

7. RESUMEN

La exposición a contaminantes ambientales conocidos como perturbadores endocrinos altera el desarrollo y la función del sistema endocrino afectando a especies tan diversas como anfibios, peces, aligatores, roedores y seres humanos. Los perturbadores endocrinos comprenden una gran variedad de compuestos químicos de estructura muy diversa que incluyen hormonas sintéticas y naturales, pesticidas, compuestos utilizados en la industria plástica, y farmacéutica, entre otros. Algunos de los perturbadores endocrinos imitan las acciones de los estrógenos por lo que se denominan xenoestrógenos. Entre las alteraciones reproductivas producidas como consecuencia de la exposición a xenoestrógenos se destacan la reducción en la fertilidad, menor tasa de nacimiento, disminución de la supervivencia de las crías, alteración de los niveles hormonales y del comportamiento sexual de diversos animales.

En nuestro trabajo estudiamos los xenoestrógenos, bisfenol A (BPA), endosulfán y atrazina, a los cuales tanto los animales como los seres humanos estamos expuestos. El BPA es un compuesto ampliamente utilizado en la producción de policarbonatos plásticos y resinas epoxi. Se ha demostrado que el BPA se libera del material del cual forma parte bajo condiciones normales de uso por ruptura del enlace éster formado entre monómeros. El endosulfán es un insecticida organoclorado que en Argentina está siendo utilizado masivamente desde la prohibición total del monocrotofos y es actualmente uno de los insecticidas de elección en cultivos. La atrazina es un herbicida cuya acción inhibe la fotosíntesis. Se utiliza en el control de malezas en agricultura y como herbicida no selectivo en tierras que no se utilizan para cultivo. Luego de exposiciones ambientales o experimentales a BPA, endosulfán o atrazina, se observaron efectos, principalmente de carácter estrogénico, sobre las funciones del sistema endocrino. Además, estos contaminantes se han encontrado en aguas superficiales, sedimentos, leche materna humana y animal, suero y tejido adiposo de mujeres, anfibios y peces, por estas razones representan un riesgo potencial, altamente significativo para los humanos y la vida silvestre. El avance sobre los ambientes naturales para su uso como tierras de cultivo es cada vez mayor en Argentina. Una agricultura en crecimiento trae consigo un incremento en el uso de pesticidas, y de este modo aumenta la exposición de la vida silvestre a compuestos hormonalmente activos. Para el monitoreo de la contaminación ambiental y la evaluación de los

efectos de los contaminantes, es muy importante una adecuada selección de especies centinelas y biomarcadores. El *Caiman latirostris* (yacaré overo) se encuentra ampliamente distribuido en el noroeste de Argentina y está siendo utilizado por programas de rancheo. El yacaré posee características ecológicas y fisiológicas que lo convierten en un posible organismo centinela de exposición a xenoestrógenos. Entre las principales características se pueden mencionar que es una especie ovípara, ubicada en la posición superior de la red alimentaria, la determinación sexual es por temperatura, tiene una expectativa de vida semejante a los humanos lo que permite la bioacumulación de contaminantes, es una especie de hábitos acuáticos y terrestres pudiendo estar expuesta a una gran variedad de contaminantes durante todos los estadios de su vida. Dichas características permiten identificar y seleccionar posibles biomarcadores de exposición a contaminantes con actividad estrogénica. Previamente ha sido descrito que los xenoestrógenos pueden alterar el desarrollo y la histoarquitectura de las gónadas, y los perfiles hormonales, aportando potenciales biomarcadores para evaluar en los *C. latirostris*. La Vtg es una proteína precursora sintetizada en el hígado de vertebrados no mamíferos e inducida por acción de los estrógenos. La detección de Vtg en plasma de los yacarés macho podría ser utilizada como una herramienta muy importante para el monitoreo de exposición a xenoestrógenos ambientales, convirtiéndose en un útil biomarcador de exposición a perturbadores endocrinos.

Hipótesis general: *Caiman latirostris* es una potencial especie centinela de la presencia de perturbadores endocrinos en el ambiente y un indicador directo que efectivamente alerta sobre problemas en la salud del ecosistema.

Objetivo de esta tesis: estudiar los efectos de la exposición a E2, BPA, endosulfán y atrazina sobre posibles blancos de acción estrogénica, de modo de identificar biomarcadores y caracterizar a *C. latirostris* como centinela de contaminación por xenoestrógenos. Para lograr esto, se siguieron los siguientes objetivos específicos:

1. Verificar si en *C. latirostris* se induce Vtg por acción de E2 al igual que en otras especies ovíparas. En caso afirmativo,
 - a. Caracterizar la Vtg de yacaré.

- b. Generar anticuerpos específicos contra Vtg de yacaré para cuantificar sus niveles plasmáticos y determinar el sitio celular y su patrón de expresión.
- c. Caracterizar los anticuerpos anti-Vtg, estudiando reacciones cruzadas con Vtg de otros reptiles silvestres.
- d. Optimizar inmunoensayos tales como dot blot, western blot, ELISA e inmunohistoquímica para monitorear y cuantificar los niveles de Vtg plasmática y tisular.
 2. Identificar órganos blanco y biomarcadores de acción estrogénica en el tracto reproductivo de yacarés.
 3. Describir alteraciones en biomarcadores luego de la exposición *in ovo* a dosis ambientalmente relevantes de BPA, endosulfán y atrazina.
 4. Evaluar los efectos de la exposición *in ovo* a atrazina y endosulfán sobre la determinación sexual.
 5. Evaluar cambios en el crecimiento y desarrollo debido a la exposición pre-natal a BPA, atrazina o endosulfán.
 6. Determinar perfiles de E2 y T para complementar el sexado y/o alertar sobre posibles alteraciones relacionadas con contaminación.
 7. Establecer asociaciones entre los resultados obtenidos para explicar posibles consecuencias de la contaminación ambiental sobre el crecimiento, desarrollo y reproducción de *C. latirostris* y aportar herramientas para un mejor conocimiento de esta especie y nuestro medioambiente.

Materiales y Métodos: Se utilizaron yacarés juveniles para inducir la síntesis de Vtg por tratamiento estrogénico (7 inyecciones consecutivas con 1µg/g de E2). La Vtg se identificó y se purificó del plasma de los animales por precipitación salina seguida de una cromatografía de intercambio iónico. Luego, con la Vtg purificada se inocularon conejos y se obtuvo el suero con anticuerpos anti-Vtg. Se purificó por 2 cromatografías consecutivas de afinidad, obteniendo anticuerpos específicos para Vtg. Se optimizaron técnicas de dot blot para utilizarlo como monitoreo, de western blot para detectar cualitativa y específicamente la proteína, tanto de yacaré como de tortuga y se diseñó un ELISA para cuantificar el contenido de Vtg en diferentes muestras de yacaré. Estas metodologías optimizadas se aplicaron para: detectar Vtg inducida por tratamiento estrogénico en machos yacarés juveniles (1 y 2 dosis de 1µg/g de

E2) y en animales neonatales (1, 2 y 7 dosis de 1µg/g de E2), y determinar Vtg en tortugas silvestres en etapa reproductiva. En las crías tratadas con E2, se evaluó la proliferación epitelial oviductal por inmunohistoquímica y la altura del epitelio del oviducto a través de análisis de imágenes.

Se evaluaron efectos por tratamiento *in ovo* con xenoestrógenos: endosulfán, atrazina y BPA. Se cosecharon huevos de *C. latirostris* de nidos provenientes de humedales situados en zona de baja a moderada intervención antrópica. Los huevos fueron transportados al laboratorio donde se pesaron e incubaron en condiciones controladas de humedad y temperatura (33°C para obtener machos y 30°C para obtener hembras). Llegados a la etapa 20 del desarrollo embrionario, se trataron los huevos por topicación. Los tratamientos aplicados fueron: BPA 1,4 y 140 ppm, E2 0,014 y 1,4 ppm, endosulfán 0,02, 2 y 20 ppm, y atrazina 0,2 ppm. En todos los casos se utilizaron grupos controles negativo (topicación con vehículo -etanol) y positivo (con E2 1,4 ppm). Se continuó con la incubación, se asistió a los nacimientos y a los 10 días de edad las crías se sacrificaron y se determinó el sexo por evaluación macroscópica e histológica de las gónadas. En los machos se determinó el perímetro de los túbulos seminíferos, por análisis de imágenes de cortes histológicos. Se caracterizó la expresión de las proteínas α -actina y desmina en las células mioideas en animales de 10 días y 12 meses de edad, por inmunohistoquímica. Se cuantificó la expresión de desmina a lo largo del perímetro tubular en los yacarés de 10 días. Se evaluó la proliferación intratubular por incorporación de BrdU por inmunohistoquímica y la apoptosis por la técnica de TUNEL.

Por otro lado, se determinaron los perfiles de E2 y T por RIA en animales de diferentes edades en condiciones normales, para luego evaluar los efectos de los xenoestrógenos sobre dichos perfiles a corto plazo (animales de 10 días de edad) y largo plazo (yacarés de 12 meses).

Resultados. La inducción de Vtg luego del tratamiento con E2 fue confirmada en yacarés juveniles macho y hembras. La Vtg de yacaré fue caracterizada como 2 proteínas de 205 y 225 kDa por PAGE-SDS y 395 y 415 kDa PAGE nativo con características fosforiladas. Las proteínas se purificaron y se utilizaron para generar anticuerpos. El anticuerpo obtenido se utilizó satisfactoriamente en la optimización y desarrollo de dot blot, western blot, ELISA e inmunohistoquímica, mostrando alta sensibilidad y especificidad.

Además, el anticuerpo generado mostró un reconocimiento específico de Vtg en tortugas acuáticas tratadas con E2 y adultas en etapa reproductiva. Logramos inducir y cuantificar Vtg en machos juveniles tratados con E2 y en crías sometidos a los diferentes protocolos de tratamiento. En los machos, observamos un aumento de la síntesis proteica que se debió principalmente, a expensas de Vtg y determinamos que no sólo una primera exposición a E2 indujo Vtg, sino que una nueva dosis provocó una inducción altamente significativa respecto a la primera (efecto de cebado). En las crías observamos que todos los tratamientos indujeron la síntesis de Vtg en forma creciente con las dosis, sin detectar el efecto de cebado observado en los machos juveniles. Además de inducir de Vtg, observamos que en el oviducto de crías hembra, la altura del epitelio y la proliferación celular, mostraron ser biomarcadores adecuados de exposición postnatal a agentes estrogénicos, evidenciando un aumento significativo de su respuesta luego del tratamiento con E2.

La exposición prenatal a 2 y 20 ppm de endosulfán y a atrazina indujeron pérdidas de peso fraccional significativamente superiores a los controles y además, en estos grupos se obtuvieron las crías más pequeñas.

A diferencia de los resultados obtenidos previamente con BPA 140 ppm y E2 1,4 ppm, todas las crías provenientes de huevos incubados a 33°C fueron machos, mostrando ausencia de reversión sexual causada por atrazina y endosulfán a las dosis aplicadas.

Los testículos de los machos de 10 días de edad, que recibieron 20 ppm de endosulfán y atrazina exhibieron una histoarquitectura alterada con un aumento significativo del perímetro de los túbulos seminíferos. Para conocer la causa de esta perturbación tubular, estudiamos la expresión de las proteínas α -actina y desmina en las células mioides peritubulares a los 10 días y 12 meses. En ambas edades, las células mioides expresaron desmina mientras que no hubo expresión de α -actina, probablemente debido a una falta madurez funcional. Los túbulos que presentaron alteraciones poseían menor porcentaje de expresión de desmina relativa al perímetro tubular. Con el objeto de determinar si la pérdida de la continuidad observada en la distribución de las células mioides y el incremento en el perímetro tubular fue causado por un aumento en el número de células intratubulares, se evaluó la actividad proliferativa. No observamos diferencias significativas en el porcentaje de

células en proliferación dentro de los túbulos seminíferos entre los diferentes grupos experimentales, así como tampoco una alteración en la muerte celular programada, lo que sugiere el mantenimiento de un balance adecuado en el recambio celular.

Se evaluaron los niveles de E2 y T en machos y hembras de diferentes edades en animales controles mantenidos en cautiverio. Como fuera esperado, los machos y las hembras presentaron diferentes perfiles de las hormonas esteroides. En animales neonatales, expuestos *in ovo* a los pesticidas o BPA, se observó una disminución significativa de los niveles de T, mientras que no se detectaron variaciones en los niveles de E2. Las hembras obtenidas por reversión sexual (ya sea por tratamiento con BPA o con E2) poseían niveles de las hormonas esteroides evaluadas, similares a las de las hembras controles tanto a los 10 días como a los 12 meses de edad.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron concluir que:

13. Los machos y las hembras *Caiman latirostris*, al igual otras especies ovíparas, son capaces de sintetizar Vtg en respuesta a la acción estrogénica, lo que fue confirmado en animales juveniles y neonatales.

14. Las metodologías optimizadas en el presente trabajo permitieron caracterizar Vtg como biomarcador de exposición postnatal a agentes con actividad estrogénica.

15. El anticuerpo generado y las técnicas optimizadas permitieron medir los niveles plasmáticos e identificar la síntesis de Vtg, no sólo en yacarés sino también en otras especies de reptiles de nuestra región como las tortugas acuáticas *Phrynops hilarii* y *Trachemys scripta*.

16. El oviducto y los testículos son órganos blanco de acción estrogénica en hembras y machos, respectivamente.

17. Modificaciones en la histoarquitectura del oviducto, tales como la altura del epitelio y la proliferación celular, pueden utilizarse como biomarcadores de acción estrogénica.

18. Cambios en el perímetro de los túbulos seminíferos y alteraciones en el patrón de distribución de las células mioideas, fueron identificadas como biomarcadores de la exposición *in ovo* a xenoestrógenos.

19. La exposición *in ovo* a endosulfán y atrazina (pesticidas de uso actual), en el período inmediatamente previo a la ventana de determinación sexual, produjo mayores pérdidas en el peso fraccional de los huevos durante la incubación y se obtuvieron crías más pequeñas. Las crías más pequeñas poseerían menores posibilidades de supervivencia durante las primeras semanas de vida. Esto podría tener un impacto significativo sobre la dinámica de las poblaciones de yacarés.

20. La exposición prenatal a endosulfán o atrazina provocaron alteraciones en la histarquitectura gonadal de los machos, sin modificar el patrón de determinación sexual establecido por la temperatura.

21. Los niveles circulantes de E2 y T muestran patrones característicos para machos y hembras (evaluados en el período estival desde neonatos hasta juveniles, 5-6 años).

22. Los niveles de E2 y T fueron similares entre de las hembras producidas por temperatura y las obtenidas por reversión sexual, por lo tanto no es posible distinguir ambos grupos de hembras por los niveles hormonales.

23. Los yacarés expuestos *in ovo* a xenoestrógenos evidenciaron menores niveles de T, incluso luego de un año de finalizada dicha exposición, por lo tanto, la concentración sérica de T podría utilizarse como biomarcador de exposición a estrógenos ambientales.

Finalmente, podemos decir que los biomarcadores evaluados resultaron herramientas útiles para determinar actividad estrogénica *in vivo*. Los estudios realizados en esta tesis permiten mejorar el conocimiento de la biología reproductiva del yacaré y caracterizar biomarcadores para monitorear exposición a xenoestrógenos en diferentes momentos de la vida de los caimanes. Las evidencias obtenidas apoyan la utilidad de *Caiman latirostris* como centinela de contaminación por xenoestrógenos.