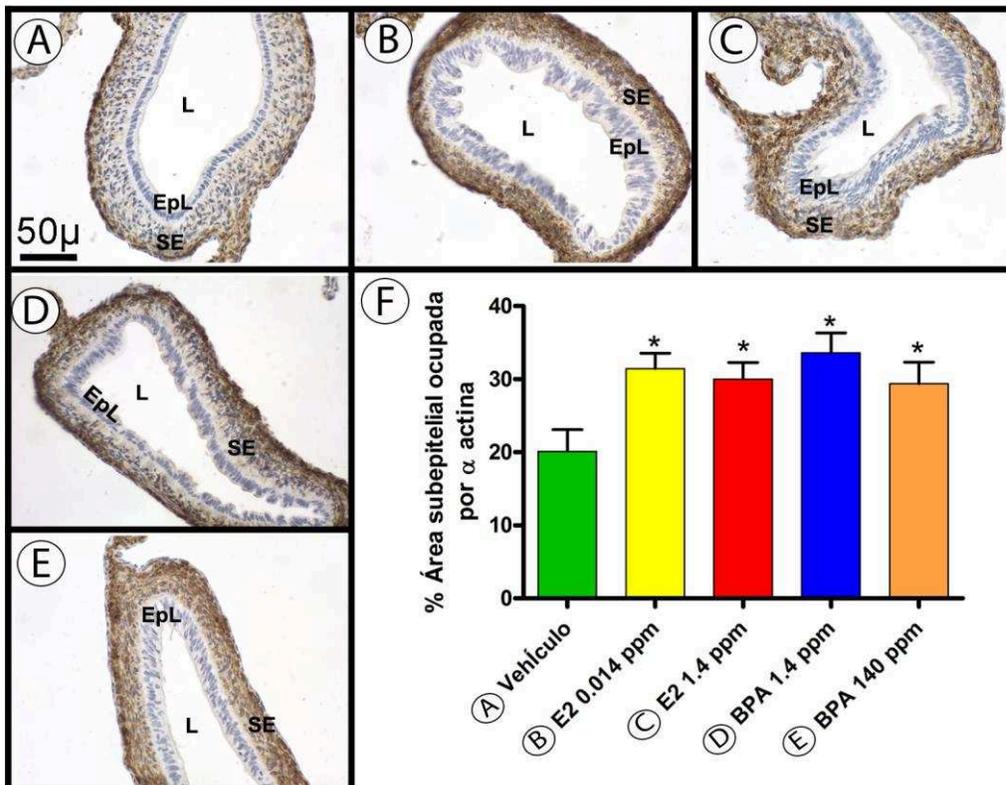
**Figura 28: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la organización del colágeno subepitelial oviductal.** A-E: Cortes de tubo uterino coloreados utilizando el método picrosirius-polarización. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

La exposición postnatal a xenoestrógenos resultó en un aumento en el grado de desorganización del colágeno subepitelial. Las formas de colágeno pobremente organizado, de característica birrefringencia verde, se ubican en la zona subepitelial adyacente al epitelio luminal (figura 28).

#### 5.4.2.3.- Expresión de proteínas asociadas al tejido muscular

#### 5.4.2.3.1.- Expresión subepitelial de $\alpha$ -actina.

La compartimentalización del estroma subepitelial, característica de la diferenciación organogénica, también está relacionada con la diferenciación y organización de la capa muscular. Este proceso es importante dado que la capa muscular es la responsable de retener los huevos fecundados y posteriormente garantizar su pasaje hacia la cloaca y de ésta hacia el exterior durante la ovipostura.

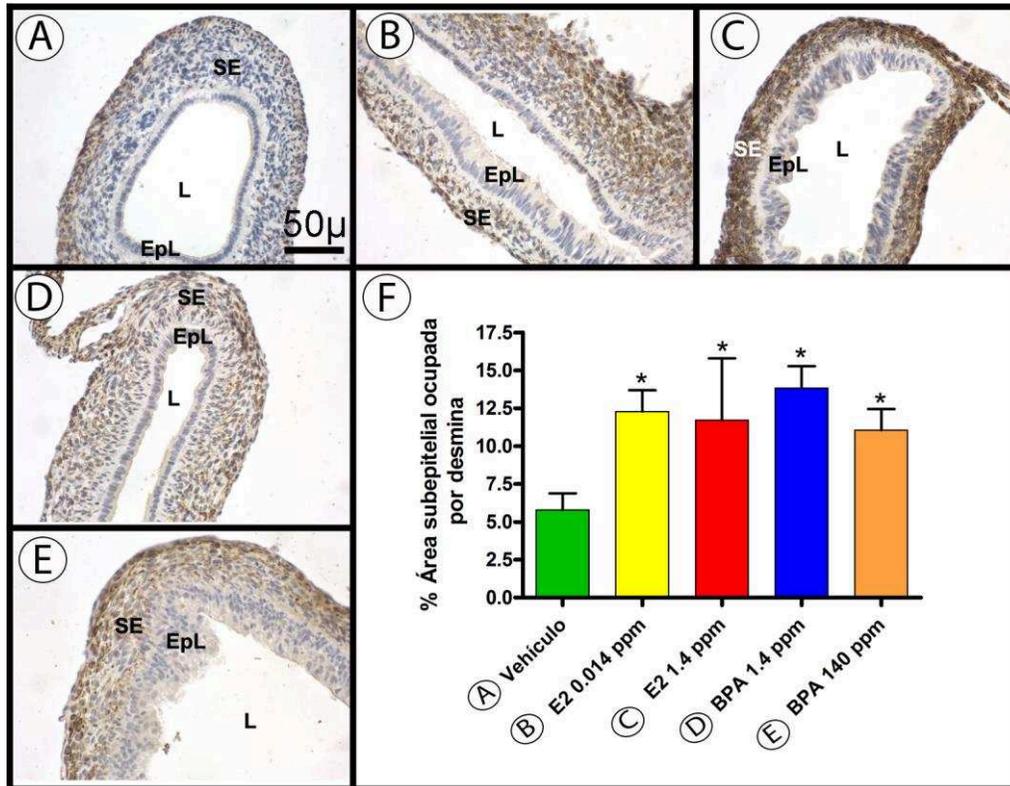


**Figura 29: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de  $\alpha$ -actina en oviducto de *Caiman latirostris*.** A-E: Inmunohistoquímica (IHQ) para  $\alpha$ -actina con contracoloración de hematoxilina de Mayer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de ANOVA seguido de post test t de Student; 95% de confianza.

La exposición postnatal a xenoestrógenos produjo un aumento en el área subepitelial ocupada por células que expresan  $\alpha$ -actina en todos los grupos experimentales (figura 29).

#### 5.4.2.3.2.- Expresión subepitelial de desmina.

Para llevar a cabo su función, la capa muscular debe estar correctamente organizada. La desmina es una proteína asociada al tejido muscular que, aunque no participa activamente de la contracción, contribuye a la estabilidad del sarcómero y a la organización del músculo.

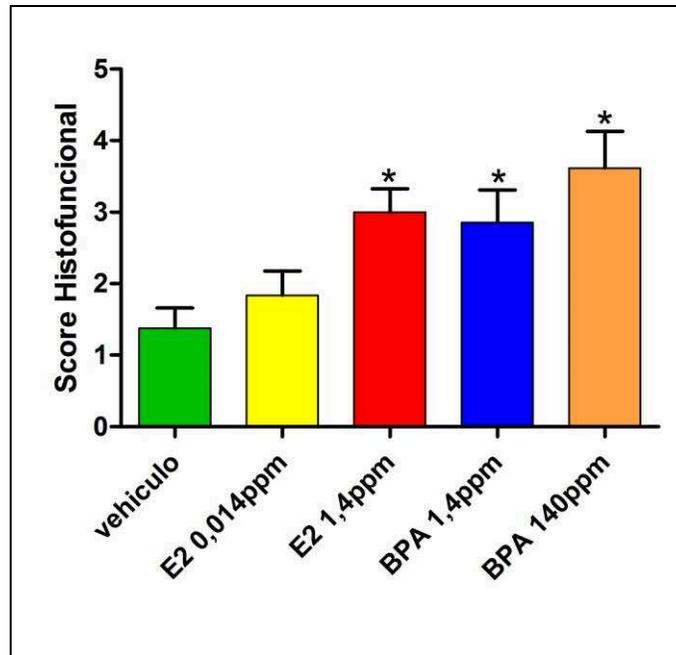


**Figura 30: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de desmina en oviducto de *Caiman latirostris*.** A-E: IHQ para desmina con contracoloración de hematoxilina de Mayer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de ANOVA seguido de post test t de Student; 95% de confianza.

La exposición postnatal a tanto E2 como BPA produjo un aumento de la expresión de desmina, evaluada como porcentaje del área subepitelial ocupada por inmunomarcación positiva para esta proteína (figura 30).

#### 5.4.2.4.- Histofuncionalidad de la mucosa oviductal

Los cambios a nivel de la histoarquitectura e histofuncionalidad que ocurren durante los procesos de diferenciación postnatal del oviducto de yacaré overo han sido previamente descritos y evaluados a través de un sistema de *score* histofuncional. Para determinar si la exposición postnatal a xenoestrógenos afecta el patrón espacial o temporal de estos cambios, se evaluaron los oviductos utilizando este sistema de *score*.

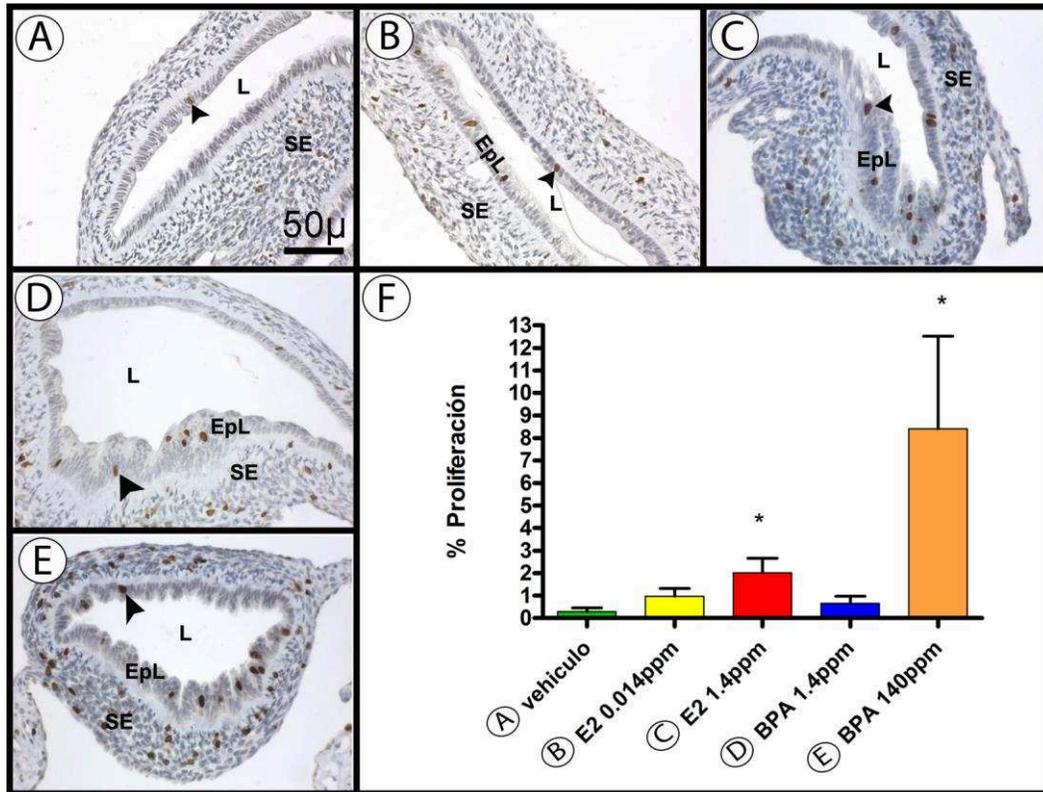


**Figura 31: Cambios histofuncionales en oviducto de *Caiman latirostris* debido a la exposición a xenoestrógenos.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

El tratamiento postnatal con la dosis más alta de E2 y con ambas dosis de BPA produjo un aumento del *score* histomorfológico en yacarés postnatales tempranos (figura 31).

#### 5.4.2.5.- Actividad proliferativa

La unión de ligandos a receptores hormonales produce diferentes efectos. Uno de estos efectos es el cambio en la actividad proliferativa de los tejidos hormonosensibles.



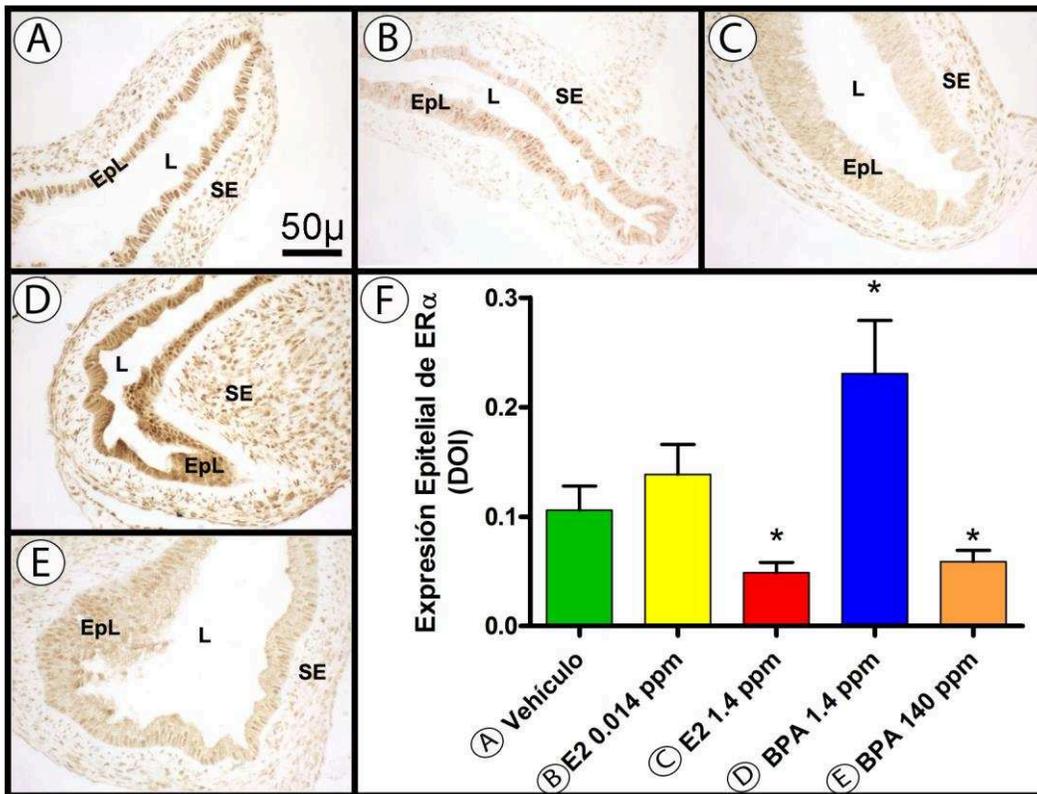
**Figura 32: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la actividad proliferativa del epitelio luminal oviductal.** A-E: IHQ para BrdU con contracoloración de hematoxilina de Meyer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. Las cabezas de flechas indican núcleos con actividad proliferativa. F: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$ SEM. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas respecto del grupo control (vehículo). Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza.

La exposición de crías *C. latirostris* a las dosis más altas de E2 y BPA produjo un incremento de la actividad proliferativa del epitelio luminal. Este efecto no se observó para las dosis más bajas empleadas (figura 32).

#### 5.4.2.6.- Hormonodependencia

##### 5.4.2.6.1.- Expresión epitelial de ER $\alpha$

El oviducto es un órgano hormonosensible y como tal, blanco de acción de hormonas esteroides. Estas hormonas ejercen su acción a través de la unión a sus receptores. Entre las acciones reportadas para los estrógenos se encuentra la modificación en los niveles de sus propios receptores.



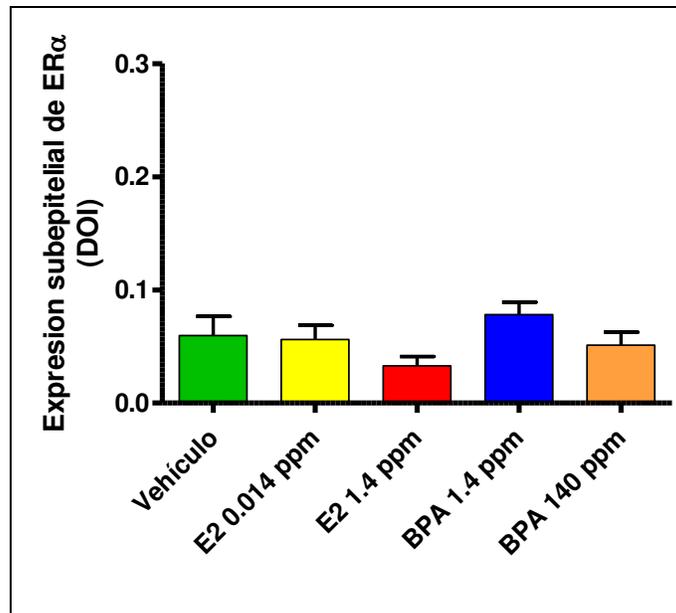
**Figura 33: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de ER $\alpha$  epitelial.** A-E: IHQ para ER $\alpha$ . A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas respecto del grupo control (vehículo). Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza.

La exposición postnatal a xenoestrógenos produjo modificaciones en los niveles de expresión de ER $\alpha$ . Para un mismo compuesto (BPA o E2), estas modificaciones se dieron en sentido contrario según la dosis a la cual se expuso el animal. Las dosis más altas de E2 y BPA produjeron una disminución de los niveles de expresión de ER $\alpha$  epitelial. La dosis baja de BPA, contrariamente produjo un incremento en este marcador (figura 33).

#### 5.4.2.6.2.- Expresión subepitelial de ER $\alpha$

Dado que muchos de los cambios reportados a nivel epitelial como consecuencia de la acción hormonal pueden ser inducidos por cambios en el subepitelio, se evaluó el nivel de expresión de ER $\alpha$  en este compartimiento. La

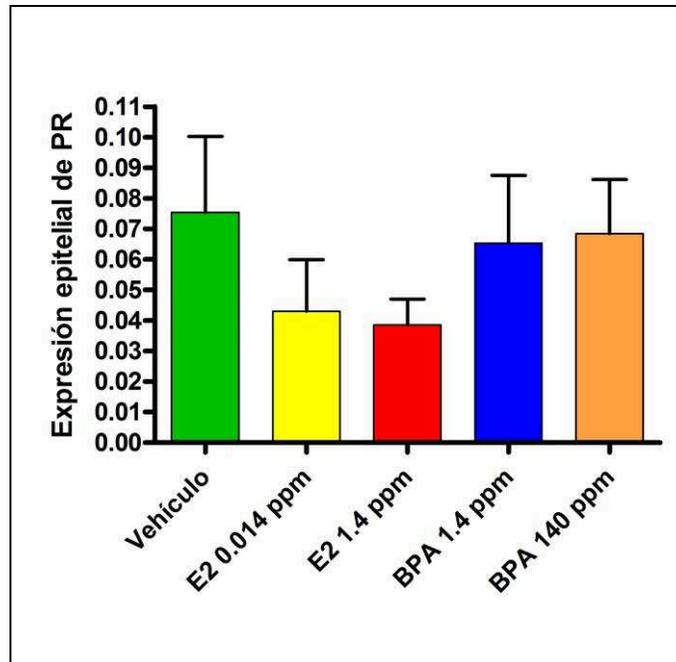
exposición postnatal a xenoestrógenos no modificó los niveles de expresión de ER $\alpha$  en el compartimiento subepitelial (figura 34).



**Figura 34: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de ER $\alpha$  subepitelial.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza

#### 5.4.2.6.3.- Expresión epitelial de PR

La hormonodependencia del oviducto no solo se da a través de receptores de estrógenos funcionales, sino que la acción endocrina puede ser llevada a cabo por otras hormonas dentro de las cuales se encuentra la progesterona (P). El PR es, en muchas especies, una proteína inducida por estrógenos y consiguientemente, por sustancias exógenas con acción estrogénica. La exposición postnatal a xenoestrógenos no produjo cambios en la expresión de PR en el compartimiento epitelial (figura 35).



**Figura 35: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de PR epitelial.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza

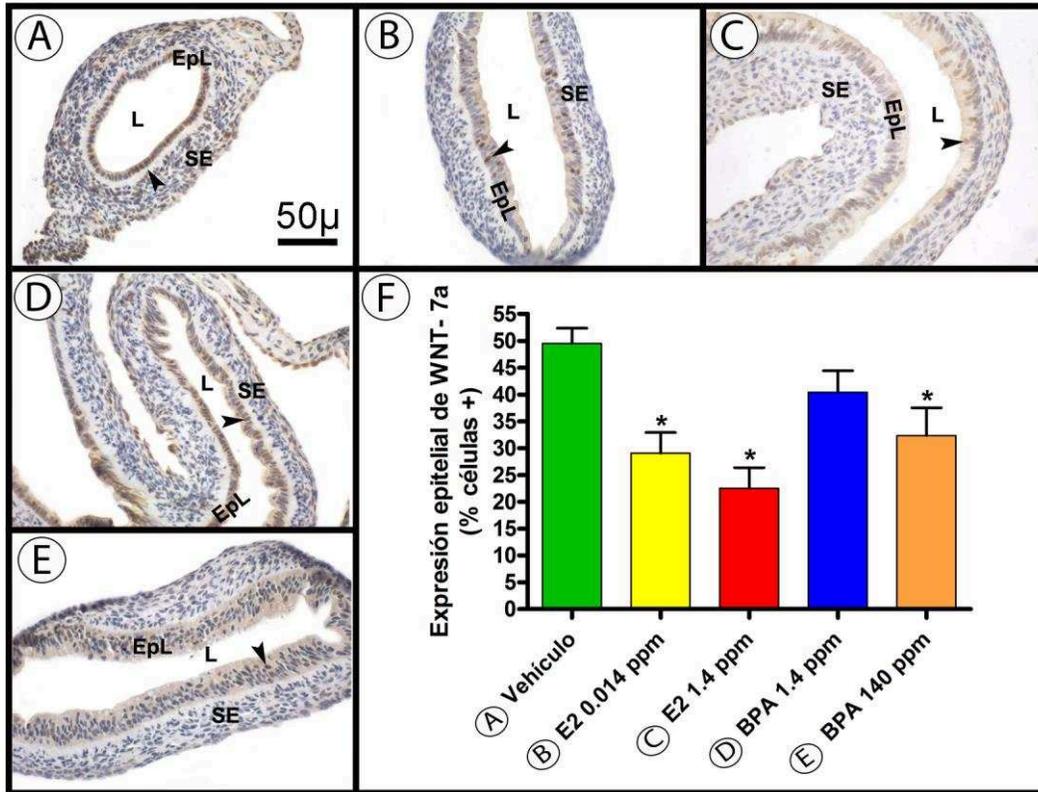
La expresión subepitelial de PR no fue cuantificada debido a la baja inmunomarcación de esta proteína en este compartimento.

#### **5.4.3.- Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre mecanismos de diferenciación morfogénica oviductal de *Caiman latirostris***

El normal funcionamiento del oviducto y, consiguientemente, el éxito reproductivo dependen de la correcta expresión témporo-espacial de moléculas que determinarán la presencia de zonas funcional y morfológicamente diferenciadas. Este patrón de expresión, en todos los vertebrados estudiados, se establece durante el desarrollo y maduración del oviducto. Entre las moléculas involucradas en este proceso se encuentran las glicoproteínas de señalización de la familia wnt. Dada la participación de los miembros WNT-7a y WNT-5a en la maduración postnatal oviductal y puesto que las diferentes vías de señalización wnt (canónica y no canónicas) pueden ser moduladas por estrógenos; se estudió la expresión de estas proteínas WNT como posibles blancos de acción xenoestrogénica.

### 5.4.3.1. Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión de WNT-7a

La exposición postnatal a ambas dosis de E2 produjo una disminución de los niveles de WNT-7a. La exposición a BPA, por su parte, produjo una caída en los niveles de expresión de esta proteína solo en su dosis más alta (figura 36).

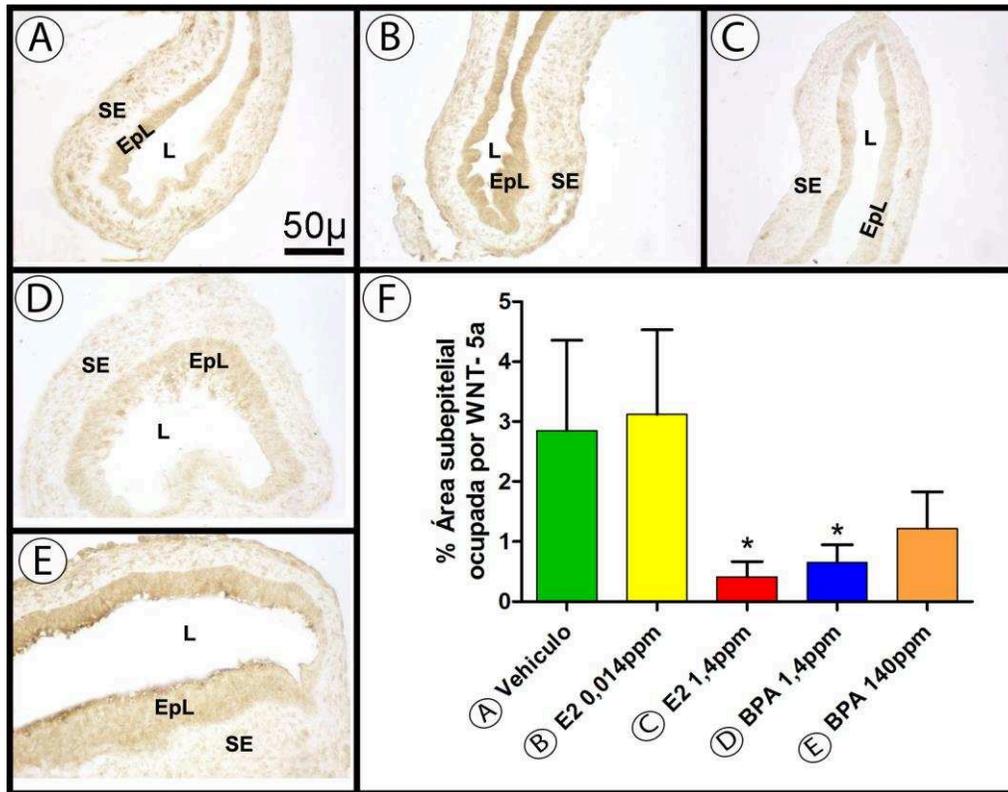


**Figura 36: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión de WNT-7a epitelial.** A-E: IHQ para WNT-7a con contracoloración de hematoxilina de Mayer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. Las cabezas de flechas indican núcleos inmunomarcados para WNT-7a. F: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas respecto del grupo control (vehículo). Test de ANOVA con post test t; 95% de confianza.

### 5.4.3.2. Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión de WNT-5a

La exposición a la dosis más alta de E2 y más baja de BPA produjo una disminución en la expresión subepitelial de WNT-5a. Si bien la exposición a la dosis más alta de BPA no produjo cambios estadísticamente significativos, se

observa una fuerte tendencia hacia la disminución de la expresión de esta glicoproteína (figura 37).

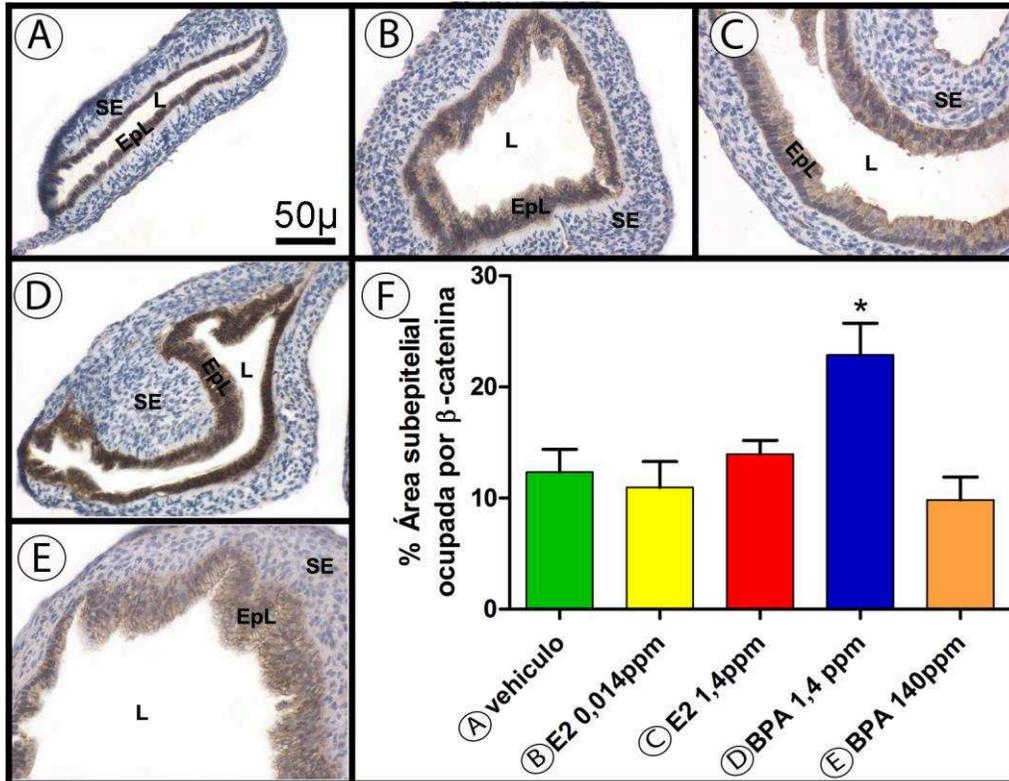


**Figura 37: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión subepitelial de WNT5a en oviducto de *Caiman latirostris*.** A-E: IHQ para WNT-7a con contracoloración de hematoxilina de Mayer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F: Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

#### 5.4.3.3. Efecto de la exposición postnatal sobre la expresión epitelial de $\beta$ -catenina

La expresión epitelial de  $\beta$ -catenina solamente fue modificada como consecuencia de la exposición a la dosis más baja de BPA. En este grupo

experimental se observa un aumento significativo de los niveles de expresión de esta proteína (figura 38).



**Figura 38: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión epitelial de β-catenina.** A-E: IHQ para β-catenina con contracoloración de hematoxilina de Mayer. A: vehículo; B: E2 0,014ppm; C: E2 1,4ppm; D: BPA 1,4ppm; E: BPA 140ppm. EpL: Epitelio luminal; L: Lúmen; SE: Subepitelio. F: Los resultados se expresaron como la media ± SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Mann Whitney; 95% de confianza.

#### 5.4.4.- Resumen de resultados y comparación respecto a la diferenciación morfogénica oviductal normal

Como se ha mencionado en la introducción del capítulo 1, previamente hemos caracterizado el patrón témporo-espacial de cambios histofuncionales y en la histoarquitectura durante la diferenciación morfogénica oviductal de *C. latirostris*

(neonatos a juveniles prepuberales). Para determinar si la exposición a PEs modifica este patrón, se compararon los resultados obtenidos en la presente tesis (estadio postnatal temprano) con los obtenidos en la mencionada caracterización. Los resultados se muestran en la tabla 11.

**Tabla 5:** Resumen de resultados del Capítulo 2.

Parámetro	Cambios respecto al grupo control				Comparación con valores obtenidos en diferentes estadios madurativos (ontogenia). (*)
	E2 0,014ppm	E2 1,4ppm	BPA 1,4ppm	BPA 140 ppm	
Altura de epitelio	↑	↑	↑	↑	Altura del epitelio luminal mayor a las observadas desde neonatos a juveniles.
Organización de colágeno	↑	↑	↑	↑	Característica de estadio postnatal avanzado.
Expresión de α-actina	↑	↑	↑	↑	Característica de estadio postnatal avanzado.
Expresión de desmina	↑	↑	↑	↑	Característica de estadio postnatal avanzado.
Score histomorfológico	-	↑	↑	↑	Intermedio entre postnatal temprano y postnatal avanzado.
Actividad proliferativa	-	↑	-	↑	Similar a lo observado en el estadio neonatal.
Expresión de ERα epitelial	-	↓	↑	↓	Disminución: Niveles similares a juveniles. Aumento: niveles similares a postnatal avanzado
Expresión de ERα subepitelial	-	-	-	-	-
Expresión de PR epitelial	-	-	-	-	-
Expresión de WNT-7a epitelial	↓	↓	-	↓	Niveles similares a neonatos.
Expresión de WNT-5a subepitelial	-	↓	↓	-	Niveles menores a los observados desde neonatos a juveniles.
Expresión de β-catenina	-	-	↑	-	Nivel similar a postnatal avanzado.

(\*) Comparaciones hechas con datos de la caracterización del oviducto de *Caiman latirostris* desde neonatos a juveniles prepuberales, Galoppo, 2015.

---

## 5.5- DISCUSIÓN

Los huevos y crías utilizados en la evaluación de efectos de la exposición postnatal a xenoestrógenos fueron idénticos respecto al grupo considerado de referencia respecto a los parámetros evaluados. Tal como ha sido discutido en el capítulo 1, la posibilidad de que factores relacionados a las exposiciones naturales a PE actúen como factores de confusión en los resultados presentados en este capítulo son bajas.

La altura del epitelio luminal oviductal ha sido utilizada como marcador de efectos estrogénicos y xenoestrogénicos en aves (Yigit y Daglioglu, 2010, Berg y col., 2001), mamíferos (Carpenter y col., 2003) y reptiles, entre ellos los cocodrilidos (Crain y col., 1999; Buhi y col., 1999; Milnes y col., 2005; Doheny y col., 2016). En el caso de los cocodrilidos, la altura de epitelio se ha estudiado en el contexto de exposiciones prenatales. Nuestros resultados muestran que la exposición a xenoestrógenos durante el estadio postnatal temprano produjo un aumento de la altura del epitelio luminal oviductal. Si bien no conocemos antecedentes de experimentos de exposición postnatal a xenoestrógenos en cocodrilidos, nuestros resultados coinciden con los reportados por Doheny y col. (2016), quienes informaron un aumento de la altura epitelial luminal en embriones de *A. mississippiensis* expuestos *in ovo* a niveles de E2 intermedios respecto a los utilizados en esta tesis. Este aumento reportado en *A. mississippiensis* sería transitorio puesto que el mismo tipo de exposición a niveles comparables de E2 no produjo cambios de la altura epitelial oviductal en neonatos. Para producir aumento en la altura epitelial oviductal visible postnatalmente fueron necesarias exposiciones *in ovo* 28 veces mayores a las empleadas por Doheny (Crain y col., 1999). Estudios hechos en nuestro laboratorio en neonatos de *C. latirostris* previamente expuestos *in ovo* a las dosis de E2 utilizadas en *A. mississippiensis* demuestran una sensibilidad similar entre ambas especies de cocodrilidos (Stoker, 2004). Antecedentes en otras especies ovíparas sugieren que los cambios observados en la altura del epitelio luminal oviductal pueden tener importantes implicancias en estadios madurativos más avanzados. La exposición *in ovo* a dosis similares, e incluso menores de etinil estradiol produjeron en codornices, un aumento del epitelio luminal oviductal observable solo cuando los animales

alcanzaron su madurez sexual y no antes (Berg y col., 2001), sugiriendo una acción temprana de los xenoestrógenos que se manifiesta en etapas avanzadas del desarrollo. Dada la similitud filogenética entre el TRF de aves y cocodrílidos (Palmer y Guillette, 1992), este efecto no puede descartarse para *C. latirostris*. En aves y ovinos, aumentos en la altura del epitelio luminal en la edad adulta, resultado de exposiciones durante o previamente a la diferenciación morfogénica, se han relacionado con alteraciones en el patrón temporal de la adenogénesis. En aves, luego de la aparición precoz de glándulas, se observó una disminución del número de las mismas durante la adultez (Berg y col., 2001). En ovinos, el aumento de la altura epitelial se asoció con la ausencia de glándulas (Carpenter y col., 2003). Si bien desconocemos si el aumento de la altura epitelial en *C. latirostris* es un fenómeno transitorio, no puede descartarse un posible efecto futuro similar al observado en aves y ovinos.

La exposición a E2 1,4ppm y BPA 140ppm produjo aumento en la actividad proliferativa del epitelio luminal oviductal. Previamente hemos observado que durante la diferenciación morfogénica oviductal de *C. latirostris*, la actividad proliferativa se encuentra elevada en el estadio neonatal, decrece significativamente durante el estadio postnatal temprano y se mantiene sin cambios hasta el estadio juvenil (Galoppo, 2015). Por otra parte, durante el desarrollo oviductal normal, la altura del epitelio luminal se encuentra elevada en el estadio postnatal temprano. Esto se debe a fenómenos de pseudoestratificación y a una mayor actividad secretora (hipertrofia) y no a hiperplasia celular (Galoppo, 2015). Los presentes resultados muestran que la exposición a E2 0,014ppm y BPA 1,4ppm potencian la hipertrofia del epitelio luminal, mientras que la exposición a E2 1,4ppm y BPA 140ppm produce un incremento en la altura del epitelio luminal debido a la estratificación de las capas celulares del epitelio luminal, acompañado por cierto grado de hiperplasia (aumento de la actividad proliferativa).

En tejidos coloreados con picrosirius-hematoxilina de Harris -y observados con luz polarizada, el aumento de birrefringencia verde puede deberse a procesos de desorganización de colágeno altamente organizado (colágeno tipo I) (Montes, y

Junqueira, 1991). Dado que el oviducto de los animales utilizados en este trabajo (postnatales tempranos) se encuentra en plena etapa de crecimiento y diferenciación (Galoppo, 2015); el aumento de birrefringencia verde indica procesos de desorganización de colágeno asociados a la remodelación de la matriz extracelular (MEC). La remodelación del colágeno se lleva a cabo a través de la acción de un grupo de metaloproteinasas específicas llamadas colagenasas (Page-McCaw y col, 2007), las cuales son sensibles a los niveles estrogénicos. La regulación estrogénica de las metaloproteinasas se llevaría a cabo a través de mecanismos dependientes de factores de crecimientos y citoquinas (Birkedal-Hansen y col., 1993). Se ha demostrado que la transcripción de la colagenasa fibroblástica o metaloproteinasa -1 (MMP-1), capaz de hidrolizar colágeno tipo I, es estimulada por factores derivados del estroma (Birkedal-Hansen y col., 1993). Dado que muchos de los factores derivados del estroma implicados en la regulación de MMP-1 pueden ser inducidos por estrógenos (Arango y Donahoe, 2010) y quizás por xenoestrógenos, la desorganización del colágeno observada podría deberse, por lo menos en parte, al aumento de la actividad de colagenasas inducibles vía factores de crecimiento. En relación al BPA en particular, estudios hechos en células humanas de cáncer pulmonar demostraron que la exposición *in vitro* produce un aumento de la transcripción y traducción de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9. Este aumento se daría a través de una vía independiente de ER $\alpha$  (Zhang y col., 2014). Si bien estas metaloproteinasas actúan fundamentalmente sobre componentes de la membrana basal y no tienen actividad sobre el colágeno tipo I, este mecanismo no puede descartarse para otras metaloproteinasas implicadas en el proceso de desorganización de colágeno. La organización del colágeno subepitelial, consecuentemente, es un parámetro sensible a la acción hormonal y de PEs, los cuales podrían actuar a través del aumento de la actividad colagenasa. Dado que la remodelación de la MEC es un proceso crucial para la migración celular, disponibilidad de factores de crecimiento y creación de microambientes necesarios para la morfogénesis tisular (Lezniak -Wallentin y Hrabia, 2015; Berkholtz y col., 2006), los cambios observados a nivel del colágeno como componente de la MEC podrían afectar la

adenogénesis en el oviducto de *C. latirostris*. Estudios recientes hechos en oviducto de aves de corral muestran un aumento de la expresión de metaloproteinasas MMP-7 y MMP-9 durante la diferenciación del epitelio luminal a glándular; sugiriendo una relación entre la expresión de estas metaloproteinasas y el desarrollo de glándulas (Lézniak-Walentyn y Hrabia, 2015). Si bien Lézniak-Walentyn y Hrabia, (2015) no incluyeron en su análisis metaloproteinasas con actividad sobre colágeno tipo I (MMP-1 y MMP-8), no puede descartarse un aumento en la actividad de otras metaloproteinasas, entre ellas las colagenasas, como parte del proceso de diferenciación glandular. Además el grado de organización del colágeno tendría efectos sobre los eventos de diferenciación organogenética través del factor derivado del estroma factor de crecimiento transformante-beta (TGF $\beta$ ). La MEC a través del colágeno, puede actuar como reservorio de TGF $\beta$  (Silberteín, 2001) y esta función se llevaría a cabo a través de la decorina. La decorina es un proteoglucano que posee sitios de unión al colágeno tipo I y a TGF $\beta$  y participaría de la fibrillogénesis del colágeno (Imai y col., 1997). Durante la colagenólisis, la decorina quedaría expuesta a otras metaloproteinasas como MMP-2 inducida durante procesos de adenogénesis y 7 inducida por acción de BPA, (Lézniak-Walentyn y Hrabia, 2015; Zhang y col., 2014) y como consecuencia podría liberar TGF $\beta$  (Imai y col., 1997). El TGF $\beta$  está relacionado al crecimiento, diferenciación y morfogénesis oviductal (Huang y Huang, 2005; Das y col., 2006) y podría mediar cambios madurativos en el oviducto. En consecuencia, los cambios inducidos por BPA y E2 en la organización del colágeno tendrían importancia en la comunicación estroma-epitelial y los procesos de diferenciación que dependen de esta interacción. Previamente hemos identificado la desorganización del colágeno subepitelial como parte del desarrollo oviductal de *C. latirostris*. Este proceso de desorganización comienza en el estadio postnatal avanzado, junto con la adenogénesis (Galoppo, 2015). Los niveles de desorganización observados en este trabajo como consecuencia de la exposición a BPA y E2 en el estadio postnatal temprano se acercan a los hallados en el estadio postnatal avanzado en animales controles sin tratamiento. En otras palabras, la organización del colágeno muestra un patrón

característico de un estadio madurativo superior indicando un posible adelantamiento en la diferenciación oviductal postnatal. Esto sugiere no solo la modificación de las interacciones epitelio-mesenquimales sino modificaciones en el patrón temporal de cambios que se dan como consecuencia de tales interacciones.

La exposición postnatal a xenoestrógenos produce, a nivel del subepitelio oviductal, un aumento de la superficie subepitelial ocupada por  $\alpha$ -actina. La  $\alpha$ -actina es una proteína miembro de una familia de proteínas relacionada a estructuras contráctiles que en vertebrados se expresa en células musculares (Lodish y col., 2003) y miofibroblastos (Varayoud y col., 2001). La exposición a xenoestrógenos ha producido en ratones, un aumento del grosor de la zona inmunomarcada para  $\alpha$ -actina. Este aumento ha sido descrito como estímulo promiogénico (Ma y Sassoon, 2004). Los resultados del presente trabajo muestran el mismo estímulo promiogénico para *C. latirostris*. Si bien desconocemos si el aumento en la expresión de  $\alpha$ -actina es debido a un aumento de las fibras musculares, de miofibroblastos o ambos; los resultados obtenidos para la expresión de desmina aportan evidencia a favor de un aumento de las fibras musculares. La desmina es otra proteína relacionada al tejido contráctil, tiene un rol esencialmente estructural en la mantención de la integridad muscular (Lodish y col., 2003) y es un indicador de orden y maduración de la capa muscular durante la diferenciación morfogénica del oviducto de *C. latirostris* (Galoppo, 2015). La exposición a E2 y BPA produjo un aumento del área subepitelial ocupada por desmina, sugiriendo un aumento en el orden de la capa muscular paralelo al estímulo promiogénico antes mencionado. Dado que el incremento en la expresión de desmina en *C. latirostris* es característico del estadio postnatal avanzado y no del postnatal temprano (Galoppo, 2015), la exposición a E2 y BPA produciría un adelantamiento en la maduración de la capa muscular oviductal. Los cambios a nivel de la capa muscular, también podrían estar relacionados a la remodelación de colágeno observada en los animales tratados con xenoestrógenos. Ya se ha mencionado que el colágeno puede actuar como reservorio de TGF $\beta$ . El factor de crecimiento transformante-beta se encuentra dentro de los factores que

promueven la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Phan, 2012) y es capaz de inducir la expresión de  $\alpha$ -actina de células mesenquimales humanas en cultivo (Shi y col., 2014). El colágeno altamente organizado, característicamente presente en las adyacencias de la capa muscular concentraría TGF $\beta$  promoviendo esta diferenciación.

La adenogénesis es un evento fundamental de la maduración postnatal que involucra un conjunto de cambios histofuncionales. Previamente hemos cuantificado estos cambios en oviducto de *C. latirostris* en diferentes estadios de maduración utilizando un sistema de *score* histofuncional (Galoppo, 2015). Esta cuantificación nos permitió establecer un valor de corte (puntaje o *score* =6) entre los oviductos con escasos signos de adenogénesis (preadenogénicos) y aquellos que muestran signos de adenogénesis en curso (adenogénicos). La exposición postnatal a xenoestrógenos produjo un aumento del puntaje o *score* histomorfológico en todos los grupos experimentales excepto para E2 0,014ppm. Si bien los cambios histofuncionales evaluados por este sistema no alcanzaron en los animales tratados el valor de corte de 6, el aumento del puntaje (*score*) sugiere una modificación del patrón temporal de los cambios madurativos, posiblemente un adelantamiento de los mismos. Dentro de los numerosos factores implicados en el proceso de adenogénesis se encuentran los factores de crecimiento derivados del estroma y las características de la MEC adyacente al epitelio glandular en desarrollo (Gray y col, 2001). La remodelación de colágeno en el subepitelio adyacente al epitelio luminal, podría ser un factor capaz de mediar el adelantamiento de la maduración oviductal antes descrito. Estudios hechos en morfogénesis del sistema respiratorio murino originalmente asociaron la presencia de colágeno I (altamente organizado) con una inhibición directa del proceso de invaginación epitelial o *budding* (Wessels, 1970). Más recientemente se postuló que esta inhibición se lleva a cabo en forma indirecta debido a la capacidad que tiene el colágeno I de regular de disponibilidad de TGF $\beta$ . En la morfogénesis mamaria de ratones, en las zonas donde se encuentra activo el proceso de *budding*, se observa una marcada pérdida localizada de TGF $\beta$ , indicando que la MEC periductal actúa como reservorio de este factor responsable de inhibir la

formación de *budding* (Silberstein y col., 1992). La presencia de colágeno altamente organizado adyacente al epitelio luminal inhibiría el *budding* por concentración de TGF $\beta$  y la remodelación del colágeno tendría el efecto contrario.

Los estrógenos juegan un rol muy importante en el crecimiento y desarrollo del TRF de los vertebrados actuando a través de sus receptores. En vertebrados mamíferos, durante el estadio prepuberal, los niveles de estrógenos gonadales endógenos son bajos y los procesos de diferenciación morfogénica se consideran esencialmente estrógeno-independientes (Gray y col., 2001). Sin embargo, se ha reconocido que la presencia de ER $\alpha$  en el período prepuberal tiene una gran importancia, dado que su activación temprana puede traer cambios activacionales. Estos cambios característicamente se manifiestan en estadios más avanzados del desarrollo (Varayoud y col., 2008b; Bosquiazzo y col., 2010, 2013; Vigezzi y col., 2015). En *C. latirostris* la exposición postnatal temprana a E2 1,4ppm y BPA 140ppm induce una disminución significativa de la expresión de la proteína de ER $\alpha$  mientras que la exposición a BPA 1,4ppm tuvo el efecto contrario. En cocodrilidos, Moore y col (2010) reportaron en *A. mississippiensis* que los niveles de expresión de mRNA oviductal de ER $\alpha$  y PR de animales prepúberes nacidos de huevos provenientes de un sitio contaminado con xenoestrógenos, no mostraron diferencias respecto de crías nacidas de huevos recolectados en un sitio de referencia. Esta falta de respuesta puede deberse a las complejas interacciones entre la mezcla de contaminantes que se dan en exposiciones naturales; o bien a diferente sensibilidad del marcador en función del estadio de desarrollo en el que ocurre la exposición. En ovinos, la exposición neonatal diaria a estrógenos produjo una disminución de los niveles de tanto mRNA como del propio ER $\alpha$  (Carpenter y col, 2003) mostrando el mismo efecto que el observado en *C. latirostris* ante la exposición a E2 1,4 ppm y BPA 140 ppm. En yacaré overo se obtuvo con dos exposiciones, el mismo efecto observado ante exposiciones diarias en ovinos. El aumento de los niveles de expresión de ER $\alpha$  como consecuencia a la exposición a BPA 1,4 ppm puede explicarse en parte debido a que los PEs, al igual que las hormonas, se caracterizan por presentar curvas dosis-respuestas no lineales. Más aún, los PEs pueden producir curvas dosis-

respuesta no monotónicas en las cuales la pendiente de la curva cambia de signo a través del curso dosis-respuesta (Bergman y col., 2012). El BPA es considerado un estrógeno débil (National Toxicology Program., 2008) del cual hay más de 50 reportes acerca de comportamiento no monotónico en una gran variedad de tejidos (Bergman y col., 2012). El BPA, consecuentemente, estimularía a dosis bajas y ambientalmente relevantes la expresión de ER $\alpha$  mientras que a dosis altas tendría el efecto contrario. En conclusión, este marcador muestra ser sensible a ambas concentraciones de BPA independientemente del sentido de cambio del mismo. El aumento de expresión de ER $\alpha$  observado ante la exposición de BPA 1,4 ppm es comparable con los niveles de expresión oviductal en animales intactos en el estadio postnatal avanzado (Galoppo, 2015). Esto aporta evidencias a favor de un adelantamiento de los procesos de diferenciación ya observados en procesos de organización de colágeno, expresión de desmina y  $\alpha$ -actina y *score* histofuncional. Además, este aumento en los niveles de ER $\alpha$  indicaría un estado de alta sensibilidad ante mínimos aumentos de estrógenos circulantes. Si bien desconocemos si estos cambios son transitorios, este estado de alta sensibilidad expondría al oviducto a una respuesta exagerada ante la acción de estrógenos endógenos en la pubertad o, más importante, ante la exposición a xenoestrógenos.

El PR es una proteína inducida por estrógenos (Boyd-Leinen y col., 1984; Hora y col., 1986; Schultz y col., 2003) y posiblemente por xenoestrógenos. Sin embargo, no se han observado cambios en los niveles de expresión de PR oviductal. Probablemente, en animales prepúberes se necesiten dosis de estrógenos mayores a las empleadas en este trabajo para inducir en forma directa la expresión y mantener en el tiempo niveles tisulares altos de PR.

Como se mencionó en la introducción del capítulo 1, tanto WNT-7a como WNT-5a han demostrado ser sensibles a los niveles de hormonas esteroides circulantes (Miller y col., 1998b) y consiguientemente ser probables blanco de acción de PEs. La exposición experimental a los xenoestrógenos dietilestilbestrol (DES) y a la mezcla comercial de PCBs, Aroclor produjeron disminución de los niveles de WNT-7a en el TRF de ratones neonatales (Miller y col., 1998a; Carta y

Sasoon, 2004; Ma y Sasoon, 2006). Estos hallazgos coinciden con lo observado en la expresión epitelial de WNT-7a en el oviducto de *C. latirostris*, para todos los grupos de exposición, excepto BPA 1,4 ppm. Hasta el presente, no tenemos conocimiento de informes acerca de efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre los niveles de WNT-5a. Nuestros resultados indican que la exposición a E2 1,4 ppm y BPA 1,4 ppm produjeron una disminución en los niveles de expresión de WNT-5a subepitelial. Si bien puede especularse que la intensa disminución de WNT-7a en el grupo expuesto a E2 1,4 ppm es responsable de la disminución de WNT-5a a través del mecanismo regulatorio propuesto por Mericskay y col, (2004), esto no explica la falta de respuesta en los niveles de WNT-5a por parte de los grupos E2 0,014ppm y BPA 140 ppm ante la disminución de WNT-7a, así como tampoco la fuerte caída de expresión de WNT-5a ante la falta de efecto sobre WNT-7a en el grupo BPA 1,4 ppm. Independientemente del mecanismo a través de los cuales estos cambios se dan, los mismos podrían tener profundas implicancias sobre el desarrollo oviductal de *C. latirostris*. Conceptos revisados por Sasoon (1999) acerca del efecto de la perturbación endocrina sobre los genes wnt indican que dado que la señalización epitelio-mesenquimal en el TRF está coordinada por la familia de genes wnt, la perturbación de esta vía de señalización conduciría a cambios irreversibles (Sasoon, 1999). Posiblemente, la ausencia (o disminución) de WNT-7a durante períodos críticos del desarrollo conduciría a una “reprogramación” del TRF de modo tal que estímulos estrogénicos posteriores pueden fracasar en ejecutar la respuesta celular adecuada (Ma y Sasoon, 2006).

En nuestros animales, la exposición a xenoestrógenos no produjo cambios en los niveles de  $\beta$ -catenina, excepto para la dosis de BPA 140ppm. Trabajos hechos en diferenciación postnatal de TRF murino indican que WNT-5a ni WNT-7a están relacionados a la vía canónica de señalización wnt (Mericskay y col., 2004). Más aún, WNT-5a ha sido implicado en la vía de señalización wnt no canónica calcio-dependiente (vía wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ) que antagoniza la vía canónica (Miller y col., 1999). Si bien los niveles de  $\beta$ -catenina aumentan ante la exposición de dosis bajas de BPA, este aumento se debe a la  $\beta$ -catenina de membrana, probablemente asociada al complejo cadherina.

La regulación en baja de WNT-7a por parte de xenoestrógenos en el oviducto de postnatales tempranos de *C. latirostris* ha emulado el fenotipo observado en el TRF de ratones mutantes para este gen. Este fenotipo tiene, entre otras características, la estratificación epitelial (Miller y Sasoon, 1998). Como se ha señalado antes, la exposición a xenoestrógenos produjo un aumento de la altura del epitelio luminal debido a hipertrofia (E2 0,014ppm y BPA 1,4ppm) y a hiperplasia y estratificación epitelial (E2 1,4ppm y BPA 140ppm). Este cambio en las características del epitelio luminal pueden acarrear alteraciones en la formación de glándulas ya que se ha descrito que fenómenos de hipertrofia del epitelio luminal pueden inhibir el proceso de invaginación o *budding*, primer paso de la adenogénesis (Gray y col., 2001). Este cambio de fenotipo del epitelio luminal asociado a la disminución de los niveles de WNT-7a es similar al fenómeno de posteriorización descrito en ratones (Miller y Sasoon, 1998; Jefferson y col., 2011) como consecuencia de la alteración del eje antero-posterior oviductal. En este proceso, regiones del TRF que por su ubicación anatómica, deberían tener características histológicas de útero, muestran características de vagina. (Arango y Donahoe, 2010). La posteriorización se ha observado en ratones mutantes para WNT-7a (Miller y Sasoon, 1998) y neonatos expuestos al fitoestrógeno genisteína (Jefferson y col, 2011) y PCBs (Ma y Sasoon, 2006). Los cambios en la altura epitelial y la presencia de estratificación del epitelio luminal observados como efectos de la exposición a E2 1,4ppm y BPA 140ppm no se deberían a este fenómeno de posteriorización dado que ni el útero ni la vagina de especies cercanas a *C. latirostris* muestran estratificación (Girling 2002; Gist, 2011). Sin embargo, los cambios en la expresión de  $\alpha$ -actina y desmina discutidos anteriormente podrían indicar un posible indicio de posteriorización en nuestro modelo. Si bien no hemos caracterizado las porciones oviductales más caudales de *C. latirostris*, el engrosamiento de la capa muscular es una variante céfalo-caudal descrita como común en el TRF de reptiles (Girling, 2002; Gist, 2011). Consiguientemente, el estímulo promiogénico observado puede deberse a la adquisición de características fenotípicas de útero más que de tubo uterino.

A los efectos discutidos hasta aquí, debe agregarse el aumento de  $\beta$ -catenina que se observa en los oviductos expuestos a la dosis más baja de BPA. La  $\beta$ -catenina tiene la función de actuar como proteína de unión entre la cadherina, anclada en la membrana plasmática, y el citoesqueleto de actina (Wheelock, y Johnson, 2003). Además el anclaje de  $\beta$ -catenina al complejo cadherina aumenta la fuerza de adhesión célula-célula llevado a cabo por la porción extracelular de la cadherina (Lodish y col., 2003). La exposición a BPA, consiguientemente, afectaría la fuerza de las uniones intercelulares y las interacciones célula-célula. Respecto a la fuerza de adhesión intercelular, el aumento de  $\beta$ -catenina podría interferir los procesos de cambio de forma y migración necesarios en la morfogénesis. Respecto a las interacciones célula-célula, Gray y col, (2001) señalan la importancia de los contactos célula-célula / célula-MEC en los procesos de diferenciación morfogénica, con lo cual, esta modificación en los animales tratados con BPA podría afectar, a través de señales célula-célula el proceso de diferenciación postnatal.

Los efectos observados debido a la exposición a xenoestrógenos durante el estadio postnatal temprano de *C. latirostris* sugieren una alteración del patrón temporal de cambios que caracterizan la diferenciación morfogénica del oviducto en esta especie. Esta modificación sería consecuencia de distintos factores que convergen, tales como cambios en la altura del epitelio luminal, cambios en la expresión epitelial de ER $\alpha$ , modificación en la expresión de moléculas de la vía de señalización wnt y desorganización del colágeno subepitelial. Experimentos revisados por Cadigan y Nusse (1997) en relación a la vía de señalización wnt remarcan la importancia de la expresión de la molécula correcta en el tiempo y sitio exactos para un adecuado desarrollo. La alteración de este patrón de expresión de cualquiera de los múltiples componentes que regulan los procesos de diferenciación morfogénica podría traer consecuencias desfavorables. Estas consecuencias han sido demostradas en otras especies. Ratones expuestos neonatalmente a PCBs en los cuales se observó un inicial estímulo de la adenogénesis, en la adultez mostraron una drástica disminución de glándulas (Ma y Sason, 2006). De forma similar, en codornices, la exposición *in ovo* a EE2

produjo, luego de la aparición precoz de glándulas en animales sexualmente inmaduros, una disminución de la densidad glandular en adultos (Berg y col., 2001). La exposición neonatal de ovinos a valerato de estradiol produjo, junto con hipertrofia del epitelio luminal del TRF, la carencia absoluta de glándulas durante la madurez sexual (Carpenter y col., 2003).

La exposición a PE durante estos períodos críticos de desarrollo de *C. latirostris*, consecuentemente podría causar cambios organizacionales que afectarían el normal desarrollo y podría tener efectos visibles en etapas muy posteriores a la exposición. Anteriormente ya hemos observado la sensibilidad de otra región del oviducto de *C. latirostris* ante la exposición natural a pesticidas organoclorados y PCBs debido a cambios en la porosidad de las cáscaras del huevo (Stoker y col, 2008). Los resultados de este trabajo indican que otras regiones oviductales pueden afectarse y afectar la salud reproductiva del yacaré overo.

---

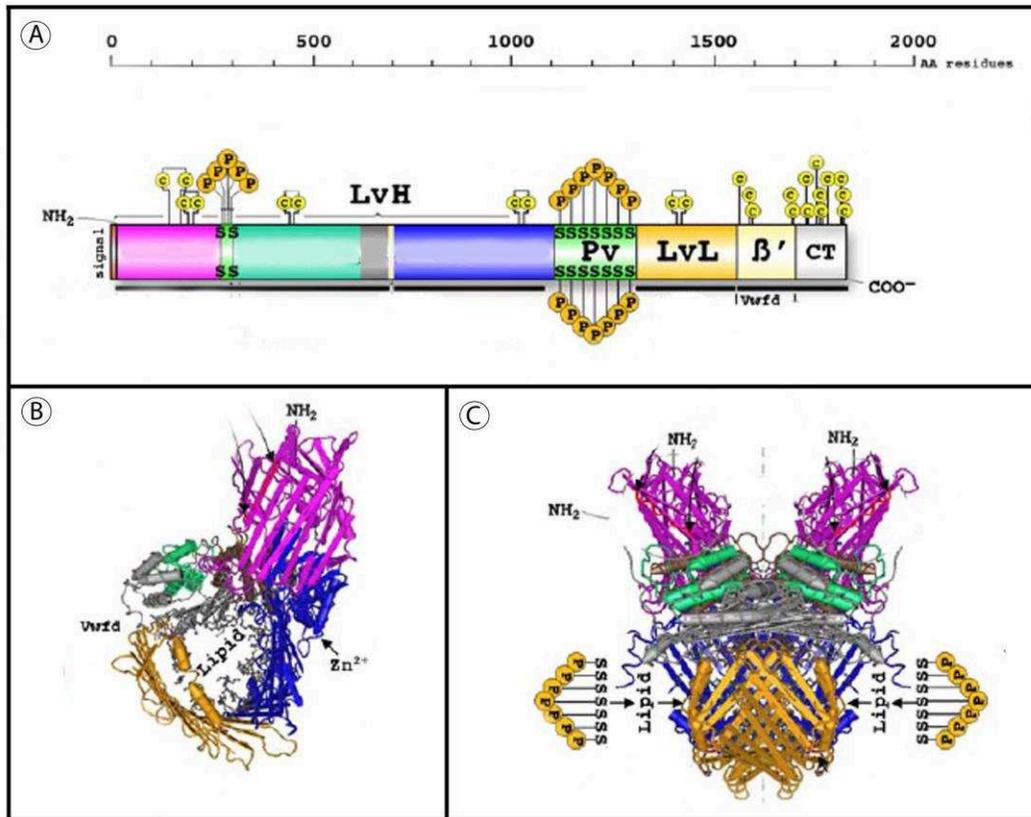
## VI.- CAPITULO 3

Efecto de la exposición postnatal temprana a xenoestrógenos sobre la vitelogénesis.

## 6.1- INTRODUCCIÓN

### 6.1.1.- Estructura y función de la vitelogenina

La vitelogenina (VTG) es considerada un miembro de la llamada superfamilia de grandes proteínas de transferencia de lípidos (Smolenaars y col., 2007) y precursora de las principales proteínas de la yema de huevo en vertebrados. La síntesis de VTG se lleva a cabo en el hígado y en condiciones fisiológicas, es exclusiva de las hembras. En vertebrados, la VTG está compuesta por un péptido señal, una cadena pesada de lipovitelina (LvH), una fosvitina (Pv), una cadena liviana de lipovitelina (LvL) y un dominio factor de von Willebrand tipo D. En el hepatocito, luego del clivado del péptido señal, la VTG se organiza linealmente en un monómero que sigue la secuencia NH<sub>2</sub>-(LvH-Pv-LvL-vWfd)-COO (figura 39). La VTG es glicosilada y fosforilada postraduccionalmente en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi y luego secretada al plasma circulante como complejo homodimérico (Finn, 2007). En *C. latirostris*, existen dos tipos de VTGs probablemente resultado de la traducción de dos genes distintos. Estas proteínas son diméricas y tienen un peso molecular de 205 y 225 KDa respectivamente (valores obtenidos por PAGE-SDS). Ambos tipos son inducibles por tratamiento subcutáneo con E2 (Rey, 2007).



**Figura 39: Estructura de la vitelogenina.** A: Esquema de los distintos dominios estructurales de la VTG. B: Estructura del monómero de VTG. C: Dímero circulante de VTG. Modificada de Finn, 2007.

Los dominios Lv, principalmente LvH, se organizan estructuralmente formando un centro hidrofóbico responsable de la carga y transporte de lípidos. La Fv estabiliza la unión del centro hidrofóbico con el resto de la molécula y debido a su capacidad de fosforilarse, forma la cubierta hidrofílica que permite el transporte plasmático de la VTG (Finn, 2007). La VTG, además puede unir calcio (Jones, 2011) Los dominios poliserina de la fracción Fv potenciarían la deposición de calcio que contribuiría a la formación ósea del futuro embrión (Smolenaars y col., 2007). La región vWfd, además de estabilizar el dímero de VTG y contribuir con su hidrosolubilidad, tendría una función muy importante en proporcionar un punto de anclaje que facilitaría la unión de VTG a su receptor (Finn, 2007).

La VTG provee al embrión en desarrollo de aminoácidos, lípidos, fosfatos e iones metálicos multivalentes. Sin embargo, su contenido lipídico de 12-15% no es suficiente para suplir las necesidades de los embriones amniotas. En amniotas

ovíparos, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), también sintetizada en el hígado materno, provee una fuente adicional de lípidos a la yema, mientras que una variedad de otras proteínas son también incorporadas a la yema, albúmina sérica, proteínas fijadoras de vitaminas tales como colecalciferol e inmunoglobulinas (Jones, 2011).

### **6.1.2. Vitelogénesis**

La vitelogénesis se define como el proceso de síntesis hepática de VTG y su transporte hacia los oocitos. Este proceso se inicia con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en las temporadas reproductivas, e involucraría a una serie de hormonas y mediadores, de los cuales los estrógenos endógenos son los principales. Sin embargo, se asume que el control hormonal de la vitelogénesis es complejo e involucraría además de los estrógenos a la P, testosterona e incluso a la leptina, una hormona sintetizada principalmente por los adipocitos, la cual actúa como señal metabólica sobre el sistema reproductivo en mamíferos (Jones, 2011).

Luego de su liberación al torrente sanguíneo, la VTG es transportada hacia los ovarios, donde es captada por receptores de VTG (rVTG). Los rVTG se encuentran anclados a la membrana plasmática del oocito y tras su unión a la VTG, el complejo VTG-rVTG se internaliza en un proceso de endocitosis mediado por clatrina (Finn, 2007). Aparentemente, junto con VTG se incorporan otras lipoproteínas, VLDL entre ellas que proporcionarán lípidos adicionales al futuro embrión (Jones, 2011). Dentro de los endosomas, la VTG es clivada en sus componentes, lipovitelinas y fosvitina por acción de catepsina D (Finn, 2007).

### **6.1.3.- Control hormonal de la vitelogénesis**

Aunque la vitelogénesis se encuentra bajo control multihormonal, el principal estímulo inductor es la presencia de estrógenos circulantes, producidos por el ovario en los folículos en maduración. Por esta razón, aunque el gen que codifica para la VTG está presente también en machos, la producción de VTG está normalmente restringida a las hembras. Consecuentemente, aunque existen

excepciones, en Escamosos, tortugas y cocodrílidos la vitelogénesis está típicamente asociada a concentraciones plasmáticas de estradiol elevadas (Jones, 2011).

#### **6.1.4.- Importancia de la detección de VTG circulante**

Siendo la VTG una proteína inducida por estrógenos, la presencia de altos niveles de VTG circulante en hembras juveniles indica el inicio de la etapa vitelogénica del ciclo reproductivo (introducido en el capítulo 1), asociado a conductas reproductivas (Gist, 2011). Las hembras prepuberales y los machos no poseen niveles de VTG detectables debido a que los niveles de estrógenos son insuficientes para inducir su síntesis. En estos animales el gen de la VTG permanece normalmente silencioso aunque puede activarse por administración de estrógeno exógeno o xenoestrógenos (Jobling y col., 1995; Selcer y col., 2001; Tata y Smith, 1979). Consiguientemente, la detección de VTG circulante en machos o hembras prepúberes indicaría estimulación estrogénica anormal y puede utilizarse como biomarcador de la presencia de contaminación con xenoestrógenos (Tada y col., 2008; Jobling y col., 1995; Selcer y col., 2001).

---

## 6.2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **Hipótesis**

La exposición postnatal de yacarés overos prepuberales a PEs activa el proceso de vitelogénesis.

### **Objetivos Específicos**

Determinar si la exposición postnatal temprana a E2 (0,014ppm y 1,4 ppm) y a BPA (1,4 ppm y 140ppm) produce activación de la vitelogénesis evaluando:

- La transcripción génica de Vtg.
- La Vtg almacenada en el hepatocito.
- La Vtg en circulación periférica.

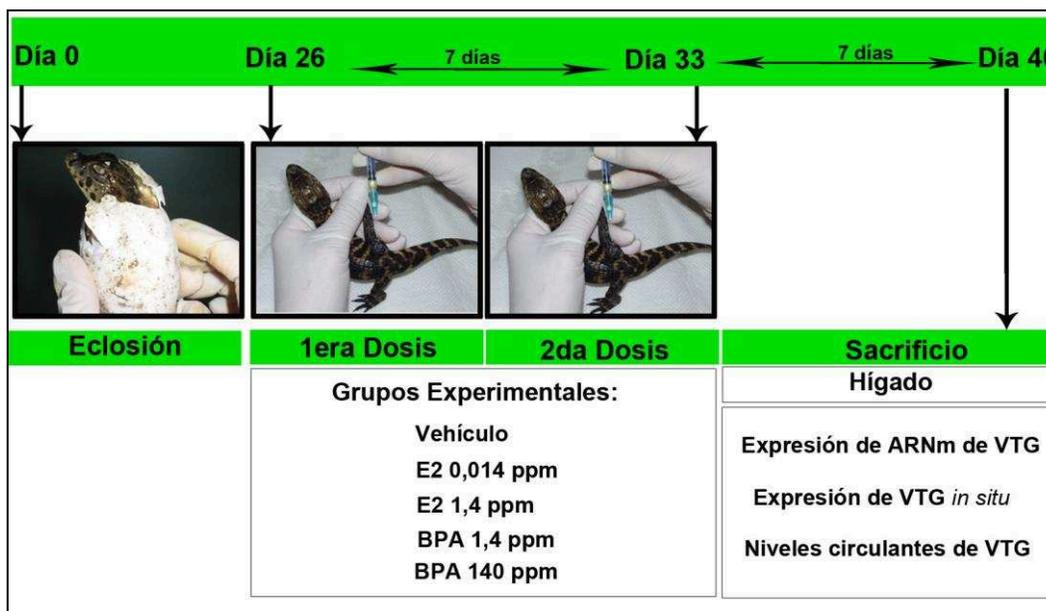
## 6.3- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1.- Animales

La cría de animales desde su nacimiento hasta el momento del sacrificio se realizó según fue descrito en la sección 3.1.4.

### 6.3.2.- Diseño experimental

Con el fin de determinar si la exposición postnatal a xenoestrógenos produce cambios en la transcripción, almacenamiento y niveles circulantes de VTG, hembras provenientes de diferentes nidos fueron distribuidas al nacimiento equitativamente en los 5 grupos experimentales descritos en la sección 5.3.2.



**Figura 40:** Efectos de la exposición postnatal temprana a estrógenos ambientales sobre la vitelogénesis

El nro de crías utilizados para determinación de los niveles de expresión de ARNm-VTG y VTG (proteína *in situ* y circulante) se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6:** Numero de animales utilizados en el estudio de vitelogénesis

Determinación	vehículo	E2 0,014ppm,	E2 1,4 ppm	BPA 1,4ppm	BPA 140ppm	TOTAL
RNAm - VTG	5	5	6	6	5	27
VTG (proteína <i>in situ</i> y circulante)	15	16	9	16	15	71

### 6.3.3.- Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción génica de VTG.

#### 6.3.3.1.- Extracción de muestras

Inmediatamente después del sacrificio, se disecó para cada animal, bajo condiciones libres de RNAasas, una porción de 1 cm<sup>2</sup> de hígado. Cada porción se ubicó en criotubos estériles previamente tarados y se determinó su masa por pesada diferencial. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido (flash-frozen) y posteriormente almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARNm total.

#### 6.3.3.2.- Extracción de RNAm total y transcripción reversa (RT-PCR)

Cada muestra de hígado de cada grupo experimental se homogenizó individualmente en reactivo TRIzol y se extrajo el ARN total de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina). La concentración de ARN se midió en espectrofotómetro utilizando el cociente  $A_{260}/A_{280}$ . Solamente aquellas muestras con un cociente  $A_{260}/A_{280}$  mayor a 1,9 fueron seleccionadas para la retrotranscripción del ARNm total. Las mismas se conservaron a -80°C hasta su utilización.

La retrotranscripción a ADN copia (ADNc) se realizó utilizando cantidades equivalentes de ARN (2 µg). Para ello se utilizó transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (*M-MLV* según sus siglas en inglés; *Moloney Murine Leukemia Virus*) (300 U; Promega, Madison, WI) junto con 200 pmoles de hexanucleótidos al azar (Promega). A cada tubo de reacción se agregó veinte unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen), 100 nmoles de una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) y buffer de transcriptasa reversa 1x obteniendo un volumen final de 30 µl. La transcripción reversa se realizó a 42°C durante 90 min y la reacción fue finalizada mediante calentamiento a 97°C durante 5 min y posterior enfriamiento en hielo. El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de 60µl con agua libre de ribonucleasas. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q (Quiagen, TecnoLab; Buenos Aires, Argentina).

### 6.3.3.3.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de VTG (ARNm-VTG) se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real. Los cebadores utilizados para amplificar los ADNc producto de la retrotranscripción del ARNm-VTG se diseñaron a partir de la búsqueda de regiones homólogas en organismos seleccionados siguiendo un criterio filogenético. Se compararon las secuencias de VTG de tres organismos que abarcan una doble divergencia evolutiva. Las secuencias utilizadas se describen en la tabla 7.

**Tabla 7:** Especies y número de código de las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de cebadores utilizados en RT-PCR.

Especie	Denominación	Nro de código
<i>Gallus gallus</i>	Vtg1	M18060
<i>Anolis caroliniensis</i>	Vtg	AF199489
<i>Xenopus laevis</i>	VtgA2	Y00354

Dado que no se encontraron regiones 100% homólogas lo suficientemente largas para diseñar los cebadores, los mismos se diseñaron con un cierto grado de degeneración. Las secuencia de los cebadores utilizados, así como los del gen de referencia (*housekeeping*) se muestran en la tabla 8. Como control interno de carga (*housekeeping*) se determinó la expresión de la subunidad 18S ribosomal.

**Tabla 8:** Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de los cebadores (5´-3´)	Amplicón (pb)	Número de Genbank
vtg	Sentido: AGTACAWTGGGBTCTGGCCCA Antisentido: CCRAYYCGYCCAYTGCTGTATTC	115	-
18S ARN	Sentido: TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA Antisentido: ATCCGAGGGCCTCACTAAAC	71	NR_003278.3

Todas las muestras retrotranscriptas a ADNc fueron amplificadas por triplicado en termociclador Step One Cyler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).

Los tubos de reacción para la PCR en tiempo real se constituyeron con 5  $\mu$ l de ADNc que se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica; Rosario, Argentina) y 10 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la tabla 9. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

**Tabla 9.** Protocolo de ciclado para PCR de tiempo real utilizado

Paso	Temperatura	Tiempo	Nro de Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	15	1
Desnaturalización (melting)	95	15segundos	40
Hibridación	51,7	15 seg	40
Extensión	72	15	40
Lectura	82	4 segundos	40

La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida.

#### **6.3.3.4.- Determinación de los niveles de expresión relativa de ARNm-VTG**

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi y col., 1993). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Rotor-Gene Q Series (Versión 1.7 Quiagen; Tecnolab) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (18S) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los

ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la eficiencia (Ef) ( $Ef = 10^{(-1/pendiente)-1}$ ). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98% y 102%. El posterior cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen en los animales tratados con respecto a los controles se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos y col., 2007). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen 18S fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen 18S en cada grupo experimental.

#### **6.3.3.5.- Análisis estadístico**

Todos los datos fueron calculados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los distintos parámetros estudiados fueron obtenidas aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn (Siegel, 1956). Para el análisis estadístico entre dos grupos experimentales se utilizó el test de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas significativas sólo si  $P < 0,05$ .

#### **6.3.4.- Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la síntesis proteica de VTG**

##### **6.3.4.1.- Extracción de muestras**

Luego de seccionar la porción de hígado destinada a análisis por técnica de biología molecular, se disecó una porción de hígado que fue inmediatamente sumergida en solución de formol-buffer pH 7,4; en la cual se fijó durante 6hs a temperatura ambiente. Posteriormente, tras sucesivos lavados en buffer fosfatos pH 7,6; se conservaron en alcohol 70 hasta su procesado histológico según técnica de rutina (tabla A1).

#### **6.3.4.2.- Determinación de VTG *in situ***

La detección de VTG *in situ* se realizó por IHQ. Las condiciones particulares de la reacción se detallan en la tabla A7. Como control positivo se utilizaron cortes histológicos de hígado de hembra previamente expuesta a protocolo de inducción de VTG (Rey y col 2006). En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con suero no inmune y control negativo de expresión de VTG utilizando cortes de hígados de yacaré macho.

#### **6.3.5.- Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la liberación de VTG**

##### **6.3.5.1.- Extracción de muestras**

En el momento del sacrificio se tomaron muestras de sangre con heparina como anticoagulante (Rivero, Buenos Aires, Argentina) y los inhibidores de proteasas aprotinina (Sigma), 0,0175 unidades inhibitoras de tripsina (UIT)/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,5 mM (Sigma). Inmediatamente luego de la extracción, las muestras se centrifugaron (3000 rpm, 4°C) y se separó el plasma sobre baño de hielo. Las muestras de plasma se conservaron a -20°C hasta su análisis.

##### **6.3.5.2.- Cuantificación de las muestras por ELISA**

La cuantificación de VTG circulante se realizó siguiendo el protocolo de ELISA competitivo diseñado y puesto a punto por Rey y col., 2006, con ligeras modificaciones. Las condiciones generales de esta técnica se describen en la tabla A8. La modificación más importante respecto de la técnica original fue el cambio de buffer de sensibilización por otro cuyo pH se encuentre alejado del punto isoeléctrico de la VTG. El punto isoeléctrico de la VTG se determinó mediante el uso de software Vector-NTI a partir de las secuencias de aminoácidos de VTG de especies cercanas a *C. latirostris*. Las especies utilizadas fueron las mismas a partir de las cuales se diseñaron los cebadores utilizados para la determinación de expresión de ARNm (punto 6.3.3.3); *Gallus gallus* (ave);

*Xenopus laevis* (anuro), *Anolis caroliniensis* (lagarto). Las secuencias de aminoácidos se obtuvieron de la base de datos de *Pubmed/Protein*. Dado que el punto isoeléctrico se encuentra cercano a 9,2; se utilizó como buffer de sensibilización  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  pH 10.

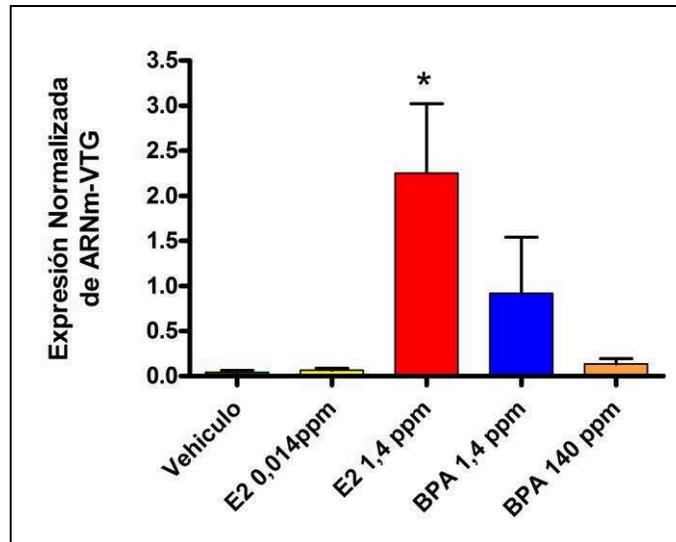
A través de curvas de competencia con diluciones sucesivas de VTG purificada en suero de yacaré macho (libre de VTG), se verificó la sensibilidad y rango de lectura de la técnica luego de modificar el buffer de sensibilización.

Las muestras se evaluaron por triplicado en la misma placa. En todos los ensayos se incluyó una curva estándar para verificar sensibilidad, linealidad y rango de lectura y un control negativo de suero de yacaré macho. La absorbancia de los pocillos se registró a 450 nm en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electro Co., Finland, EU).

## 6.4- RESULTADOS

#### 6.4.1.- Efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción génica de VTG

En especies ovíparas la síntesis hepática de VTG es un proceso inducido por estrógenos al inicio de la pubertad; y como tal puede ser estimulado por xenoestrógenos.

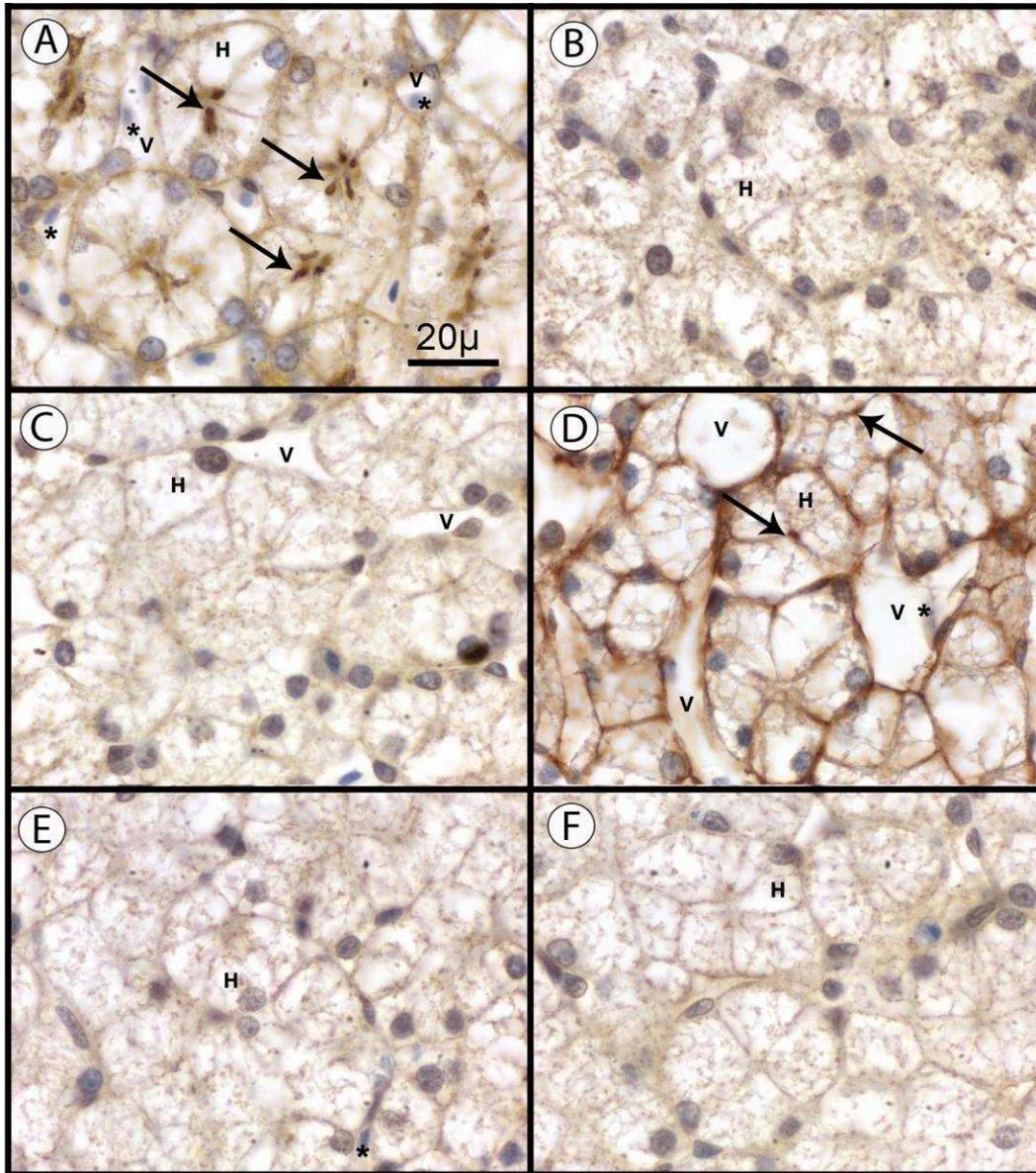


**Figura 41: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la transcripción hepática de VTG.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de **Dunn**; 95% de confianza.

La exposición postnatal a la dosis más alta de E2 produjo un aumento en la expresión relativa de RNAm-VTG. Si bien la exposición a la dosis más baja de BPA no produjo cambios significativos desde el punto de vista estadístico, se observa una tendencia hacia el aumento de la actividad transcripcional de este gen.

#### 6.4.2.- Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión hepática de VTG

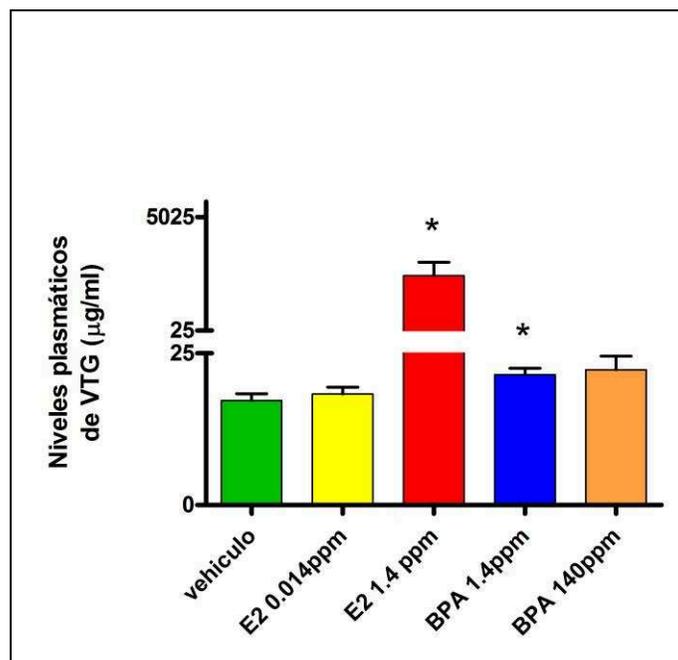
La VTG sintetizada en respuesta a la estimulación estrogénica puede acumularse en el hepatocito de las hembras desde donde luego es volcada a la circulación sanguínea. La exposición postnatal a la dosis más alta de E2 produjo acumulación hepática de VTG detectable por IHQ (figura 42).



**Figura 42: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre la expresión hepática de VTG.** A: Control positivo, hígado de hembra juvenil expuesta a 7 dosis consecutivas de E2 1,4ppm. B-F: Hígados de yacarés postnatales tempranos tratados según diseño experimental en figura 40. B: vehículo. C: E2 0,014ppm. D: E2 1,4ppm. E: BPA 1,4ppm. F: BPA 140ppm. H: Hepatocitos; V: Vaso, asterisco: eritrocito. Las flechas señalan acúmulos de VTG. IHQ para VTG revelada con DAB y contracolorada con hematoxilina de Mayer.

### 6.4.3.- Efecto de la exposición postnatal a xenoestrógenos sobre los niveles circulantes de VTG

Como se ha señalado antes, una vez sintetizada, la VTG es volcada a la circulación general desde donde, en hembras puberales, es captada por receptores presentes en los folículos ováricos.



**Figura 43: Efecto de la exposición a xenoestrógenos sobre los niveles circulantes de VTG.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. Test de Kruskal Wallis seguido de post test de Dunn; 95% de confianza.

La exposición postnatal a la dosis más alta de E2 y más baja de BPA produjo un incremento en los niveles de VTG circulante de hembras prepuberales de *C. latirostris*.

## 6.5- DISCUSIÓN

La exposición postnatal a la dosis más alta de E2 produjo, en *C. latirostris* un incremento de la expresión de ARNm de VTG indicando la presencia de transcripción activa de este gen. Respecto del BPA, solo la exposición a la dosis más baja mostró una tendencia hacia el aumento de la transcripción. Estudios realizados en peces expuestos a flujo continuo de EE2 en agua muestran un incremento en los niveles de ARNm de VTG que precede al aumento de los niveles de VTG circulante. Este aumento en los niveles de ARNm es seguido de un rápido descenso luego de que la exposición cesa, teniendo un tiempo de vida medio de entre 0,8 a 4,4 días (Schmidt y col., 2002; Craft y col., 2004). Este rápido aumento en los niveles de ARNm tras la inducción de E2 también ha sido confirmado en tortugas acuáticas (*Chinemys reevesii*), en las cuales se produce un incremento del número de copias de ARNm a las 6 hs post-inyección y se mantiene por lo menos 24 hs después de la exposición. Lamentablemente no se obtuvo el tiempo de vida media del ARNm para esta especie (Tada y col., 2008). El tiempo de vida medio de los transcriptos indica que en nuestra especie así como en peces, los niveles de ARNm-VTG son útiles para evaluar exposiciones recientes. La falta de significancia estadística para los niveles de ARNm ante la exposición a la dosis más baja de BPA, (determinada 7 días después de la exposición), posiblemente se deba más a la disminución del número de transcriptos como consecuencia de procesos de degradación de los mismos que a la falta de estímulo.

La evaluación *in situ* de VTG hepática avala los hallazgos para los niveles de ARNm, puesto que solo se observan depósitos de VTG en los animales tratados con la dosis más alta de E2. Puesto que desconocemos la dinámica de liberación y acumulación de VTG en hígado, la ausencia de proteína *in situ* no necesariamente implica falta de síntesis. No puede descartarse, teniendo en cuenta la tendencia al aumento de los transcriptos de ARNm para BPA 1,2 ppm, procesos de síntesis e inmediata liberación hacia la circulación. Los análisis de los niveles circulantes de VTG, por su parte, muestran un aumento para los grupos tratados con la dosis más alta de E2 y con la dosis más baja de BPA, confirmando la capacidad del BPA a dosis bajas de inducir la síntesis de VTG. Los estudios

antes citados en inducción de vitelogénesis en peces indican que el tiempo de vida media de la VTG circulante oscila entre los 15 y los 34,6 días (Schmidt y col., 2002; Craft y col., 2004). El hallazgo de niveles elevados de VTG circulante en animales expuestos a la dosis más baja de BPA confirma la capacidad que tiene este PE, a esa dosis, de estimular la síntesis de VTG en hembras de *C. latirostris* en estadio postnatal temprano. Por otro lado, la determinación de VTG circulante en hembras postnatales tempranas de *C. latirostris* es una herramienta útil para evaluar exposiciones que ocurrieron por lo menos siete días antes de la obtención de la muestra. Teniendo en cuenta los tiempos de vida media informados para peces (Schmidt y col., 2002; Craft y col., 2004), probablemente los niveles de VTG en *C. latirostris* se mantengan elevados durante un tiempo aún mayor.

La VTG ha sido una molécula ampliamente utilizada como marcador de acción estrogénica y xenoestrogénica, principalmente en especies acuáticas (Matozzo y col., 2008). El efecto de la exposición a contaminantes con actividad hormonal sobre la síntesis de VTG está ampliamente documentado en diversas especies de peces. En reptiles, los principales estudios han sido hechos en tortugas acuáticas, las cuales muestran diferentes respuestas según los niveles de la exposición y la etapa del desarrollo en la cual ésta se produce. La exposición *in ovo* a BPA y E2 de huevos de tortuga *Chrysemys picta* incubados a temperatura productora de machos produjo alteraciones en la histología gonadal pero no produjo cambios en los niveles séricos de VTG (Jandegian y col., 2015). Un aspecto muy interesante a tener en cuenta respecto al uso de VTG circulante como marcador de contaminación por xenoestrógenos es la sensibilidad según el sexo de los animales y el concepto de “*priming*” o cebado. Tortugas macho habitantes de sitios impactados por contaminación xenoestrogénica no han mostrado niveles alterados de VTG circulante (Irwin y col., 2001; Meyer y col., 2013). Sin embargo, tortugas hembras provenientes de los mismos sitios no solo muestran niveles circulantes de VTG elevados (Irwin y col., 2001; Meyer y col., 2013), sino una respuesta mayor ante la estimulación experimental con E2 (Irwin y col., 2001). La razón de estas diferencias es explicada mediante el efecto de “*priming*”, o cebado, proceso debido al cual, la primer inducción de VTG necesita de altas dosis de E2, luego de

lo cual, la re exposición a dosis menores produce una respuesta amplificada (Irwin y col, 2001; Palmer y Palmer, 1995). Las tortugas hembras adultas tienen mayor sensibilidad a la exposición natural a xenoestrógenos debido al cebado natural. Palmer y Palmer, (1995) hallaron que la exposición experimental durante 7 días a E2, DES y DDT en tortugas acuáticas y ranas machos adultos produjo incrementos en los niveles de VTG circulante, siendo DDT el inductor de VTG menos potente (Palmer y Palmer, 1995). Estos resultados revelan que la inducción de VTG depende del cebado y tipo de xenoestrógeno.

Si bien el efecto de *priming* ha sido observado previamente en nuestro laboratorio para exposiciones de caimanes postnatales tempranos a E2 (Rey, 2007), nuestros resultados demuestran que una sola dosis de BPA de 0,14 ppm es suficiente como cebado, sensibilizando a hembras postnatales tempranas para la posterior inducción de VTG ante nuevas exposiciones. Actualmente no se cuentan con muchos antecedentes de determinación de VTG en cocodrilidos. Estudios hechos en juveniles de *Crocodylus moreletti* y *C. niloticus* naturalmente expuestos a compuestos contaminantes (organoclorados y efluentes respectivamente) no detectaron inducción de VTG (Rainwater y col., 2008) ni de los niveles de RNAm-VTG (Arukwe y col.2016). Esta falta de respuesta puede deberse a la exposición a tipos de xenoestrógenos o concentraciones ambientales de los mismos insuficientes para producir el cebado necesario. Nuestros hallazgos demuestran que la dosis más baja de BPA es capaz de producir este cebado en hembras postnatales tempranas, con lo cual esta especie y este estadio madurativo son especialmente sensibles a la exposición de dosis bajas ambientalmente relevantes de BPA. La inducción de Vtg en yacarés de corta edad como bioensayo de laboratorio para evaluación de sustancias xenoestrogénicas permite la utilización de este centinela en etapas postnatales tempranas. Demostramos que las crías de yacaré fueron capaces de responder al tratamiento estrogénico y de sintetizar Vtg, evidenciando la maduración de su maquinaria de síntesis. La detección plasmática de VTG en hembras inmaduras de *C. latirostris* es una herramienta sensible, no invasiva para monitorear exposición a estrógenos

ambientales, que puede utilizarse con otros marcadores de efecto o exposición a PEs (Poletta y col., 2016).

## VII-CONCLUSIONES

La diferenciación morfogénica del oviducto de *C. latirostris* es coordinada por moléculas pertenecientes a la vía de señalización no canónica de wnt.

La exposición postnatal a xenoestrógenos adelanta los cambios madurativos que caracterizan la diferenciación postnatal del oviducto de *C. latirostris*.

La modificación en el patrón temporal de cambios en la histoarquitectura e histofuncionalidad oviductal observados como consecuencia de la exposición postnatal a xenoestrógenos está relacionada a cambios en la vía de señalización wnt.

La exposición postnatal a dosis ambientalmente relevantes de BPA activa la vitelogénesis en hembras postnatales tempranas.

El oviducto, como órgano blanco de perturbación endocrina es más sensible que el proceso de vitelogénesis, ya que se observan mayor cantidad de cambios a dosis menores.

## VIII- BIBLIOGRAFÍA

Abargues, M.R.; Ferrer, J.; Bouzas, A.; Seco, A. (2013). Removal and fate of endocrine disruptors chemicals under lab-scale posttreatment stage. Removal assessment using light, oxygen and microalgae. *Bioresour. Technol.* 149:142-148.

Adriani, W.; Seta, D.D.; Dessi-Fulgheri, F.; Farabollini, F.; Laviola, G. (2003). Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 111:395 - 401.

Aparicio, J.; Rios, J.N. (2008). Conservation status of the “Broad-snouted Caiman” (*Caiman latirostris*): A management plan for conservation in Tarija – Bolivia. En (Crocodiles. Proceedings of the 19th working meeting of the IUCN-SSC). (104-125).

Arango, N.A.; Donahoe, P.K. (2010). Sex differentiation in mouse and man and subsequent development of the female reproductive organs. StemBook, Cambridge, (MA). Harvard Stem Cell Institute .[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47454/pdf/Sex\\_differentiation\\_in\\_mouse\\_and\\_man.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47454/pdf/Sex_differentiation_in_mouse_and_man.pdf). Acceso: Noviembre 2015.

Arukwe, A.; Myburgh, J.; Langberg, H.A.; Adeogun, A.O.; Braa, I.G.; Moeder, M.; Schlenk, D.; Crago, J.P.; Regoli, F.; Botha, C. (2016). Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa. *Aquat. Toxicol.* 173:83-93.

Asakura, H.; Matsuto, T.; Tanaka, N. (2004). Behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate from MSW landfill sites in Japan. *Waste Manag.* 24:613-622.

ASIH American Society of Ichthyologists and Herpetologists. (2004). Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. (Beaupre, S.J.; Jacobson, E.R.; Lillywhite, H.L.; Zamudio, K.). Revised by the Herpetological Animal Care and Use Committee, second ed. <http://www.asih.org/sites/default/files/documents/resources/guidelinesherpsresearch2004.pdf>.

Beldomenico, 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.* 68:246-251.

Berkholtz, C.B.; Shea, L.D.; Woodruff, T.K. (2006). Extracellular matrix functions in follicle maturation. *Semin. Reprod. Med.* 24:262-269.

Berg, C.; Holm, L.; Brandt, I.; Brunström, B. (2001). Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethinyloestradiol. *Reproduction* 121:155-165.

Bergman, Å.; Heindel, J.J.; Jobling, S.; Kidd, K.A.; Zoeller, R. T. (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals -2012. World Health Organization and United Nations Environment Programme.

Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.I.; Bodden, M.K.; Windsor, L.J.; Birkedal-Hansen, B.; DeCarlo, A.; Engle, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: A Review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:197-250.

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

Borteiro, C.; Gutiérrez, F.; Tedrosa, M.; Kolenc, F. (2009). Food habits of the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) in northwestern Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 44:31–36.

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.* 82:86-95.

Bosquiazso, V.L.; Vigezzi, L.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; (2013). Perinatal exposure to diethylstilbestrol alters the functional differentiation of the adult rat uterus. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 138: 1-9.

Boyd-Leinen, P.; Gosse, B.; Rasmussen, K.; Martin-Dani, G.; Spelsberg, T.C. (1984). Regulation of nuclear binding of the avian oviduct progesterone receptor. Changes during estrogen-induced oviduct development, withdrawal, and secondary stimulation. *J. Biol. Chem.* 259:2411-2421.

Brix, R.; Postigo, C.; González, S.; Villagras, M.; Navarro, A.; Kuster, M.; Lopez de Alda, M.J.; Barceló, D. (2010). Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 396:1301-1309.

Bromer, J.G.; Zhou, Y.; Taylor, M.B.; Doherty, L.; Taylor, H.S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB.J.* 24:2273-2280.

Brotos, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos, M.; Olea, N. (1994). Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ. Health Perspect.* 103:608-612.

Buhi, W.C.; Alvarez, I.M.; Binelli, M.; Walworth, E.S.; Guillette, L. (1999). Identification and characterization of proteins synthesized de novo and secreted by the reproductive tract of the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *J. Reprod. Fertil.* 115:201-213.

Bulger, W.H.; Muccitelli, R.M.; Kupfer, D. (1978). Interactions of chlorinated hydrocarbon pesticides with the 8S estrogen-binding protein in rat testes. *Steroids* 32:165-177.

Cadigan, K.M.; Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11:3286-3305.

Carta, L.; Sassoon, D. (2004). Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth. *Biol. Reprod.* 71:444-454.

Carpenter, K.D.; Gray, C.A.; Bryan, T.M.; Welsh, T.H.; Spencer, T.E. (2003). Estrogen and antiestrogen effects on neonatal ovine uterine development. *Biol. Reprod.* 69:708-717.

Ceccarelli, I.; Della Seta, D.; Fiorenzani, P.; Farabollini, F.; Aloisi, A.M. (2007). Estrogenic chemicals at puberty change ER $\alpha$  in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 29:108-115.

Céspedes, R.; Lacorte, S.; Raldúa, D.; Ginebreda, A.; Barceló, D.; Piña, B. (2005). Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere* 61:1710-1719.

Chen, R.; Yin, P.; Zhao, L.; Yu, Q.; Hong, A.; Duan, S. (2014). Spatial-temporal distribution and potential ecological risk assessment of nonylphenol and

octylphenol in riverine outlets of Pearl River Delta, China. *J. Environ. Sci. (China)* 26:2340-2347.

Cikos, S.; Bukovska, A. y Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol. Biol.* 8: 113.

Clevers, H.; Nusse, R. (2012). Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149:1192-1205

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

Colborn, T.; Clement, C. (1992). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing Co., Inc., Princeton, NJ.USA.

Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies, Toxicology National Research Council. (1991). Chapter 2: Concepts and Definitions en Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards. (National Academy of Sciences). National Academies Press. Washington D.C. USA. (33-35).

Coors, A.; Jones, P.D.; Giesy, J.P.; Ratte, H.T. (2003). Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environ. Sci. Technol.* 37:3430-3434.

Craft, J.A.; Brown, M.; Dempsey, K.; Francey, J.; Kirby, M.F.; Scott, A.P.; Katsiadaki, I.; Robinson, C.D.; Davies, I.M.; Bradac, P.; Moffat, C.F. (2004). Kinetics of vitellogenin protein and mRNA induction and depuration in fish following

laboratory and environmental exposure to oestrogens. *Mar. Environ. Res.* 58:419-423.

Crain, D.A.; Guillette L.J. (1998). Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim. Reprod. Sci.* 53:77-86.

Crain, D.A.; Spileri, 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.

Daftary, G.S.; Taylor, H.S. (2006). Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr. Rev.* 27:331-355.

Das, S.C.; Isobe, N.; Nishibori, M.; Yoshimura, Y. (2006). Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction* 132:781-790.

Davies, S.; Behbahaninia, H.; Giraudeau, M.; Meddle, S.L.; Waites, K.; Deviche, P. (2015). Advanced seasonal reproductive development in a male urban bird is reflected in earlier plasma luteinizing hormone rise but not energetic status. *Gen. Comp. Endocrinol.* 224:1-10.

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.* 153:529-536.

Doheny, B.M.; Kohno, S.; Parrott, B.B.; Guillette, L.J. (2016). In ovo treatment with an estrogen receptor alpha selective agonist causes precocious development of the female reproductive tract of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Gen Comp Endocrinol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.026>. (Artículo en prensa)

Durando, M. L.; Piva, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Luque, E.; 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.

Durando, M.; Cocito, L.; Rodríguez, H.A.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2013). Neonatal expression of amh, sox9 and sf-1 mRNA in *Caiman latirostris* and effects of in ovo exposure to endocrine disrupting chemicals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191:31-38.

Durando, M.; Canesini, G.; Cocito, L.L.; Galoppo, G.H.; Zayas, M.A.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2016). Histomorphological changes in testes of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) associated with in ovo exposure to endocrine-disrupting chemicals. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 325:84-96.

Eerkes-Medrano, D.; Thompson, R.C.; Aldridge, D.C. (2015). Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res.* 75:63-82.

Finn, R.N. (2007). Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosphatidylserine and other subdomains in vitellogenins. *Biol. Rep.* 76, 926-935.

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

Fromme, H.; Kuchler, T.; Otto, T.; Pilz, K.; Muller, J.; Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36:1429-1438.

Galoppo, G., 2015. Caracterización del oviducto de *Caiman latirostris* como órgano blanco de la acción de estrógenos ambientales. Tesis Magister en Salud Ambiental. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Ginsberg, G.; Rice, D.C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from Bisphenol A? *Environ. Health Perspect.* 117:1639-1643.

Gioiosa, L.; Fissore, E.; Ghirardelli, G.; Parmigiani, S.; Palanza, P. (2007) Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* 52:307-316.

Girling, J.E. 2002. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *J. Exp. Zool.* 293:141-170.

Gist, D.H. (2011). Hormones and sex ducts and sex accessory structures of reptiles. En (Hormones and Reproduction of Vertebrates volume 3: Reptiles). (Norris, D.O.; Lopez, K.H). Academic Press. USA. (117-139).

Gore, A.C.; Chappell, V.A.; Fenton, S.E.; Flaws, J.A.; Nadal, A.; Prins, G.S.; Toppari, J.; Zoeller, R.T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews* 36:1-150.

Gorga, M.; Insa, S.; Petrovic, M.; Barceló. (2015). Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* 503-504:69-86.

Gray, C.A.; Frank F.; Bartol, F.F.; Becky J.; Tarleton, B.J.; Wiley, A.A.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W.; Thomas E. Spencer, T.S. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.* 65:1311-1323.

Grün, F.; Blumberg, B. (2006). Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147:50-55.

Guillette, L.J.; Woodward, A.R.; Crain, D.C.; Masso, 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.; 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.

Hammond, B.; Katzenellenbogen, B.S.; Krauthammer, N.; McConnel, J. (1979). Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:6641-6645.

Hayashi, K.; Yoshioka, S.; Reardon, S.N.; Rucker, E.B.; Spencer, T.E.; DeMayo, F.J.; Lydon, J.P.; MacLean, J.A. (2011). WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biol. Reprod.* 84:308-319.

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.R.; 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.* 127:64-73.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*.11: 1026-1030.

Hiyama, M.; Choi, E.K.; Wakitani, S.; Tachibana, T.; Khan, H.; Kusakabe, K.T. (2011). Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 73:1211-1215.

Ho, S.M.; Tang, W.Y.; Belmonte de Frausto, J.; Prins, G.S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 66:5624-5632.

Hora, J.; Gosse, B.; Rasmussen, K.; Spelsberg, T.C. (1986). Estrogen regulation of the biological activity of the avian oviduct progesterone receptor and its ability to induce avidin. *Endocrinology* 119:1118-1125.

Huang, S.S.; Huang, J.S. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *J. Cell Biochem.* 96:447-462.

Ingaramo, P.I.; Milesi, M.M.; Schimpf, M.G.; Ramos, J.G.; Vigezzi, L.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Varayoud, J. (2016). Endosulfan affects uterine development and functional differentiation by disrupting Wnt7a and  $\beta$ -catenin expression in rats. *Mol. Cell Endocrinol.* 425:37-47.

Imai, K.; Hiramatsu, A.; Fukushima, D.; Pierschbacher, M.D.; Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem. J.* 322:809-814.

Irwin, L.K.; Gray, S.; Oberdörster, E. (2001). Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquat. Toxicol.* 55:49-60.

Jandegian, C.M.; Deem, S.L.; Bhandari, R.K.; Holliday, C.M.; Nicks, D.; Rosenfeld, C.S.; Selcer, K.W.; Tillitt, D.E.; Vom Saal, F.S.; Vélez-Rivera, V.; Yang, Y.; Holliday, D.K. (2015). Developmental exposure to bisphenol A (BPA) alters sexual differentiation in painted turtles (*Chrysemys picta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 216:77-85.

Jefferson, W.N.; Padilla-Banks, E.; Phelps, J.P.; Gerrish, K.E.; Williams, C.J. (2011). Permanent oviduct posteriorization after neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Environ. Health Perspect.* 119:1575-1582.

Jeong, J.W.; Lee, H.S.; Franco, H.L.; Broaddus, R.R.; Taketo, M.M.; Tsai, S.Y.; Lydon, J.P.; DeMayo, F.J. (2009). Beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene* 28:31-40.

Jin, P.; Wang, X.; Chang, F.; Bai, Y.; Li, Y.; Zhou, R., (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J. Biomed. Res.* 27:135-144.

Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103:582-587.

Jones, S.M. (2011). Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. *En Hormones and Reproduction of Vertebrates volume 3: Reptiles* (Eds.:Norris, D.O.; Lopez, K.H.) Academic Press, USA, p.89-116.

Jurgens, S.S.; Helmus, R.; Waaijers, S.L.; Uittenbogaard, D.; Dunnebie, D.; Vleugel, M.; Kraak, M.H.S.; de Voogt, P.; Parsons, J.R. (2014). Mineralisation and primary biodegradation of aromatic organophosphorus flame retardants in activated sludge. *Chemosphere* 111:238-242.

Junqueira, L.C.U.; Junqueira, L.M.M.S. (1983). Colorações de uso geral em (Técnicas Básicas de Citologia e Histologia). (Pedra, E.A.). Livraria Editora Santos. Sao Paulo. (51-52).

Kamijima, M.; Casida, J.E. (2000). Regional modification of [<sup>3</sup>H] ethynylbicycloorthobenzoate binding in mouse brain GABA A receptor by endosulfan, fipronil, and avermectin B1a. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163:188-194.

Kass, L.; Varayoud, J.; Ortega, H.; Muñoz de Toro, M.; Luque, E.H. (2000). Detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissue. DNA denaturation following microwave or enzymatic digestion pretreatment is required. *Eur. J. Histochem.* 44:185-191.

Krishnan, A. V.; Starhis, P.; Permeth, S. F.; Tokes, L.; Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.

Kurita, T.; Cooke, P.S.; Cunha, G.R. (2001). Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (müllerian) epithelial differentiation. *Dev. Biol.* 240:194-211.

Larriera A.; Piña; C.I. (2000). Caiman latirostris (broad-snouted caiman) nest predation: does low rainfall facilitate predator access? *Herpetological Natural History* 7:73-77.

Larriera, A.; Imhof, A. (2000). Proyecto yacaré, Santa Fe, Argentina: a sustainable use proposal. En (Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission.

Crocodiles). The Crocodile Specialist Group, IUCN. The World Conservation Union. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. (311-313).

Lei, B.; Huang, S.; Zhou, Y.; Wang, D.; Wang, Z. (2009). Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere* 76:36-42.

Lésniak-Walentyn, A.; Hrabia, A. (2015). Expression and localization of matrix metalloproteinases (MMP-2, -7, -9) and their tissue inhibitors (TIMP-2, -3) in the chicken oviduct during maturation. *Cell Tissue Res.* 364:185-197.

Lind, P.M.; Milnes, M.R.; Lundberg, R.; Bermudez, D.; Orberg, J.A.; Guillette, L.J. (2004). Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ. Health Perspect.* 112:359-62.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, L.; Darnell, J. (2003). Microfilaments and intermediate filaments. En *Molecular Cell Biology*. Freeman W.H. & Company. (739-811).

Lusher, A.L.; Tirelli, V.; O'Connor, I.; Officer, R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Sci. Rep.* 5:1-9.

Ma, R.; Sassoon, D.A. (2006). PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environ. Health Perspect.* 114:898-904.

Matozzo, V.; Gagné, F.; Marin, M.G.; Ricciardi, F.; Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* 34:531-545.

Matsumoto, J.; Yokota, H.; Yuasa, A. (2002) Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health Perspec.* 110:193-196.

Matthews, J.B.; Twomey, K.; Zacharewski, T.R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14:149-157.

Meijide, F.J.; Rey Vázquez, G.; Piazza, Y.G.; Babay, P.A.; Itria, R.F.; Lo Nostro, F.L. (2016). Effects of waterborne exposure to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124:82-90.

Mericskay, M.; Kitajewski, J.; Sassoon, D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* 131:2061-2072.

Meyer, J.L.; Rogers-Burch, S.; Leet, J.K.; Villeneuve, D.L.; Ankley, G.T.; Sepúlveda, M.S. (2013). Reproductive physiology in eastern snapping turtles (*Chelydra serpentina*) exposed to runoff from a concentrated animal feeding operation. *J. Wildl. Dis.* 49:996-999.

Micucci, P.A.; Waller, T. (1995). La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina, En Los yacarés en Argentina: hacia un aprovechamiento sustentable. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. 221-232.

Miller, C.; Degenhardt, K.; Sassoon, D.A. (1998a). Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nat. Genet.* 20:228-230.

Miller, C.; Pavlova, A.; Sassoon, D.A. (1998b). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mech. Dev.* 76:91-99.

Miller, C.; Sassoon, D.A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development.* 125:3201-3211.

Miller, J.R.; Hocking, A.M.; Brown, J.D.; Moon, R.T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* 18:7860-7872.

Miller, R.K.; MCCrea, P.D. (2010). Wnt to Build a Tube: Contributions of Wnt Signaling to Epithelial Tubulogenesis. *Dev. Dyn.* 239:77-93.

Milnes, M.R.; Bermudez, D.S.; Bryan, T.A.; Gunderson, M.P.; Guillette, L.J. (2005). Altered neonatal development and endocrine function in Alligator mississippiensis associated with a contaminated environment. *Biol. Reprod.* 73:1004-1010.

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.* 30:625-634.

Monje, L.; Varayoud, J.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2007). Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J. Endocrinol.* 194:201-212.

Montes, G.S.; Junqueira, L.C.U. (1991). The use of picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Memb.Inst.Oswaldo Cruz* 86:1-11

Moore, B.C.; Hamlin, H.J.; Botteri, N.L.; Lawler, A.N.; Mathavan, K.K.; Guillette, L.J. (2010). Posthatching development of Alligator mississippiensis ovary and testis. *J. Morphol.* 271:580-595.

Mörner, T.; Obendorf, D.L.; Arotis, M.; Woodford, M.H. (2002). Surveillance and monitoring of Wildlife diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21:67-76.

Motz, V.A.; Callard, I.P. (1991). Seasonal variations in oviductal morphology of the painted turtle, *Chrysemys picta*. *J. Morphol.* 207:59-71.

Mouritsen, A.; Aksglaede, L.; Sørensen, K., Mogensen, S.S.; Leffers, H., Main, K.M., Frederiksen, H.; Andersson, A.M.; Skakkebaek, N.E.; Juul, A. (2010). Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int.J.Androl.* 33:346-359.

Murray, T.J.; Maffini, M.V.; Ucci, A.A.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol.* 23:383-390.

Muñoz-de-Toro, M. (2015). Plasticizer endocrine disruption: BPA effects in *Caiman latirostris* reproductive system. SETAC Latin America 11th Biennial Meeting. Buenos Aires, Pag 7, Abst 32.

National Toxicology Program Center For The Evaluation of Risks To Human Reproduction. (2008). NTP Brief on Bisphenol A. En (NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A). NIH Publication. (1-38).

Nelson, W.J.; Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483-1487.

Nelson, J.A.; Struck, R.F.; James, R. (1978). Estrogenic activities of chlorinated hydrocarbons. *Toxicol. Environ. Health* 4:325-339.

O'Brien, D.J.; Kaneene, J.B.; Poppenga, R.H. (1993). The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. *Environ. Health Perspect.* 99: 351-368.

Okada, A.; Kai, O. (2008). Effects of estradiol-17beta and Bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups reproductive system. *Asian J. Androl.* 10:271-276.

Page-McCaw, A.; Ewald, A.J.; Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:221-233.

Palmer, B.D.; Guillette, L. (1992). Alligators provide evidence for the evolution of an archosaurian mode of oviparity. *Biol. Reprod.* 46:39-47.

Palmer, B.D.; Palmer, S.K. (1995). Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environ. Health Perspect.* 4:19-25.

Peakall, D.B.; Walker, C.H. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicology* 3:173-179.

Phan, SH. (2012). Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 9:148-152.

Piña C. I. (2002). Un estudio del efecto de las temperaturas de incubación en la determinación sexual y el primer año de crecimiento del yacaré overo, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. U. N. C. Argentina.

Piña, C. I.; Donayo, P. (2000). Temperature sex determination on Caiman latirostris Research update. En: Crocodiles. Proceedings of the 15<sup>th</sup> Working Meeting of the CSG IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. (505-510).

Piña, C.I., Siroski, P., Simoncini, M. and Príncipe, G. (2009). Status of Caiman latirostris and Caiman yacare populations on north Argentina. In Crocodiles. Proceedings of the 19th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group. IUCN: Gland.

Poletta, G.L.; Simoniello, M.F.; Mudry, M.D. (2016). Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in Caiman latirostris blood. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 179:29-36.

Pottenger, L.H.; Domoradzki, J.Y.; Markham, D.A.; Hansen, S.C.; Cagen, S.Z.; Waechter, J.M. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. Toxicol. Sci. 54:3-18.

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. Tesina de licenciatura. Universidad CAECE.

Prado, W.S.; Piña, C.I.; Waller, T. (2012). Categorización del estado de conservación de los caimans (yacarés) de la República Argentina. Cuad. Herpetol. 26:403-410.

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.

Rainwater, T.R.; Selcer, K.W.; Nespoli, L.M.; Finger, A.G.; Ray, D.A.; Platt, S.G.; Smith, P.N.; Densmore, L.D.; Anderson, T.A.; McMurry, S.T. (2008). Plasma vitellogenin in Morelet's crocodiles from contaminated habitats in northern Belize. *Environ. Pollut.* 153:101-109.

Rey, F. (2007). Caracterización de biomarcadores de contaminación por xenoestrógenos y su aplicación al monitoreo de contaminación ambiental. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral.

Rey, F.; González, M.; Zayas, M.; 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*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162:286-292.

Rey, F.; Ramos, J.G.; Stoker, C.; Bussmann, L.E.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2006). Vitellogenin detection in *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae): a tool to assess environmental estrogen exposure in wildlife. *J. Comp. Physiol. B.* 176:243-251.

Rivera, O.E.; Varayoud, J.; Rodriguez, 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.* 32:304-312.

Rodriguez, H.A.; Santambrosio, N.; Santamaría, C.G., Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2010). Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod. Toxicol.* 30:550-557.

Salian, S.; Doshi, T.; Vanage, G. (2009). Perinatal exposure of rats to bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 85:742-752.

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.

Sassoon, D. (1999). Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. *Mol. Cell. Endocrinol.* 158:1-5.

Selcer, K.W.; Nagaraja, S.; Foret, P.; Wagner, D.; Williams, L.; Palmer, B.D. (2001). Vitellogenin as a biomarker for estrogenic chemicals: Development of antibodies and primers with broad species applications. En: *PCBs: Recent advances in the environmental toxicology and health effects.* (Eds.: Robertson, R.L.; Hansen, L.G.), Lexington, the University Press of Kentucky, USA, p.285-292.

Seston, R.M.; Zwiernik, M.J.; Fredricks, T.B.; Coefield, S.J.; Tazelaar, D.L.; Hamman, D.W.; Paulson, J.D.; Giesy, J.P. (2009). Utilizing the great blue heron (*Ardea herodias*) in ecological risk assessments of bioaccumulative contaminants. *Environ. Monit. Assess.* 157:199-210.

Shi, N.; Guo, X.; Chen, S.Y. (2014). Olfactomedin 2, a novel regulator for transforming growth factor- $\beta$ -induced smooth muscle differentiation of human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Mol. Biol. Cell.* 25:4106-4114.

Shugart, L.R.; McCarthy, J.F.; Halbrook, R.S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk. Anal.* 12:353-360.

Schmid, T.; Gonzalez-Valero, J.; Rufli, H.; Dietrich, D.R. (2002). Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Lett.* 131:65-74.

Schultz, J.R.; Petz, L.N.; Nardulli, A.M. (2003). Estrogen receptor  $\alpha$  and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201:165-175.

Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica.

Silberstein, G.B. (2001). Postnatal mammary gland morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 52:155-162.

Silberstein, G.B.; Flanders, K.C.; Roberts, A.B.; Daniel, C.W. (1992). Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. *Dev. Biol.* 152:354-362.

Simoncini, M.S.; Cruz, F.B.; Piña, C.I. (2013). Effects of environmental temperature on the onset and the duration of oviposition period of *Caiman latirostris*. *Herpetol. Conserv. Biol.* 8:409-418.

Smolenaars, M.M.; Madsen, O.; Rodenburg, K.W.; Van der Horst, D.J. (2007). Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J. Lipid Res.* 48:489-502.

Snyder R.W.; Maness, S.C.; Guido, K.W.; Welsch, F.; Summer, S.C.J.; Fennell, T.R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168:225-234.

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.

Sperker, B.; Backman, J.T.; Kraemer, H.K. (1997). The role of p-Glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 33:18-31.

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.

Starck, J.M.; Cruz-Neto, A.P.; Abe, A.S. (2007). Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). *J. Exp. Biol.* 210:2033-2045.

Stoker, C. (2004). *Caiman latirostris* como monitor biológico de contaminación ambiental por xenoestrógenos. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral.

Stoker, C.; Beldomenico, 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*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 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* 84:311-317.

Stoker, C.; Rey, F.; Rodríguez, 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.; Zayas, M.A.; Ferreira, M.A.; Durando, M.; Galoppo, G.H.; Rodríguez, H.A.; Repetti, M.R.; Beldoménico, H.R.; Caldini, E.G.; Luque, E.H.; Muñoz-de-

Toro, M. (2013). The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98:191-195.

Tada, N.; Nakao, A.; Hoshi, H.; Saka, M.; Kamata, Y. (2008). Vitellogenin, a biomarker for environmental estrogenic pollution, of Reeves' pond turtles: analysis of similarity for its amino acid sequence and cognate mRNA expression after exposure to estrogen. *J. Vet. Med. Sci.* 70:227-234.

Tata, J.R.; Smith, D.F. (1979). Vitellogenesis: a versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Recent Prog. Horm. Res.* 35:47-95.

Teo, R.; Möhrlen, F.; Plickert, G.; Müller, W.A.; Frank, U. (2006). An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Dev. Biol.* 289:91-99.

Teuten, E.L.; Saquing, J.M.; Knappe, D.R.U.; Barlaz, M.A.; Jonsson, S.; Bjorn, A.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C.; Galloway, T.S.; Yamashita, R.; Ochi, D.; Watanuki, Y.; Moore, C.; Viet, P.H.; Tana, T.S.; Prudente, M.; Boonyatumanond, R.; Zakaria, M.P.; Akkhavong, K.; Ogata, Y.; Hirai, H.; Iwasa, S.; Mizukawa, K.; Hagino, Y.; Imamura, A.; Saha, M.; Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond .B Biol. Sci.* 364: 2027–2045.

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. U.S.A.*102:7014-7019.

Tiwari, D.; Vanage, G. (2013). Mutagenic effect of bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reprod. Toxicol.* 40:60-68.

Traish, A.M.; Wotiz, H.H. (1990). Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide – (533-547) recognize a specific site in unactivated (8S) and activated (4S) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptors. *Endocrinology* 127:1167-1175.

Valdés, M.E.; Marino, D.J.; Wunderlin, D.A.; Somoza, G.M.; Ronco, E.A.; • Pedro Carriquiriborde, P. (2015). Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the “Pampas” region and the “Río de la Plata” estuary (Argentina). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94:29–33.

van der Schalie, W. H.; Gardner, H. S.; 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.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Joazeiro, P.P.; Montes, G.S.; Muñoz de Toro, M.M.; Luque, E.H. (2001). Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. *Biol. Reprod.* 65: 275-383.

Varayoud, J.; Monje, L.; Bernhardt, T.; Mónica Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2008a). Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17 $\beta$ -estradiol. *Reprod.Toxicol.* 26:138-145.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazzo, V.L.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2008b). Developmental exposure to bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149:5848-5860.

Veiga-Lopez, A.; Luense, L.J.; Christenson, L.K.; Padmanabhan, V. (2013). Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression. *Endocrinology* 154:1873-1884.

Verdade, L.; Larriera, A; Piña, C.I. (2010). Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). En *Crocodyles. Status survey and conservation action plan.* (SC Manolis, C Stevenson). Crocodile Specialist Group. Darwin. Australia (18-22).

Verdade, L.M. (1995). Biología reproductiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em Sao Paulo, Brasil. En: *La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina*, Vol. 1. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. (57-79).

Vigizzi, L.; Bosquiazzo, V.L.; Kass, L.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2015). Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod. Toxicol.* 52: 83-92.

Waller, T.; Micucci, P. (1994). Situación del grupo *Caiman* en Argentina. Apuntes sobre su distribución, situación poblacional y comercio histórico. En: *Memorias del IV Workshop sobre conservación y manejo del yacaré overo (*Caiman latirostris*).* (Larriera, A.; Imhoff, A.; Von Fink, M.C.; Costa, A.L.; Tourn, C.C.). Fundación Banco Bica. Santa Fe, Argentina. (40-49).

Wheelock, M.J.; Johnson, K.R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:207-235.

Welshons, W.; Nagel, S.; vom Saal, F. (2006). Large effects from small exposures III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147:56-69.

Wessels, N. K. (1970). Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. *J. Exp. Zool.* 175:455-466.

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.* 144:151-157.

Xu, X.; Liu, Y.; Sadamatsu, M.; Tsutsumi, S.; Akaike, M.; Ushijima, H.; Kato, N. (2007). Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neurosci. Res.* 58:149-155.

Yanosky, A.A.; Mercolli, C. (1995). *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* en la reserva ecológica El Bagual (Formosa, Argentina). En: *La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en América Latina*, Vol. 1. (Larriera, A.; Verdade, L.). Santa Fe, Argentina. (113-122).

Yigit, F.; Daglioglu, S. (2010). Histological changes in the uterus of the hens after embryonic exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol. *Protoplasma* 247:57-63.

Zalko, D.; Soto, A.M.; Dolo, L.; Dorio, C.; Rathahao, E.; Debrauwer, L.; Faure, R.; Cravedi, J.P. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111:309-319.

Zhang, W.; Yin, K.; Chen, L. (2013). Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:5681-5689.

Zhang, K.S.; Chen, H.Q.; Chen, Y.S.; Qiu, K.F.; Zheng, X.B.; Li, G.C.; Yang, H.D.; Wen, C.J. (2014). Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomed. Pharmacother.* 68:1037-1043.

Zoeller, R.T.; Brown, T.R.; Doan, L.L.; Gore, A.C.; Skakkebaek, N.E.; Soto, A.M.; Woodruff, T.J.; Vom Saal, F.S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153:4097-4110.

## IX- ANEXOS

**Tabla A1:** Procesado histológico hasta inclusión en parafina.

<b>Fijación</b> Relación muestra:volumen fijador: 1:10		Formol Buffer pH 7,4 6 horas Temperatura ambiente (20-25°C)
<b>Lavados</b>		Buffer fosfatos (PBS) 10 min (tres veces)
<b>Deshidratación</b>	Etanol 70%	1 hora o hasta reinicio de deshidratación
	Etanol 96% I	1 hora
	Etanol 96% II	2 horas
	Etanol 100% I	1 hora
	Etanol 100 % II	1 hora
	Etanol 100% III	<i>overnight</i>
<b>Clarificación</b>	Xilol I	1 hora
	Xilol II	1 hora
	Xilol III	1 hora
<b>Impregnación</b>	Parafina I	<i>overnight</i> 56-60°C*
	Parafina II	2 horas 56-60°C
	Parafina III	1 hora 56-60°C
<b>Inclusión</b>		

\* depende del punto de fusión de la parafina

PBS: Solución Buffer de Fosfatos

**Tabla A2:** Protocolo general de procedimientos pre y post tinción de cortes histológico.

<b>Muestra:</b> cortes (5 $\mu$ ) de tejidos incluidos en parafina, montados sobre portaobjetos tratados con adhesivo tisular*	
Desparafinización e hidratación	
Xilol 1 (desparafinización)	5 minutos
Xilol 2 (desparafinización)	3 minutos
Xilol 3 (desparafinización)	1 minutos
Etanol 100%	1 minutos
Etanol 96%	1 minutos
Etanol 70%	1 minutos
<b>Coloración o técnica inmunohistoquímica</b> (ver tablas A3 a A6)	
Deshidratación	
Alcohol 70	1 minuto
Alcohol 96	1 minuto
Alcohol 100 (I)	1 minuto
Alcohol 100 (II)	1 minuto
Xilol (I)	2 minutos
Xilol (II)	5 minutos
Líquido de montaje y cubre objeto.	

\* El adhesivo tisular empleado fue silano

**Tabla A3:** Tinción tricrómica de Acido Peryódico-base de Schiff (PAS).

Desparafinización e hidratación (Tabla A2)	
Agua de canilla (corriente)	2 minutos
Acido Peryódico	12 minutos
Agua de canilla	5 minutos
Agua destilada	una inmersión
Reactivo de Schiff (en oscuridad)	15 minutos
Agua de canilla	7 minutos
Hematoxilina de Mayer	1 minutos
Agua de canilla	5 inmersiones
Agua amoniaca	10 segundos
Agua de canilla	2 minutos
Deshidratación y montaje (Tabla A2)	

**Tabla A4:** Tinción tricrómica de picosirius – hematoxilina de Harris

Desparafinización e hidratación (Tabla A2)	
Agua de canilla	2 minutos
Picosirius	10 minutos
Agua de canilla (corriente)	1 minutos
Hematoxilina de Harris (filtrada)	20 segundos
Agua de canilla (corriente)	3 minutos
Deshidratación y montaje (Tabla A2)	

**Tabla A5:** Técnica de coloración de picosirius – hematoxilina de Harris para luz polarizada

Desparafinización e hidratación (Tabla A1)	
Agua de canilla	2 minutos
Picosirius	1 hora
Agua de canilla (corriente)	1 minutos
Hematoxilina de Harris (filtrada)	6 minutos
Agua de canilla (corriente)	15 minutos
Deshidratación y montaje (Tabla A1)	

**Tabla A6:** Protocolo general utilizado para técnicas de IHQ

<b>Muestra:</b> cortes (5 $\mu$ ) de tejidos incluidos en parafina, montados sobre portaobjetos tratados con adhesivo tisular*		
<b>Desparafinización / hidratación</b>	Xilol 1	3 minutos (inmersión)
	Xilol 2	3 minutos (inmersión)
	Xilol 3	3 minutos (inmersión)
	Alcohol 100	1 minuto (inmersión)
	Alcohol 96	1 minuto (inmersión)
	Alcohol 70	1 minuto (inmersión)
	PBS	5 minutos (inmersión)
<b>Recuperación Antigénica</b>	Buffer citrato 0.01M, pH:6,0 En horno microondas	La intensidad y duración se determinan según antígeno a evaluar
<b>Lavado</b>	PBS	5 minutos (inmersión)
<b>Bloqueo de actividad peroxidasa endógena</b>	(4ml de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -30 volúmenes- + 36 ml de metanol)	15 minutos (inmersión)
<b>Lavado</b>	PBS	15 minutos (inmersión)
<b>Bloqueo de uniones no específicas</b>	NGS-PBS-leche 1:20	30 minutos en cámara húmeda
<b>Incubación con Anticuerpo Primario</b>	dilución en buffer BC11	14-16 horas en cámara húmeda a 4°C
<b>Lavado</b>	PBS	15 minutos
<b>Incubación con Anticuerpo Secundario</b>	Anticuerpo Secundario Dilución en PBS-BSA 1%	30 minutos en cámara húmeda
<b>Lavado</b>	PBS	10 minutos (inmersión)
<b>Amplificación de la reacción Ag-Ac</b>	Streptavidina-peroxidasa	30 minutos en cámara húmeda
<b>Lavado</b>	PBS	5 minutos (inmersión)
<b>Sistema de revelado</b>	(2,3mg DAB + Tris-HCl 3,3ml 0,05M (pH 7.5) + 5uL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 volúmenes).	10 minutos Cortar la reacción por dilución con agua destilada
<b>Contracoloración</b>	Hematoxilina de Mayer	(opcional)
<b>Deshidratación y Montaje</b>	(Tabla A2)	

PBS: Buffer Fosfato, pH 7,5.

NGS-PBS-leche 1,5%: Suero normal de cabra al 5% en PBS adicionado con leche en polvo descremada 1,5%

Buffer BC11: buffer H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> 0,02M; NaCl 0,15M; adicionado con Azida sódica 0,02% y Albúmina sérica bobina 1%; pH 7,6

Buffer PBS-BSA 1%: Albúmina sérica bobina en PBS al 1%; pH 7,5.

DAB: Diaminobencidina

Tris-HCl : Tris-HCl 0,05M, pH 7,5.

**Tabla A7:** Biomarcadores de inmunofenotipo, hormono-dependencia y vía de señalización WNT. Anticuerpos y particularidades metodológicas para su evaluación.

Biomarcadores		Anticuerpo primario	Dilución del Anticuerpo primario	Proveedor del Anticuerpo primario		Dilución del Anticuerpo secundario	Proveedor del Anticuerpo secundario	Extravidina/ peroxidasa dilución	Recuperación Antigénica
Inmunofenotipo tisular	Alfa-actina	NCL-SMA Clon $\alpha$ sm-1	1/50	Novocastra		1/130	LETH	1/150	3 min 100% potencia 12 min 40% potencia
	Desmina	NCL-DES-DER II Clon DE-R-11	1/50	Novocastra		1/80	LETH	1/150	3 min 100% potencia 12 min 40% potencia
Vía de señalización WNT	WNT 7a	AntiWNT 7a	1/400	LETH		1/200	LETH	1/150	15 min 100% potencia
	WNT 5a	AntiWNT 5a	1/400	LETH		1/200	LETH	1/150	15 min 100% potencia
	$\beta$ -catenina	B- catenin (E5) SC 7963	1/1600	Santa Cruz Biotechnology		1/100	LETH	1/150	15 min 100% potencia
Hormonodependencia	Receptor de Estrógeno alfa	LETH-ER 202Y (policlonal)	1/200	LETH		1/400	LETH	1/300	15 min 100% potencia
	Receptor de Progesterona	Rabbit anti-Human Progesterone Receptor (Nro M3529I)	1/300	DAKO corporation		1/200	LETH	1/150	15 min 100% potencia
Vitelogénesis	Vitelogenina	VtgLETHW 03-07 (polyclonal)	1/100	LETH		1/600	LETH	1/400	3 min 100% potencia 12 min 40% potencia

(\*) En horno microondas, potencia máxima 900 watts, buffer citrato pH 6,0

**Tabla A8:** Protocolo utilizado para ELISA de VTG.

<b>1- SENSIBILIZACIÓN.</b> Buffer de Sensibilización: Carbonato/Bicarbonato, pH 10,00 200µg de vtg /pocillo. 100 µl de solución de sensibilización /pocillo	1h 37°C, cámara húmeda, placa tapada. Overnight (no menos de 12 horas) 4°C en cámara húmeda, placa tapada.
<b>2- LAVADOS.</b> Buffer de Lavado: PBS-Tween 20 0,05%. 280 µl/pocillo 3 lavados	1er lavado: ubicar los 280 µl /pocillo y realizar movimientos de ascenso y descenso (descargando y recargando parcialmente el tip) 11 veces. Descartar el buffer de lavado. 2do y 3er lavado: Ubicar los 280 µl en cada pocillo y transcurridos 2 min, descartar.
<b>3- BLOQUEO DE UNIONES INESPECÍFICAS</b> Buffer PBS-Leche 4%. 200 µl/pocillo	1h 30min 37°C, cámara húmeda, placa tapada.
<b>4- LAVADOS.</b>	Idem punto 2
<b>5- ANTICUERPO PRIMARIO.</b> 100 µl/pocillo. (muestras incubadas overnight)	1h 30min 37°C, cámara húmeda, placa tapada.
<b>6- LAVADOS.</b>	Idem punto 2
<b>7- ANTICUERPO SECUNDARIO.</b> 100 µl/pocillo. Dilución: 1/500 en Buffer ELISA	1h, 37°C, cámara húmeda, placa tapada.
<b>8- LAVADOS.</b>	Idem punto 2
<b>9- REVELADO.</b> 100 µl /pocillo de Tetrametil-bencidina (TMB)	10 min
<b>10- STOPPER</b>	100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 12%.
<b>11 LECTURA.</b>	Leer absorbancia a 450nm

Buffer PBS- Tween 20: Buffer fosfatos adicionado con Tween 20 (0,05%); pH 7,5

Buffer PBS- Leche 4%: Buffer fosfato adicionado con leche en polvo descremada 4%

Buffer ELISA: PBS-Tween 20 adicionado con leche en polvo descremada 4%

TMB: Tetrametil-bencidina