

1. INTRODUCCIÓN

1. Perturbadores endocrinos

1.1 Generalidades

En los últimos años se ha puesto en evidencia la presencia en el ambiente de contaminantes que, por su capacidad de imitar o inhibir la acción de hormonas endógenas, se los denominó **perturbadores endocrinos o agentes hormonalmente activos**. Su presencia pone en riesgo la salud del ecosistema afectando la homeostasis endocrina tanto en animales silvestres como en el hombre (Colborn y col., 1993).

En reuniones internacionales abocadas al tema, se han postulado diferentes definiciones. Según la *European Commission* y la *Environmental Protection Agency* (EPA), un perturbador endocrino es una “*sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones*” (Damstra y col., 2002; *European Commission*, 1996; U.S. EPA, 1997).

Entre los perturbadores endocrinos, se destacan aquellos compuestos de uso agroindustrial o doméstico que poseen actividad estrogénica (similar a los estrógenos endógenos) o antiestrogénica (antagónica a los estrógenos endógenos) a los que se denomina **xenoestrógenos** o **estrógenos ambientales**. Estudios previos han demostrado que la exposición a xenoestrógenos provoca efectos nocivos sobre la reproducción de animales silvestres, domésticos y del hombre (Davis y col., 1993; Guillette y col., 1994; Multigner y Oliva, 2001; 2002; Safe, 2002; Sharpe y col., 1995; Sharpe y Skakkebæk 1993).

1.2 Primeras evidencias de perturbación endocrina

Las primeras observaciones en relación a los perturbadores endocrinos se realizaron en Estados Unidos en el año 1947, donde comenzaron a notar anomalías en el desarrollo y la reproducción de aves que se alimentaban de peces contaminados, lo que condujo a una drástica disminución en la reproducción de las aves con el consiguiente peligro para el mantenimiento de las especies (Colborn y col., 1993; Colborn, 1995). La actividad perturbadora de plaguicidas comenzó a evidenciarse por el año 1949, a partir de la detección de una disminución en el recuento espermático de trabajadores que

manipulaban el insecticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) para la fumigación de plantaciones (Singer, 1949). Otros efectos provocados por el DDT fueron manifestados al advertir un desarrollo anormal del sistema reproductor de embriones de gaviota que habían sido expuestos *in ovo* (Fry y Toone, 1981). Nuevas evidencias de efectos deletéreos se encontraron en el lago Apopka (Florida, Estados Unidos) donde la población de tortugas y aligatores disminuyó drásticamente posiblemente debido al derrame de un pesticida cuya formulación contenía diclorodifenildicloroetano (DDE) (Guillette y col., 1994).

Otro hecho muy notable que alertó sobre alteraciones en el tracto reproductor como consecuencia de la exposición a xenoestrógenos fue la detección de adenocarcinomas de células claras de vagina en adolescentes cuyas madres habían sido tratadas con dietilstilbestrol (DES) durante el embarazo para evitar abortos espontáneos (Herbst y col., 1971). El DES se utilizó desde 1947 a 1971 administrándose desde las primeras semanas de embarazo hasta la semana 35 (Mittendorf, 1995). El 50% de los casos de adenocarcinoma de vagina registrados hasta abril de 1995 corresponden a hijas de madres tratadas con DES (Mittendorf, 1995).

Con el transcurso de los años se descubrieron nuevos compuestos sintéticos con actividad estrogénica, en algunos casos el hallazgo fue accidental como sucedió en el laboratorio de los doctores Soto y Sonnenschein quienes detectaron que tubos plásticos de centrifuga liberaban una sustancia con actividad estrogénica que fue identificada como nonilfenol (Soto y col. 1991). El nonilfenol se utiliza como antioxidante en la fabricación de plásticos y la obtención de productos derivados usados como surfactantes no iónicos aplicados como emulsionantes, dispersantes o agentes estabilizadores en productos de consumo doméstico, agrícola o industrial (Calafat y col., 2005). Del mismo modo, Krishnan y col. (1993) identificaron al bisfenol A (BPA) mientras buscaban, en levaduras, una proteína de unión a estrógeno. Así, encontraron que el BPA se liberaba durante el autoclavado de los recipientes de policarbonato utilizados para esterilizar los medios de cultivo.

1.3 Efectos de los perturbadores endocrinos

Numerosas evidencias, resumidas en la tabla 1, muestran los efectos adversos de los perturbadores endocrinos sobre la reproducción y el desarrollo.

Tabla 1: Efectos de la exposición natural o experimental a de perturbadores endocrinos en diferentes especies

Especie	Efecto	Contaminante	Referencia
<i>Mamíferos</i>			
Humanos	Ginecomastia, oligospermia, impotencia, hipogonadismo, recuento espermático y motilidad disminuida, irregularidades en el ciclo menstrual	DDT, kepona, exposición a anticonceptivos orales, derivados de estilbena	Degen y Bolt, 2000
Ovejas y Vacas	Infertilidad y distocia	Isoflavonoides y cumestanos	Hughes, 1988
Focas	Problemas en las funciones reproductivas	PCBs	Tyler y col., 1998
Conejos	Infertilidad, Problemas en ovulación e implantación	Isoflavonoides	Hughes, 1988
Ratas y Ratones	Lesiones proliferativas, tumores en tracto reproductivo, infertilidad, alteraciones del ciclo estral, adelantamiento de pubertad, alteraciones en morfogénesis de mama, modificaciones en patrón de diferenciación de próstata	DES, isoflavonoides, BPA	Durando y col., 2007; Hughes, 1988; Markey y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Newbold y col., 2000; Ramos y col., 2001
<i>Aves</i>			
Gaviotas	Desarrollo anormal de tejido ovárico y oviductos en embriones machos (feminización)	DDT	Fry y Toone, 1981
Aves acuáticas	Disminución del espesor de la cáscara de huevos, mortalidad, anormalidades en desarrollo, retraso en crecimiento	DDE, PCBs, agonistas de receptores aril-hidrocarbonados	Custer y col., 2001; Martin y col., 2003
<i>Reptiles</i>			
Aligatores	Alteraciones en genitales internos y externos, alteraciones en niveles de las hormonas sexuales	DDT, DDE, dicofol	Guillette y col., 1994; 1995a; b; Milnes y col. 2002

Continúa en página 5

Yacarés	Reversión sexual, alteraciones en órganos reproductores, pérdida de peso de huevos en la incubación	BPA, endosulfán, atrazina	Beldoménico y col., 2007; Stoker y col., 2003
Tortugas	Desarrollo reproductivo anómalo	Nonaclor, aroclor 1242, DDE, clordano	Willingam y Crews, 1999
<i>Peces</i>			
Pez mosquito	Expresión anormal de caracteres sexuales secundarios, masculinización	Androstenodiona	Howell y col., 1980
Lenguado	Niveles hormonales, desarrollo ovárico, viabilidad de huevo y larvas reducidos	Hidrocarburos poliaromáticos	Safe, 2000
Salmón, Esturión	Inducción de proteína de la zona radiata y vitelogenina en machos y en hembras inmaduras	nonilfenol	Meucci y Arukwe, 2005; Feist y col., 2005
Mojarra del Sol (<i>Lepomis megalotis</i>)	Alteración de vitelogenina y disminución de testosterona plasmática en hembras.	Mezcla de contaminantes en efluentes de papelera	Fentress y col., 2006
<i>Invertebrados</i>			
Caracoles	Masculinización, formación de órganos femeninos adicionales, malformación de oviductos, incremento de la producción de ovocitos	Tributiltin, BPA, octilfenol	Mizuhashi y col., 2000; Oehlmann y col., 2000; Vos y col., 2000
Copépodos marinos	Maduración sexual y producción de huevos estimulada	BPA	Andersen y col. 1999b

1.4 Xenoestrógenos

1.4.1 Efectos organizacionales y activacionales

La exposición a xenoestrógenos durante el desarrollo puede causar efectos en la organización tisular o en la activación hormonal. Los efectos organizacionales hacen referencia a cambios permanentes en la morfogénesis y en la diferenciación de los órganos, generalmente se producen en un período preciso y “crítico” del desarrollo de cada órgano. (Milnes y col., 2006; Stoker y col., 2003; Willingham y Crews, 1999). Frecuentemente los cambios organizacionales se observan a nivel estructural (McLachlan, 2001; Silbergeld y col., 2002).

Los efectos en la activación de las hormonas hacen referencia a las respuestas de las células y de los órganos luego de la diferenciación y organización. Aquí se incluyen las funciones fisiológicas para las cuales las hormonas son las señales que actúan a través de toda la vida. Usualmente, los efectos activacionales son de naturaleza temporaria, a menos que provoquen daños a tejidos que sinteticen o respondan a hormonas, tales como los folículos primordiales del ovario o las células de Sertoli de testículo (McLachlan, 2001; Silbergeld y col., 2002).

Los efectos en la organización o en la activación frecuentemente se encuentran relacionados: las respuestas en la activación de las hormonas pueden estar condicionadas por exposiciones durante la organización, en el desarrollo. Así, las exposiciones a xenoestrógenos pueden provocar tanto, efectos inmediatos en el desarrollo, interfiriendo con la diferenciación organizacional normal con consecuencias deletéreas permanentes; como efectos latentes o tardíos, revelados en respuesta a hormonas endógenas en la pubertad y/o la vida adulta (Colborn y col., 1993; Herbst y col., 1971; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Sharpe, 2006; Stoker y col., 2003).

1.4.2 Mecanismos de acción

1.4.2.1 Estrógenos endógenos versus xenoestrógenos

Las hormonas endógenas tienen una función crítica en la regulación de la homeostasis de un organismo debido a que participan en la comunicación intercelular que rige el funcionamiento del sistema endocrino. En particular, los estrógenos son un grupo de hormonas filogenéticamente conservadas que

poseen una reconocida capacidad de actuar como reguladores del crecimiento y la diferenciación celular de diversos órganos y tejidos (O'Brien y col., 1999). En el metabolismo de numerosas especies se destacan tres clases de estrógenos, 17β -estradiol, considerado el estrógeno más potente, estrona y estriol. Ejercen su acción a través de la interacción con sus receptores que son factores de transcripción nucleares activados por ligandos (naturales o sintéticos) que actúan por unión a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta hormonal los que están localizados en la región promotora de los genes sensibles (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996; Evans, 1988). Al interaccionar con los ligandos, traducen señales provenientes del medioambiente extracelular provocando la expresión genética de las células (figura 1).

Por su parte los xenoestrógenos se unen débilmente a los receptores de estrógeno alterando su capacidad de activar la transcripción de genes dependientes de estrógeno (Sonnenschein y Soto, 1998; Burow y col., 1999). La localización nuclear de los receptores de estrógeno y la naturaleza lipofílica de sus ligandos promueve el libre acceso de xenoestrógenos a los mecanismos de regulación genética fundamentales en las células blanco.

Básicamente, los mecanismos a través de los cuales los xenoestrógenos ejercen su acción incluyen su capacidad para participar mediante las siguientes vías (Sonnenschein y Soto, 1998; Knobil, 1999) (figura 1):

1. Imitando y/o antagonizando el efecto de hormonas endógenas por interacción directa con su receptor.
2. Alterando la síntesis, secreción, metabolismo o biodisponibilidad de hormonas endógenas.
3. Interfiriendo con la síntesis o el metabolismo de los receptores hormonales.

Además ciertos agentes con actividad hormonal pueden alterar la disponibilidad o la unión a proteínas de transporte de hormonas. Se ha observado que algunos perturbadores endocrinos no se unen a proteínas de transporte como lo hacen los ligandos naturales, de este modo se encuentran

más disponibles para las células blanco y el metabolismo hepático (Damstra y col., 2002)

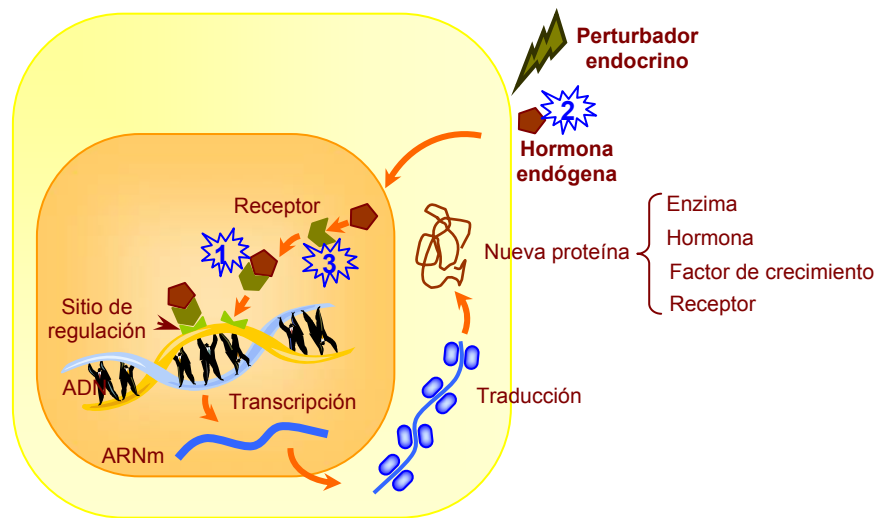
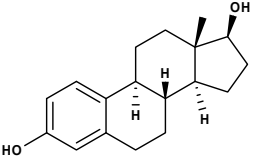
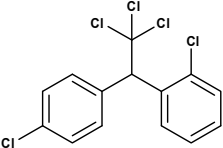
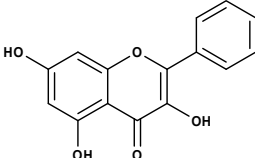
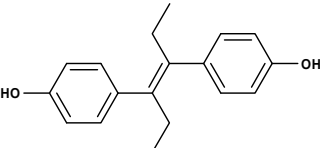
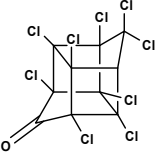
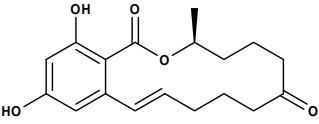
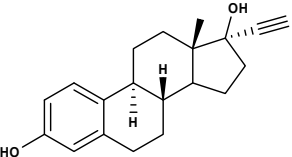
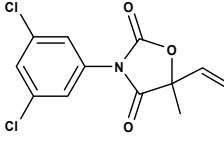
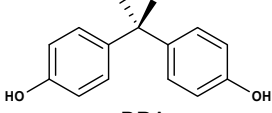
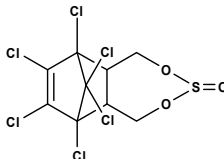
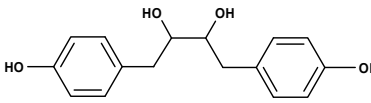
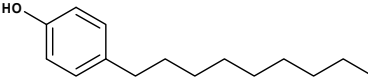
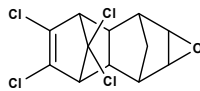
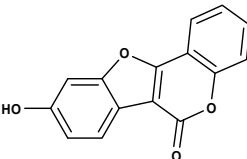
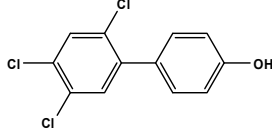
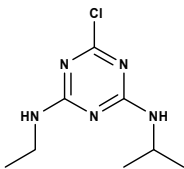


Figura 1: Mecanismo de acción de las hormonas esteroides endógenas y los posibles sitios de alteración de los perturbadores endocrinos. Modificado de <http://e.hormone.tulane.edu/learning/targetcells.html> 2006 y Damstra y col., 2002.

1.4.3 Estructuras químicas

Numerosos antecedentes demuestran que muchos perturbadores endocrinos que presentan actividad estrogénica poseen diversas estructuras químicas. Mientras que el estrógeno endógeno 17β -estradiol posee tres anillos fenantreno, en los xenoestrógenos no se ha encontrado un motivo estructural consistente. Frecuentemente poseen uno o dos anillos aromáticos, pueden presentar átomos de cloro, si bien su función no está claramente definida (McLachlan, 2001).

Tabla 2: Estructuras químicas de agentes con actividad estrogénica

Esteroides	Pesticidas	Productos Naturales
 <p>17β-estradiol</p>	 <p>DDT</p>	 <p>Genisteína</p>
Usado en farmacéutica		
 <p>DES</p>	 <p>Clordecona (Kepona)</p>	 <p>Zearalonona</p>
 <p>EE2</p>	 <p>Vinclozolin</p>	
Usado en industria		
 <p>BPA</p>	 <p>Endosulfán</p>	 <p>Enterolactona</p>
 <p>Alquilfenoles</p>	 <p>Dieldrin</p>	 <p>Coumestrol</p>
 <p>OH-PCB</p>	 <p>Atrazina</p>	

1.4.4 Xenoestrógenos seleccionados: Bisfenol A, Endosulfán, y Atrazina

1.4.4.1 Bisfenol A

El bisfenol A o BPA (di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano), es un compuesto

sintetizado por primera vez en 1891 cuya actividad estrogénica fue descrita 45 años más tarde en ratas ovariectomizadas, por Dodds y Lawson (1936). Estos investigadores observaron que el BPA era el primer estrógeno sintético que carece del núcleo fenantreno presente en el 17 β -estradiol (tabla 2). Sin embargo, su uso no fue muy difundido hasta descubrirse su capacidad de polimerización para generar policarbonatos plásticos. Lamentablemente, el enlace éster que une a los monómeros de BPA entre sí para formar el polímero no es estable y en consecuencia, el polímero se debilita con el tiempo, liberando BPA al material con el que se encuentra en contacto. El calentamiento y el contacto con compuestos ácidos o alcalinos, acelera la hidrólisis del enlace éster. Específicamente, al calentar latas de conserva para esterilizar los alimentos, la presencia de bebidas o alimentos ácidos o alcalinos en latas o policarbonatos plásticos y los lavados sucesivos de los productos de policarbonatos, han mostrado un incremento en la velocidad de liberación de BPA (Brotons y col., 1995, Howdeshell y col., 2003; Olea y col., 1996).

En la actualidad el BPA se encuentra ampliamente utilizado, no sólo en los productos de policarbonato, sino también en resinas epoxi y otros plásticos que incluyen polisulfonas, alquifenoles, poliéster-estirenos y ciertas resinas de estireno. Además de la industria del plástico, el BPA se ha utilizado en la formulación de pesticidas (fungicidas), antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi, 2000; vom Saal y Hughes, 2005).

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

Una clara evidencia de la exposición al BPA se mostró en un estudio realizado por Calafat y col. (2005), en el cual el 95% de las muestras de orina de 394 personas de Estados Unidos analizadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, poseían niveles detectables de BPA (entre 0,4 y 8 ppb), valores que concuerdan con los observados en otros países. Si se tiene

en cuenta que la tasa de metabolización de BPA es rápida (Volkel y col., 2002), estos datos sugieren que la exposición humana a cantidades significativas de BPA debe ser continua y proveniente de múltiples vías. Se estima que la dosis ingerida de BPA vía oral, a través del consumo de alimentos provenientes de latas de conserva es de 6,3 µg/día (Howe y Borodinsky, 1998), por ingerir bebidas contenidas en envases plásticos, aproximadamente 0,75 µg/día (Brotans y col., 1995), y dentro de la primer hora de colocado un sellador dental, la exposición a BPA estimada es de 90-931 µg/día (Olea y col., 1996).

En el medioambiente se ha detectado BPA en ríos y estuarios, en concentraciones desde 5 a 1900 ng/l. Asimismo, el contenido en sedimentos es significativo, entre 5 a 100 µg/kg. En el ambiente el BPA es persistente y no se degrada fácilmente bajo condiciones normales (Rippen, 1999).

La tabla 3 resume los resultados de estudios realizados en roedores de laboratorio y en anfibios que advierten sobre las consecuencias de la exposición a BPA.

Tabla 3: Observaciones de la acción de BPA en animales

Efectos	Dosis	Referencia
Incremento del crecimiento postnatal y comienzo temprano de la maduración sexual en ratones hembras.	2; 10 y 500 µg/kg/día (dosis materna).	Honma y col., 2002; Howdeshell y col., 1999; Nikaido y col., 2004.
Apertura vaginal temprana y desbalance de proliferación-apoptosis en mama de ratas hembra.	25 µg/kg/día (dosis materna).	Durando y col., 2007.
Inhibición de esteroidogénesis testicular en ratas.	2,4 µg/kg/día (dosis materna).	Akingbemi y col., 2004.
Incremento en el tamaño de la próstata de crías de ratones macho.	2 y 50 µg/kg/día (dosis materna)	Gupta 2000; Nagel y col., 1999; Timms y col., 2005
Disminución de la fertilidad y producción de esperma diario por exposición en el desarrollo o	0,2 a 20 µg/kg/día (dosis materna)	Al-Hiyasat y col., 2002; Chitra y col., 2003; vom Saal y col., 1998.

adultez en ratones macho.		
Estimulación del desarrollo de la glándula mamaria en ratones hembra.	0.025; 25 y 250 µg/kg/día (dosis materna).	Markey y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005.
Perturbación del ciclo estral y alteraciones en la implantación y preñez de ratones hembra.	25 a 500 µg/kg/día (dosis materna).	Al-Hiyasat y col., 2004; Nikaido y col., 2004.
Alteraciones morfológicas en embriones <i>Xenopus laevis</i> .	20 µM (en estadios sensibles)	Sone y col, 2004.
Feminización de renacuajos <i>X. laevis</i> .	0,01 a 1 µM.	Levy y col., 2004.
Incremento en niveles de ARNm del receptor de progesterona, de estrógeno β y en niveles del receptor de estrógeno α en cerebro de ratas.	400, 40 y 25 µg/kg/día, respectivamente.	Aloisi y col., 2001; Funabashi y col., 2003; 2004; Ramos y col., 2003.
Efectos en el comportamiento de ratas y ratones, que incluyen hiperactividad, aumento en la agresividad.	2 a 40 µg/kg/día.	Farabollini y col., 2002; Ishido y col., 2004; Kawai y col., 2003.

1.4.4.2 Endosulfán

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatien 3-óxido) (tabla 2) es un insecticida organoclorado que pertenece al subgrupo de los ciclodienos. Presenta isómeros α y β, distribuidos en una proporción aproximada de 70:30 (Goebel y col., 1982; N.R.A., 1998; U.S. EPA, 2002). En Argentina está siendo utilizado masivamente desde la prohibición total del monocrotofós en 1999, y es actualmente uno de los insecticidas de elección en cultivos de maíz, soja, trigo, girasol, sorgo, entre otros. Su empleo en los países del sur de Europa lo sitúa en las cotas más altas de ventas (Jiménez y col., 2004).

El endosulfán fue clasificado inicialmente como neurotóxico agudo (Clase I, U.S. EPA) observándose una inhibición del flujo de cloro estimulado por ácido gamma aminobutírico (GABA) y de las neuronas inhibitorias GABAérgicas de manera dosis-dependiente, principalmente en núcleo accumbens y en menor grado en cerebelo y materia gris periacueductal (Kamijima y Casida, 2000). Se comporta como xenoestrógeno de acuerdo al ensayo de proliferación celular, se une al receptor de estrógeno α de la rata con una afinidad similar al toxafeno y al o,p'DDT (Soto y col., 1995). Por ensayo de competición en fase sólida, se demostró que se une débilmente tanto al receptor de estrógeno α como al β (Kuiper y col., 1998).

Se observó que el endosulfán se absorbe lenta e incompletamente al sistema endógeno, sin embargo, esta absorción se incrementa en presencia de alcoholes, aceites y emulsionantes (Smith, 1991).

El endosulfán posee una baja solubilidad en agua, pero se adhiere fácilmente a partículas de arcilla, de este modo persiste en suelo y agua por varios años (Naqvi y Vaishnavi, 1993). Es uno de los pesticidas más frecuentemente hallado y en mayores concentraciones en aguas superficiales y sedimentos de cuencas del Pantanal (Brasil) así como también en agua de lluvia colectada en la misma región (Laabs y col., 2002). En Canadá, se han detectado concentraciones de endosulfán en aguas superficiales que se encuentran en el rango de 0,02 a 0,53 $\mu\text{g/l}$, superando ampliamente los niveles permitidos (Bisson y Hontela, 2002).

Otras evidencias de la amplia utilización de endosulfán, fueron reveladas en España, donde se detectó este pesticida en leche materna humana (Campoy y col., 2001), en suero y en tejido adiposo de mujeres (Jiménez y col., 2004). Por otro lado, se detectó uno de los isómeros de endosulfán en huevos inviables de cocodrilos Morelet, en Belize, y en muestras de sedimentos de la laguna de donde provenían los nidos de estos cocodrilos, se encontraron de 53 a 57 ppb de endosulfán (Wu y col., 2000).

En nuestro país existen evidencias del uso y consecuente contaminación a especies que se encuentran en contacto a través de diferentes vías. Tal es el caso de vacas en cuya leche procesada se ha detectado endosulfán (Maitre y col., 1994), de anfibios (Lajmanovich y col., 2002) y pejerreyes (Menone y col., 2000).

Algunos de los efectos encontrados en animales expuestos a endosulfán se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4: Observaciones de la acción de endosulfán en animales

Efectos	Dosis	Referencia
Respuesta humoral disminuida significativamente en ratas.	1 a 5 mg/kg/día en 6 a 22 semanas, vía oral.	Banerjee y Hussain, 1986; 1987.
Reducción significativa de la migración de macrófagos y linfocitos en ratas.	1, 2 mg/kg/día, vía oral	Banerjee y Hussain, 1986, 1987.
Cambios morfológicos en células esteroideogénicas del pez <i>Ophiocephalus punctatus</i>	1 ppm durante 30 días.	Pandey, 1986.
Disminución de los niveles de gonadotropina y testosterona plasmática y testicular en ratas.	7,5 y 10 mg/kg durante 15 y 30 días, vía oral.	Singh y Pandey, 1990.
Alteración de la distribución y migración de células germinales primordiales en pez cebra.	$1 \cdot 10^{-7}$ M.	Willey y Krone, 2001.
Disminución significativa de la hipertrofia compensatoria de ovario, incremento de folículos atrésicos y disrupción del ciclo estral, en ratón hemicastrado.	1,5 a 9 mg/kg/día durante 15 días, vía oral.	Hiremath y Kaliwal, 2002.
Disminución en la producción de huevos con demoras en la eclosión, en la madurez sexual de hembras de pez japonés (medaka) por exposiciones breves <i>in ovo</i> .	0,01; 0,10 y 1 µg/l durante 24 hs.	Gormley y Teather, 2003.
Elevados niveles séricos de LH, demoras en maduración sexual y disminución de testosterona sérica en varones adolescentes.	Exposición a fumigaciones aéreas durante su vida.	Saiyed y col., 2003.

1.4.4.3 Atrazina

La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamino-S-triazina) (tabla 2), es un herbicida que ejerce su acción a través de la inhibición de la fotosíntesis. Se utiliza en el control de malezas en plantaciones de maíz, sorgo, caña de azúcar, entre otros y en plantas coníferas para reforestación. Además, se emplea como herbicida no selectivo en tierras que no se utilizan para cultivo. Actualmente su utilización se encuentra restringida debido a su capacidad potencial de contaminar aguas y suelos. Se clasifica como ligeramente tóxico, clase III, según normas de la EPA.

La atrazina es altamente persistente en suelo, no se adsorbe en gran medida a sedimentos y es moderadamente soluble en agua. No se hidroliza fácilmente a pH neutro pero sí alejándose de esta condición. Un estudio realizado con muestras de agua de localidades de Mississippi, Ohio y sus alrededores (Estados Unidos), reveló que el total de muestras analizadas contenía atrazina, que persistió en el 27% de las muestras sobre el nivel de concentración máximo definido por la EPA (U.S. Department of Interior).

En peces se observó que existe una rápida captura de atrazina del agua a través de las branquias, contaminando los otros órganos vía circulación sanguínea (Gunkel y Streit, 1980).

Su actividad como xenoestrógeno es controvertida, mientras algunos autores sostienen que en la rata, no se une al receptor de estrógeno y carece de efecto uterotrófico (Connor y col., 1996; Tennant y col., 1994), otros autores informaron que la exposición a atrazina produce, en ratas, una inhibición de la secreción de la hormona luteinizante con la consecuente perturbación de la ovulación (Cooper y col., 1996). Este efecto se encontraría mediado por una inhibición directa sobre la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas, conduciendo así a una pérdida de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis (Cooper y col., 1996; 2000). En el aligador americano, Vonier y col. (1996) observaron que la atrazina interacciona con receptores de estrógeno provenientes de oviducto. En la tabla 5 se resumen otros efectos observados por exposición a atrazina, que evidenciarían su actividad estrogénica:

Tabla 5: Observaciones de la acción de atrazina en diversos organismos.

Efectos	Dosis	Referencia
Alteraciones y retraso en el crecimiento intrauterino en mujeres embarazadas.	Consumo en agua contaminada, hasta 2,2 µg/l.	Munger y col., 1997.
Senescencia reproductiva prematura y presencia de folículos poliovulares en ratas.	70 ppm durante 24 meses.	Stevens y col. 1994.
Alta incidencia de tumores de mama en ratas.	400 ppm durante 24 meses.	Eldridge y col. 1999.
Retraso en la apertura vaginal, alteraciones en ciclo estral de ratas.	25, 50 mg/kg	Ashby y col., 2002; Laws y col., 2000.
Incremento en la actividad de la enzima aromatasa en el complejo gonadal-adrenal-mesonefros de crías de aligatores macho.	14 ppm (única dosis).	Crain y col., 1997.
Retraso en el desarrollo gonadal y hermafroditismo en machos de anfibios <i>Rana pipiens</i> .	0,1 y 25 ppb.	Hayes y col., 2002; 2003.

1.4.5 Detección y monitoreo de xenoestrógenos

1.4.5.1 Ensayos *in vitro* e *in vivo*

La capacidad de los perturbadores endocrinos de afectar el sistema endocrino aparentemente reside en sus propiedades funcionales, ya que su estructura química no permite predecir su actividad. Pueden actuar, directamente por unión a su receptor específico, o indirectamente, y sus efectos pueden variar dependiendo del órgano blanco, el tiempo de exposición y la interacción con otros perturbadores endocrinos. Por este motivo fue necesario diseñar ensayos *in vivo* e *in vitro* con el objetivo de determinar la capacidad estrogénica de un perturbador endocrino. Los ensayos más importantes que se utilizan son:

Tabla 6: Determinación de actividad estrogénica de compuestos por diferentes métodos

<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
Ensayo	¿Cómo actúa?	Ensayo	¿Cómo actúa?
Unión competitiva al receptor de estrógeno (Jordan y col., 1985; Miksicek, 1995).	Por unión al receptor de estrógeno compitiendo con un compuesto marcado de afinidad de unión conocida.	Cornificación del epitelio vaginal en roedores (Allen y Doisy, 1923).	Causando la división y diferenciación del epitelio vaginal de células cuboides a cilíndricas pseudo-estratificadas, para luego, estratificadas, queratinizadas escamosas.
Proliferación celular (Hertz, 1985; Soto y col., 1994; 1995).	Induciendo la proliferación de líneas celulares provenientes de órganos blancos de respuesta a estrógeno.	Apertura vaginal (Edgren y col., 1966).	Acelerando significativamente la apertura vaginal.
Expresión de genes dependientes de receptor (Gaido y col., 1997).	Activando transcripcional y traduccionalmente a un gen reportero.	Ensayo uterotrófico (Rubin y col., 1951).	Induciendo un incremento de peso húmedo del útero en ratones prepuberales o en adultos ovariectomizados.

Los ensayos antes mencionados proporcionan un claro conocimiento de la naturaleza estrogénica de sustancias naturales y sintéticas. Sin embargo, los distintos ensayos no son equivalentes (Fang y col., 2000; Shelby y col., 1996). Los ensayos de unión al receptor de estrógeno, del gen reportero y de proliferación celular son consistentes en la detección de actividad estrogénica, no obstante, difieren en la sensibilidad (Andersen y col., 1999a; Fang y col., 2000). El ensayo uterotrófico, aunque es el de menor sensibilidad, es capaz de detectar pro-estrógenos, esto es, químicos que no se unen al receptor de

estrógeno hasta no ser metabolizados. Las principales ventajas y desventajas de estos métodos se presentan en la tabla 7:

Tabla 7: Ventajas y limitaciones de los diferentes métodos para determinar actividad estrogénica

<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
Ventajas	Limitaciones	Ventajas	Limitaciones
Estudios de mecanismos de acción e interacción con otras vías de respuestas endocrinas.	No representan la complejidad de las interacciones <i>in vivo</i> (biotransformación, unión a proteínas, etc.).	Utiliza un sistema biológico completo teniendo en cuenta la farmacocinética del compuesto a evaluar.	No se puede trabajar a gran escala.
Útiles para procesar un alto número de muestras.	Requieren cuidados especiales para mantener el fenotipo original de las líneas celulares.	Debido a los balances en la homeostasis de los organismos sus resultados permiten inferir sobre humanos y poblaciones de animales silvestres.	Laboriosos.
Reproducibles, Rápidos, Económicos.			Baja especificidad

1.4.5.2 Marcadores biológicos de exposición

Diversos marcadores biológicos funcionales o también llamados **biomarcadores** pueden ser usados para monitorear la exposición a perturbadores endocrinos en poblaciones silvestres y en humanos. Se definen como: *variables bioquímicas, fisiológicas y/o histológicas cuyo cambio, presencia y/o ausencia, permite determinar la exposición del organismo centinela a algún contaminante en particular* (Hugget y col., 1992; Munkittrick y McCarty, 1995). Incluyen respuestas en los niveles poblacionales, cambios en las características sexuales secundarias, alteraciones en las concentraciones

de las hormonas esteroides plasmáticas, cambios en actividades enzimáticas, perturbaciones histológicas en tejidos del sistema endocrino, inducción o alteración de vitelogenina y de la proteína zona radiata. Estas respuestas selectivas medidas en ciertos organismos pueden actuar como sistemas de advertencia temprana y proveer índices de potenciales efectos de los contaminantes sobre el ecosistema (Knobil, 1999). A pesar de que los biomarcadores no proveen información directa acerca de los efectos de los xenoestrógenos a niveles más altos de la organización biológica (como ser el hombre), se ha sugerido que podría haber una relación entre el estado fisiológico de estos organismos y parámetros a nivel de la población (DiGuilio y col., 1995).

A pesar de que un biomarcador no siempre puede predecir la respuesta total de un organismo (Cormier y Daniel, 1994), un conjunto de biomarcadores de exposición y efecto, puede proveer una visión más profunda del grado de exposición a la contaminación.

Los biomarcadores de elección presentes en los organismos (llamados centinelas), deben reunir determinadas características:

- Ser altamente **específicos** (no modificarse por otros factores)
- Ser altamente **sensibles** (alterarse a bajas concentraciones de contaminante)
- Ser **económicos y prácticos**

1.5 Organismos centinelas

Con el objeto de controlar y preservar la salud del medioambiente y de las especies que lo habitan, se realizan monitoreos ambientales con organismos centinelas, donde la fauna cumple un rol de fundamental relevancia. Mientras que los estudios con animales, en condiciones controladas de laboratorio, son muy útiles para determinar relaciones dosis-respuesta y para estudiar los mecanismos moleculares de regulación de una respuesta o de toxicidad, nada pueden argumentar acerca de acciones biológicas integradas debido a exposiciones crónicas a concentraciones reales de contaminantes ambientales. Los animales silvestres no sólo proporcionan información acerca de tipos, características, cantidades y biodisponibilidad de contaminantes del medioambiente, sino que también proveen importante información de los

efectos interactivos de estos agentes medioambientales y el rol de otros factores del ambiente en la respuesta toxicológica final (Fox, 2001).

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

Para llevar a cabo el monitoreo medioambiental, se utilizan especies especialmente susceptibles (van der Schalie y col., 1999). En un sistema de control por centinela, los animales se exponen a patógenos/contaminantes en el ambiente y se realizan muestreos regularmente para identificar efectos que sean potencialmente nocivos para la salud poblacional de otros animales de la misma especie o especies diferentes, incluido el hombre.

Los objetivos del uso de animales centinelas incluyen la recolección de datos que faciliten la estimación de riesgo en la salud pública, identificar contaminación o infección en las redes tróficas, determinar contaminación ambiental, e identificar efectos adversos en los animales.

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

- *Poseer una respuesta capaz de ser medida al agente a monitorear.* Esta respuesta suele ser característica en la especie centinela cuando la comparamos con las otras especies. Por ejemplo, es la especie más sensible, o la que más acumula al agente o que reacciona con una respuesta no encontrada en otras especies.
- *Habitar en un territorio que se encuentre incluido en el área a monitorear.* Es de especial interés la movilidad del animal, por esto se prefieren animales con territorios pequeños o con fidelidad a su hábitat.
- *Tener una población suficiente* que permita trabajar con un número adecuado de individuos.
- *Tener una relación íntima con la fuente de exposición* (agua, aire, plantas, suelo, etc).

Para la elección de la especie centinela, es necesario además, tener en cuenta la duración de la exposición. En caso de estudiar efectos a corto plazo, buscando una acción aguda, el centinela debería tener una alta sensibilidad al agente de interés y mostrar una respuesta obvia. Un estudio diseñado para evaluar la salud de un ecosistema a largo plazo o los efectos de la exposición continua a pequeñas dosis del agente necesitan especies longevas que no manifiesten respuestas letales.

1.5.1. Reptiles como centinela

Los reptiles son particularmente útiles como centinelas debido a:

- Su persistencia en una gran variedad de hábitat,
- Amplia distribución geográfica,
- Longevidad,
- En muchos casos, fidelidad al sitio geográfico,
- Se encuentran en la posición superior de la red trófica.

Además, los reptiles muestran una sensibilidad a los contaminantes análoga a la descrita para aves y mamíferos. Por su longevidad y su posición dentro de la estructura trófica del ambiente, bioacumulan y biomagnifican los contaminantes a niveles similares o incluso superiores a los encontrados en aves y mamíferos (Crain y Guillette, 1998). El proceso de bioacumulación ocurre debido a un incremento de la concentración de los contaminantes por exposición a todas las fuentes posibles: dieta, vías respiratorias, absorción dérmica, mientras que la biomagnificación hace referencia a la bioacumulación provocada exclusivamente por la dieta y se incrementa con la edad (Calamari, 2002).

1.6 Yacaré overo posible centinela de contaminación por xenoestrógenos

1.6.1 Generalidades de la especie

La vasta superficie de humedales y sistemas ribereños de Latinoamérica provee un extenso hábitat y **amplia distribución** para los cocodrílidos que representan un recurso de considerable valor económico y ecológico (figura 2). Dicha distribución permite contar con una adecuada **disponibilidad de**

muestras y gracias al desarrollo de tecnologías de localización es posible realizar una **precisa caracterización geográfica** de la procedencia de las muestras.



Figura 2: Distribución geográfica de *Caiman latirostris* en Latinoamérica. Modificado de www.yacare.net

En Argentina, habitan dos especies de cocodrílidos; el yacaré overo, ñato o de hocico ancho (*Caiman latirostris*) y el yacaré negro (*Caiman yacare*) (Waller y Micucci, 1994). Son reptiles de hábitos anfibios que pasan la mayor parte del tiempo en el agua, donde satisfacen la mayoría de sus requisitos de vida (Freiberg y Carvalho, 1985). Los yacarés son vertebrados poiquilotermos que alcanzan una longitud máxima aproximada de 2,5 m con un peso de 80-90kg. Su coloración general es verde-grisácea con el vientre blanco-amarillento, a veces grisáceo. Particularmente la cabeza del yacaré overo es robusta con un hocico corto y ancho (de ahí el nombre “yacaré ñato” ó “caimán de hocico ancho”) (Prado, 2003) (figura 3).



Figura 3: Fotografía de un ejemplar adulto de *C. latirostris* donde se observan las características de la cabeza (robusta con un hocico corto y ancho) y de la coloración de su piel. Tomado de www.damisela.com/zoo/rep/cocodrilos/overo/index.htm

Con relación a su dieta, el yacaré es depredador oportunista, variando conforme a su crecimiento, época del año y a la oferta de recursos (Santos y col., 1996). Su ingesta alimenticia comienza desde muy temprano, posibilitando de esta manera la **exposición a contaminantes en todas las etapas de su vida**. Los neonatos comienzan a alimentarse, una vez que han reabsorbido los restos del saco vitelino, principalmente de insectos y otros invertebrados que encuentran en las proximidades del nido. 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. Además, depredan sobre pequeños mamíferos, aves, otros reptiles y juveniles de su misma especie ubicándose en una **posición superior en la red trófica** (Prado, 2003).

1.6.2. Biología reproductiva

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

La oviposición es única, con un tamaño de postura de entre 20 y 40 huevos y para una misma zona ocurre en un estrecho margen de tiempo (Larriera, 1995; Piña y col., 1996; Prado, 2003; Verdade; 1995; 2001). Sin embargo, en la naturaleza, sólo un 10% de los animales que nacen, alcanza a cumplir un año, debido a depredaciones y el alto riesgo de muerte por exposición a heladas invernales a una edad temprana (Micucci y Waller, 1995). La estrategia reproductiva de la especie, como en el caso de la mayoría de los reptiles, es producir una frágil, pero abundante descendencia, lo que garantiza que al menos unos pocos individuos lleguen a la adultez.

1.6.3. Distribución geográfica y problemática

Caiman latirostris (yacaré overo) se encuentra ampliamente distribuido en el norte de nuestro país, en una gran diversidad de ambientes relacionados a los sistemas hídricos de las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Formosa, Entre Ríos, Santa Fe, Salta y Jujuy (Micucci y Waller; Prado, 2003; 1995) (figura 4). En este momento, sin embargo, la reducción del hábitat y la explotación no sustentable son factores de riesgo para su supervivencia. En Santa Fe, se distribuye en la llanura de inundación del río Paraná, la cuenca del Salado y la cuenca de los Saladillos (Larriera, 1995). En Entre Ríos, se distribuye en el centro-norte de la provincia, principalmente en los departamentos de La Paz, Feliciano y Federal. Los diferentes “Proyecto Yacaré” que se encuentran en desarrollo en nuestro país (Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Chaco, Formosa) a través de programas de rancheo 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**.



Figura 4: Distribución geográfica de *Caiman latirostris* en Argentina. Modificado de www.yacare.net

La comercialización del cuero y de la carne, permite recompensar económicamente a los lugareños, evitando que los humedales sean drenados. Sin embargo, otra problemática merece ser abordada, estos ambientes acuáticos están amenazados por la contaminación debido a que están expuestos al ingreso directo de contaminantes urbanos y agro-industriales. Para conservar los ambientes acuáticos, es necesario proteger de las cuencas hídricas pues constituyen el depósito para pesticidas lavados desde tierras de cultivo, desechos industriales y urbanos. El desarrollo de modelos biológicos que permiten la detección de contaminantes es una herramienta útil para este fin (Petty y col., 2000). Para ello, es muy útil encontrar indicadores que permiten evidenciar la exposición de los animales, entre ellos cabe destacar que **su determinación sexual es por temperatura**, la cual se demostró que **es influenciada por la presencia de xenoestrógenos** (Stoker y col., 2003).

Para preservar el hábitat y evitar perturbaciones en la aptitud reproductiva del yacaré que influye directamente en la conservación de la especie, debemos implementar medidas que permitan disminuir el riesgo de exposición a contaminantes ya que constituyen especies de un gran **interés e importancia para la región**.

1.6.4. ¿Por qué el yacaré sería un buen centinela?

Algunas características del yacaré apoyan su elección como centinela de

contaminación ambiental por xenoestrógenos:

- Amplia distribución en la región,
- Disponibilidad de muestras y caracterización precisa de su distribución geográfica (por estudios satelitales e *in situ*),
- Posible exposición a contaminantes en todas las etapas de su vida,
- Posición superior en la red trófica,
- Expectativa de vida semejante al humano (que junto a sus hábitos alimenticios permite la bioacumulación y biomagnificación de contaminantes con consecuentes efectos biológicos),
- Cría de ejemplares en cautiverio, identificación y seguimiento en su hábitat natural,
- Determinación sexual por temperatura, influenciada por la presencia de xenoestrógenos,
- Interés e importancia regional.

1.7 Biomarcadores de exposición pre- y/o postnatal a xenoestrógenos

Los estudios de los efectos de la exposición a xenoestrógenos (agroquímicos y desechos urbano-industriales) en el yacaré son de especial interés, no sólo por su impacto en las poblaciones silvestres de yacarés, sino también para complementar la caracterización de la especie como centinela de contaminación por xenoestrógenos y monitor de la salud del ecosistema.

1.7.1 Inducción de Vitelogenina

El creciente conocimiento respecto a la presencia en el ambiente de contaminantes que pueden perturbar al sistema endocrino de animales silvestres, domésticos e incluso de humanos ha incentivado el desarrollo de nuevas metodologías para detectar su presencia y evaluar los efectos en la salud del ecosistema. La vitelogenina (Vtg) es una fosfoglicolipoproteína que se sintetiza normalmente en hembras adultas de vertebrados no mamíferos (Ho, 1987). Es una proteína precursora de la yema del huevo, esencial como fuente de energía metabólica para el embrión en desarrollo. El hígado sintetiza Vtg frente a un estímulo estrogénico. La Vtg es liberada al torrente sanguíneo y

conducida al ovocito en desarrollo, interacciona con los receptores de Vtg en la superficie de los ovocitos y es incorporada por endocitosis mediada por receptor (Opresko y Willey, 1987; Li y col., 2003). Una gran cantidad de Vtg se acumula en los ovocitos en relativamente corto tiempo. La Vtg se almacena dentro de endosomas donde se divide por proteólisis, dando origen a las proteínas nutrientes específicas, principalmente fosvitinas (altamente glicosiladas y ricas en fosfoserina) y lipovitelininas (son lipoproteínas) que serán almacenada en forma de gránulos, como fuente de nutrientes para el embrión en desarrollo (Deeley y col., 1975; LaFleur, 1999; Wallace, 1985) (figura 5).

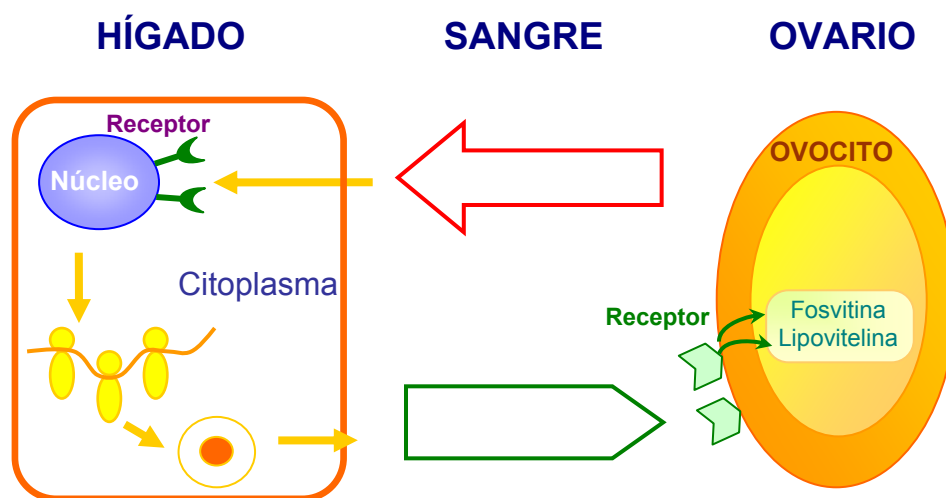


Figura 5: Representación esquemática de la síntesis de vitelogenina en animales ovíparos.

La síntesis, secreción y captura de Vtg se encuentra regulada por varias hormonas del sistema endocrino, principalmente E2 (Carnevali y col., 1992; Duggan y Callard, 2003; Ho y col., 1982; Tata y Smith, 1979). Los niveles de Vtg circulante se encuentran especialmente elevados en hembras adultas durante su período reproductivo, cuando los niveles de estrógenos se mantienen altos. Así, un aumento de la concentración de E2 plasmático observado en primavera promueve el crecimiento folicular inducido por las gonadotropinas, estimulando la síntesis hepática de Vtg. Por el contrario, en períodos no reproductivos, la Vtg se mantiene en niveles prácticamente no detectables (Bon y col., 1997; Guillette y col., 1997; LaFleur, 1999). De esta manera, la detección de Vtg en la estación reproductiva sería de gran relevancia para determinar que hembras estarían en condiciones de

reproducirse ya que las condiciones ambientales y nutricionales condicionan la aptitud reproductiva y no todas las hembras sexualmente maduras son capaces de reproducirse en cada temporada (Guillette y col., 1997).

En aligatores se observó que elevadas concentraciones de E2 son coincidentes con folículos ovulares más grandes (Lance y Bogart, 1992; Guillette y col., 1997). La pared folicular exhibe marcación positiva para la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, asociada con esteroidogénesis activa (Lance, 1989). Además, el tratamiento de aligatores con varios xenoestrógenos estimuló la vitelogénesis hepática y consecuentemente se detectó Vtg circulante (Elsey y Wink, 1986; Guillette y col., 1997).

En machos y en hembras sexualmente inmaduras de especies ovíparas, no ha sido posible detectar niveles circulantes de Vtg probablemente debido a que las concentraciones de estrógenos no son suficientes para desencadenar la activación génica. En estos animales el gen de la Vtg permanece normalmente silencioso, sin embargo, puede activarse por administración de estrógeno exógeno o xenoestrógenos (Jobling y col., 1995; Selcer y col., 2001; Tata y Smith, 1979). Por esta razón, la presencia de Vtg en machos ha sido sugerida como un biomarcador de exposición a xenoestrógenos (Heppell y col., 1995; Jobling y col., 1995; Palmer y col., 1998; Selcer y col., 2001; Sumpter y Jobling, 1995).

En peces macho presentes en cursos hídricos contaminados con xenoestrógenos (pesticidas, desechos de la industria plástica, papelera, surfactantes, etc.) se han detectado valores circulantes de Vtg significativamente elevados (Feist y col., 2005; Sumpter y Jobling, 1995). Del mismo modo, se han realizado estudios en especies de tortugas y anfibios, observándose detección de Vtg por tratamiento con sustancias que presentan actividad estrogénica (Herbst y col., 2003; Irwin y col., 2001; Palmer y col., 1998). Por las razones antes mencionadas, en especies ovíparas, la detección de Vtg sería un excelente biomarcador de exposición postnatal a xenoestrógenos. El desarrollo de métodos sensibles y específicos para la detección de Vtg de yacaré es de fundamental importancia si nuestro objetivo es caracterizar a esta especie como centinela de contaminación por xenoestrógenos.

1.7.2 Peso de los huevos

Los huevos de los vertebrados experimentan una pérdida o ganancia de peso durante la incubación. En aves, estos cambios son provocados principalmente por difusión de agua a través de la cáscara, que depende del tamaño del huevo, la porosidad y espesor de la cáscara, y las condiciones físicas de la incubadora (Ar y Rahn, 1985; Buhr, 1995; De Smit y col., 2005; Hassan y col., 2004; Peebles y col., 1987).

Los criadores de aves mantienen adecuados niveles de humedad en la incubadora controlando la pérdida de peso de los huevos para producir las mejores crías (Buhr, 1995; Hulet y col., 1987). Manolis y col. (1987) sugieren que en los cocodrilidos, las modificaciones en el peso de los huevos durante la incubación son también consecuencia del balance agua-vapor establecido entre los huevos y la incubadora. Los huevos de *Crocodylus porosus* y *Crocodylus johnstoni* son capaces de absorber agua de un ambiente con alto grado de humedad produciendo así huevos hinchados (Webb y col., 1983). En cambio, en un ambiente con menor humedad, los huevos desarrollan espacios de aire entre la membrana corioalantoidea y la cáscara, indicando deshidratación (Ferguson y Joanen, 1983).



Figura 6: Presencia de cámara de aire formada entre la membrana corioalantoidea y la cáscara de un huevo de *Caiman latirostris* (flecha).

Cuando las condiciones de temperatura y humedad están controladas y estables durante la incubación, cualquier variación en el peso de los huevos podría deberse a la influencia de factores diferentes a las condiciones físicas

en la cámara de incubación. Sin embargo, aún se desconoce que factores, ajenos a la humedad y la temperatura, influyen en la variación del peso de los huevos de los cocodrilidos durante la incubación.

Particularmente, aún no se han determinado los efectos de la exposición a perturbadores endocrinos sobre el peso de los huevos. Sin embargo, hemos encontrado alteraciones importantes en este parámetro como consecuencia de la exposición a pesticidas que nos llevaron a proponer esta variable como biomarcador (Beldoménico y col., 2007).

1.7.3 Determinación sexual

En *C. latirostris*, como en varias especies de reptiles, la determinación sexual es dependiente de la temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico del desarrollo embrionario (Pieau y col., 1999; Stoker y col., 2003). Estas especies carecen de cromosomas sexuales distintivos y el sexo se determina durante la organogénesis, a partir de las etapas 20-21 del desarrollo embrionario (Ferguson, 1985; Ferguson y Joanen, 1983; Crain y Guillette, 1998).

Para *C. latirostris*, se han determinado experimentalmente los rangos de temperatura para obtener 100% de animales de un mismo sexo. Así, para esta especie, una temperatura de incubación constante de 33°C produce 100% de machos y una de 30°C produce 100% de hembras (figura 7), coincidentemente con lo observado para *Alligator mississippiensis* (Lang y Andrews, 1994; Stoker y col., 2003).

Sin embargo, la temperatura no es el único factor que afecta la determinación sexual ni la función reproductiva en reptiles. Cuando experimentalmente se administra 17 β -estradiol (E2) a huevos incubados a la temperatura de producción de machos durante el período de determinación sexual dependiente de la temperatura, se obtienen hembras en tortugas, lagartijas, aligatores y yacarés (Crain y Guillette, 1998; Stoker y col., 2003). Además, se observó que si se tratan a huevos de tortuga, de aligatores y de yacarés con xenoestrógenos, la determinación sexual de los machos también puede verse alterada (Crain y col., 1997; Milnes y col., 2005; Stoker y col., 2003; Willingham y Crews, 1999) (figura 7). Si en la naturaleza se provocara este efecto debido a perturbadores endocrinos, se podrían alterar tanto las

poblaciones de machos y hembras como sus capacidades reproductivas. Por esto la reversión sexual en especies con determinación sexual por temperatura, sería un biomarcador de gran relevancia.

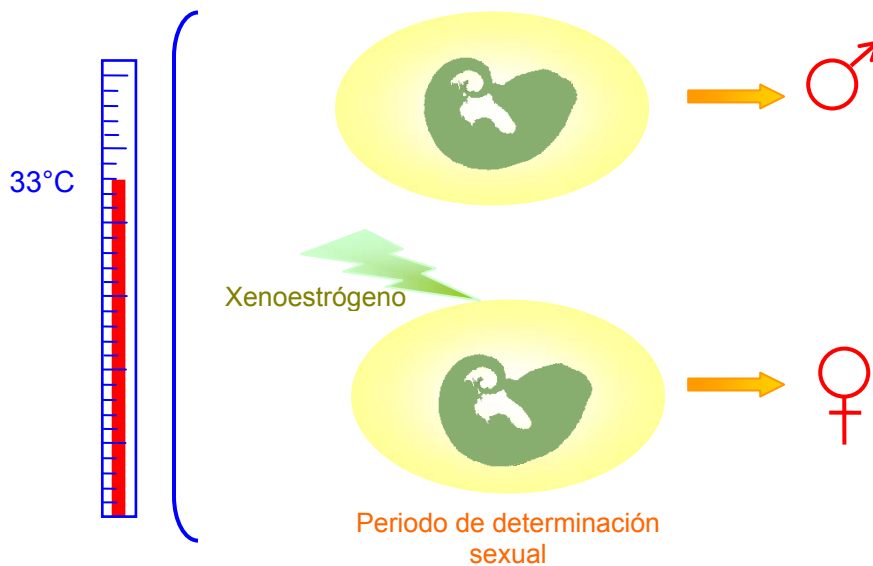


Figura 7: Determinación sexual en huevos incubados a 33°C en condiciones control y en presencia de xenoestrógenos.

1.7.4 Histoarquitectura gonadal

Las características sexuales secundarias y gonadales fueron propuestas como posibles biomarcadores de exposición a partir de los efectos provocados por los perturbadores endocrinos. El estudio de estos biomarcadores es de radical interés debido a las potenciales consecuencias que una perturbación puede ocasionar sobre la reproducción y conservación de las especies. En peces, anfibios y reptiles se observaron alteraciones que incluyen el tamaño, forma e histoarquitectura de órganos sexuales, como lo demuestran los estudios en tortugas (de Solla y col., 1998), peces (Feist y col., 2005; Toft y col., 2003), aligatores y yacarés (Guillette y col., 1995a; Stoker y col., 2003), masculinización de hembras (Sone y col., 2005), feminización de machos (Sharpe, 2006), y hermafroditismo, en sapos (Hayes y col., 2003).

Aligatores nacidos de huevos cosechados en los alrededores de un lago contaminado principalmente con pesticidas xenoestrogénicos, y criados en cautiverio hasta los seis meses de edad, presentaron una morfología gonadal anormal. Las hembras poseían prominentes folículos poliovulares y muchos de los ovocitos eran multinucleados, mientras que ninguna de las hembras del

lago control presentó estas características (Guillette y col, 1994). Resultados similares han sido obtenidos experimentalmente en yacarés, observando un aumento en la incidencia de folículos poliovulares en hembras de 12 meses, tratadas in ovo con E2 y BPA (Stoker, 2004). Asimismo, se obtuvieron resultados análogos en gónadas de hembras producidas por reversión sexual, al tratar huevos incubados a temperatura de machos con 1.4 ppm de E2 y 140 ppm de bisfenol A (Stoker, 2004). Estas observaciones podrían sugerir una menor eficiencia en la reproducción de estos reptiles, ya que se encontró una disminución en la viabilidad de los huevos de aligatores provenientes del lago contaminado. Esto podría deberse en parte, como consecuencia de la mayor frecuencia de folículos poliovulares en las hembras que habitan zonas de alta contaminación (Guillette y Crain, 1996). Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos en ratones, en los cuales se produjeron anomalías morfológicas de los ovocitos y los folículos ováricos al ser tratados con DES o genisteína (Iguchi y col., 1986a y b; 1990; Jefferson y col., 2002; Suzuki y col., 2002). Los folículos poliovulares en ratones pudieron ser estimulados para ovular y luego fertilizados in vivo e in vitro. Sin embargo, el número de óvulos fertilizados provenientes de folículos poliovulares fue significativamente menor que el correspondiente a folículos uniovulares (Iguchi y col., 1990; 1991).

Mayores evidencias de alteraciones gonadales, se observaron en testículos de aligatores machos provenientes de un lago contaminado con pesticidas con actividad estrogénica en Florida (Estados Unidos). Las gónadas se encontraban pobremente organizadas con estructuras aberrantes dentro de los túbulos seminíferos (Guillette y col., 1994). Además, algunas de las células germinales presentaron figuras mitóticas, sugiriendo el comienzo de una espermatogénesis prematura.

Además, en la literatura se encuentran ampliamente estudiados los efectos causados sobre las gónadas y sus consecuencias, debido a la exposición embrionaria a xenoestrógenos (Guillette y col., 2000; Guillette y Gunderson, 2001; Gunderson y col., 2001; Milnes y col., 2006; Stoker y col., 2003). Estos efectos pueden deberse en parte, a la sensibilidad del embrión en desarrollo frente a las señales químicas (Berg y col., 1998). La existencia de períodos críticos durante la organogénesis y la sensibilidad de los procesos de desarrollo a los cambios relativamente breves y transitorios en los niveles de

esteroides endógenos sugieren que la perturbación endocrina durante el desarrollo puede provocar efectos deletéreos a largo plazo sobre la reproducción. En estudios experimentales, se demostraron alteraciones en la determinación sexual, en funciones endocrinas y en las características sexuales secundarias y/o en la anatomía de la gónada de aligatores expuestos in ovo a metabolitos de DDT, trans-nonacoloro, dioxinas y atrazina, que son similares a las encontradas en animales silvestres expuestos a estos compuestos (Crain y col., 1997; 1999; Guillette y col., 2000; Matter y col., 1998).

En la naturaleza, se detectó que peces expuestos a efluentes con actividad estrogénica mostraron gónadas con características tanto de hembras como de machos (Jobling y col., 2002) y morfología testicular alterada (Hashimoto y col., 2000; Nash y col., 2004). Experimentalmente, se observaron los túbulos seminíferos alterados y testículos desorganizados en peces expuestos en endosulfán, que podrían afectar a las espermatídes y espermatozoides y posiblemente tener un impacto negativo en la fertilidad de los machos, perturbando a la población de estos peces afectados (Dutta y col., 2006). Por otro lado, Tavera-Mendoza y col., (2002) demostraron que una exposición atrazina provocó una severa disgénesis gonadal en *Xenopus laevis*. Además, Hayes y col., (2002; 2003) mostraron que una contaminación de atrazina indujo hermafroditismo y un desarrollo gonadal alterado en *Rana pipiens* al exponerlas durante el desarrollo larval.

En base a las evidencias encontradas, se postula que la histoarquitectura y funcionalidad gonadal podrían ser biomarcadores de radical importancia debido a que se encuentran directamente relacionadas a una correcta aptitud reproductiva.

1.7.5 Niveles hormonales

La utilización de la evaluación de los niveles hormonales como biomarcador de exposición a xenoestrógenos, se ha incrementado en los últimos años para una mayor comprensión de los efectos alcanzados por estas sustancias.

1.7.5.1 Función de las hormonas endógenas

Como se menciona previamente, la determinación sexual por temperatura es un fenómeno fisiológico útil para evaluar los efectos de los xenoestrógenos en los vertebrados en desarrollo. En ausencia de los cromosomas sexuales, el desarrollo gonadal es más lábil y los efectos de los contaminantes con actividad hormonal pueden prevalecer sobre la temperatura de incubación. Este incremento de la susceptibilidad de los tejidos en desarrollo plantea un concepto importante donde se relacionan los perturbadores endocrinos y las disfunciones reproductivas, llamado *principio de la organización tisular embrionaria*. La organización de los tejidos durante el desarrollo, conduce a la activación de señales hormonales en la vida adulta (Pickford, 1995). Esta organización se regula a través de niveles hormonales adecuados durante el desarrollo. Una alteración en el funcionamiento hormonal normal durante el desarrollo, puede llevar a organizaciones o funcionamientos anormales de los tejidos en embriones u organismos ya desarrollados (Bern, 1992). La comunicación intercelular, específica de los tejidos es crítica para las funciones hormonales normales y las respuestas de los órganos. Así es como la interacción entre las diferentes poblaciones de células gonadales específicas durante el desarrollo, es responsable de una adecuada función reproductiva durante la madurez sexual. La diferenciación de los tejidos gonadales en testículos y ovarios resulta de arreglos celulares específicos de los órganos que coordinan eventos endocrinos durante el normal funcionamiento y la gametogénesis de animales adultos. El epitelio de los túbulos seminíferos, los espermatocitos y las células de Sertoli, responden a señales hormonales para producir espermatozoides viables. Respuestas celulares similares caracterizan a las células de la Teca, de la granulosa, a la regulación de los ovocitos y a la formación de óvulos (Matter y col., 1998).

Por otro lado, los tejidos pueden encontrarse morfológicamente organizados, pero sin regulaciones bioquímicas apropiadamente establecidas. Una capacidad biosintética y metabólica inadecuadamente constituida durante el desarrollo no podrá funcionar correctamente cuando debería, en la vida adulta. Normalmente, las concentraciones de hormonas endógenas, señalan la activación de respuestas fisiológicas y del comportamiento, adecuadas en organismos postnatales (Matter y col., 1998).

1.7.5.2 Alteración de niveles hormonales por xenoestrógenos

En algunas especies de peces, anfibios y reptiles, las hormonas esteroides juegan un rol fundamental en el desarrollo gonadal (Guillette y Gunderson, 2001). Dada la radical importancia de las hormonas, es posible que los xenoestrógenos influyan en los procesos de determinación sexual en un amplio rango de especies.

Varias especies de la fauna han mostrado anomalías en las concentraciones plasmáticas de hormonas sexuales esteroideas, en la síntesis *in vitro* de hormonas gonadales y en la función de enzimas esteroidogénicas en relación con la presencia de xenoestrógenos introducidos por el hombre en el ambiente (Guillette y col., 1999b; Guillette y Gunderson, 2001). Existen evidencias acerca de alteraciones de las hormonas esteroides plasmáticas en peces expuestos a efluentes de papeleras (Fentress y col., 2006; Van der Kraak y col., 1992), a aguas residuales (Folmar y col., 1996; 2001) y a efluentes industriales (Orlando y col., 1999). Además se observó una disminución de testosterona plasmática en aligatores machos provenientes de un lago contaminado, siendo estos niveles comparable a los de hembras y 3 veces menores en relación a machos de lagos controles (Crain y col., 1997; Guillette y Gunderson, 2001). En aligatores de 6 meses de edad se observó también una reducción de testosterona plasmática en machos, y un incremento de los niveles de E2 en hembras, provenientes del lago contaminado (Guillette y col., 1994). Sin embargo, estos animales presentaron un patrón de esteroidogénesis diferente *in vitro*, obteniendo una disminución de E2 en hembras y un incremento en la síntesis de E2 en machos (Guillette y col., 1995b). El mecanismo por el cual los niveles de hormonas esteroides se ven alterados podría explicarse por modificaciones en el eje hipotálamo-hipofisogonadal, ya sea en la expresión de enzimas esteroidogénicas, o de proteínas transportadoras de esteroides, o en la metabolización por biotransformación hepática (figura 8). Walsh y col. (2000) demostraron que varios pesticidas pueden inhibir la expresión de una proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) en las células de Leydig *in vitro* y en consecuencia inhibe la síntesis de testosterona.

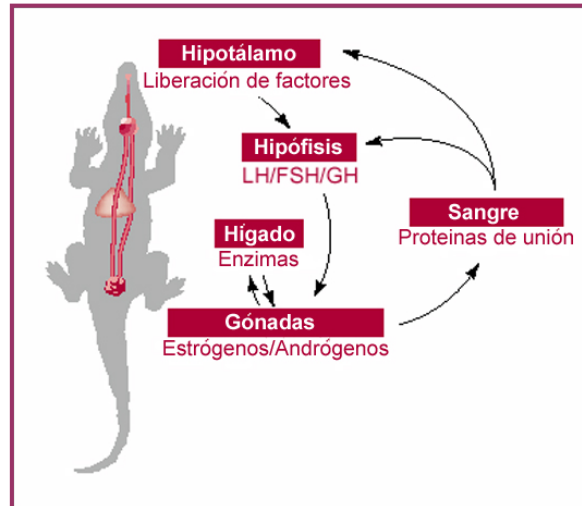


Figura 8: Síntesis, secreción y biodisponibilidad de esteroides sexuales. Identificación de los diferentes niveles posibles blancos de acción de agentes con actividad estrogénica. Modificado de Guillette y Gunderson (2001).

Los biomarcadores que describimos en esta tesis constituirían una herramienta de trascendental importancia para caracterizar al yacaré overo como centinela de contaminación ambiental para nuestra región.

Un claro conocimiento de las condiciones a las que nos encontramos expuestos no sólo permite conocer las posibles consecuencias sobre las poblaciones de los animales y los humanos, sino también que facilitan la toma de decisiones y medidas para un uso racional y adecuado de compuestos químicos y lograr una mejor calidad de vida.