

3.3 Determinación de biomarcadores de exposición prenatal a contaminantes.

3.3.1 Animales.

Para la caracterización de los perfiles hormonales de *C. latirostris* juveniles, se utilizaron animales de diferentes edades provistos por la reserva natural El Cachapé (Chaco, Refugio de Vida Silvestre El Cachapé; <http://www.vidasilvestre.org.ar/refugios/cachape.asp>) que fueron criados y mantenidos en invernáculos situados en la reserva (figura 18).



Figura 18: Ejemplares de *C. latirostris* en un invernáculo del refugio El Cachapé, Reserva Vida Silvestre, Chaco.

Además para esta determinación también se emplearon crías provenientes de huevos incubados en el laboratorio. Las características de los animales empleados para obtener los perfiles hormonales, se muestran en las siguientes tablas:

Tabla N°9: Características de los machos *C. latirostris*.

Edad	Peso (g)	Longitud total (cm)	Longitud hocico-cloaca (cm)
10 días	48,5 ± 6,2	23,6 ± 1,1	11,3 ± 0,7
12 meses	971,7 ± 382,4	63,9 ± 6,6	31,5 ± 3,3
18 meses	1315,0 ± 530,0	71,0 ± 8,8	34,4 ± 3,7
5-6 años	4385,7 ± 679,2	104,6 ± 3,4	51,1 ± 1,6

Tabla N°10: Características de las hembras *C. latirostris*.

Edad	Peso (g)	Longitud total (cm)	Longitud hocico-cloaca (cm)
10 días	50,3 ± 6,5	24,1 ± 0,6	11,4 ± 0,5
12 meses	666,7 ± 157,1	58,7 ± 4,2	28,4 ± 2,0
18 meses	1350,0 ± 565,7	72,1 ± 8,6	34,9 ± 3,7
5-6 años	4237,9 ± 633,3	101,2 ± 5,7	49,4 ± 2,2

Para determinar biomarcadores de exposición a contaminantes en forma prenatal, se cosecharon huevos de *C. latirostris* en el marco de programas de rancheo de los Proyectos Yacaré de las provincias de Santa Fe, Chaco y Entre Ríos (Argentina). Los huevos se cosecharon de 9 nidos de las 3 provincias: en las zonas del Fisco, los Palmares de Paiva y San Javier ($\cong 30^{\circ}\text{S}$; 60°W , Santa Fe); El Cachapé, La Eduvigis ($26^{\circ} 51'\text{S}$; $58^{\circ} 56'\text{W}$ y $26^{\circ} 48'\text{S}$; $59^{\circ} 02'\text{W}$; Chaco); San Víctor, Feliciano y Federal ($30^{\circ} 26'\text{S}$, $59^{\circ} 01'\text{W}$; $30^{\circ} 33'\text{S}$, $58^{\circ} 59'\text{W}$; $30^{\circ} 36'\text{S}$, $58^{\circ} 46'\text{W}$; $30^{\circ} 34'\text{S}$, $58^{\circ} 54'\text{W}$; Entre Ríos) durante las estaciones reproductivas de los años 2002, 2004, y 2005 (diciembre y enero). Se eligieron nidos de humedales situados en una reserva natural, o aguas arriba de zonas urbanizadas o áreas de agricultura. De esta manera se minimizó la exposición de los nidos seleccionados a efluentes urbanos o a derivados de agricultura/ganadería. Las zonas de recolección se clasificaron según su grado de intervención antrópica. Se consideraron zonas de bajo a moderado grado de intervención a aquellas que se encontraron entre 5 a 15 km de áreas de agricultura y la zona de baja intervención se consideró aquella, perteneciente a una reserva natural alejada a más de 15 km de zonas de agricultura o urbanizadas.

Los huevos fueron cosechados dentro de los primeros estadios embrionarios, determinados y caracterizados bajo lupa, según trabajos previos en nuestro laboratorio (Stoker, 2004). Antes de ser removidos del nido, la superficie superior de los huevos fue marcada con lápiz de grafito para mantener la misma orientación que tenían en el nido, durante el traslado y la incubación en condiciones de laboratorio. Esto último evita la muerte embrionaria provocada por desprendimiento del embrión de las membranas internas de la cáscara (Ferguson, 1985). Los huevos fueron distribuidos al azar

en dos grupos: la mitad de cada nido se incubó a temperatura constante de 30°C y la otra mitad a 33°C. Para el traslado, los huevos se colocaron en la posición adecuada en un recipiente conteniendo material de nido (pasto y follaje) que evitó el exceso de vibraciones (figura 19). Una vez en el laboratorio se registró el número de huevos por nido y el peso de cada uno.

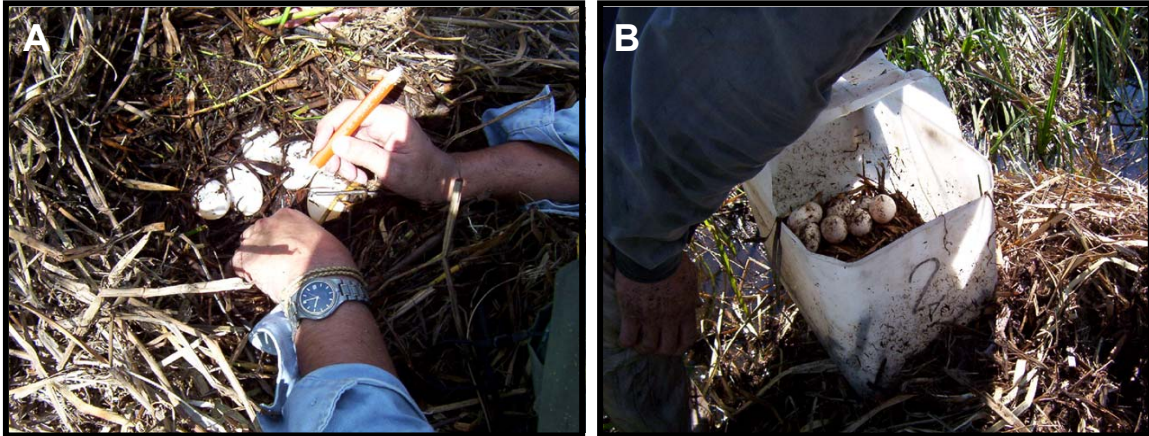


Figura 19: Cosecha de huevos a campo. **A:** Marcación de los huevos con lápiz de grafito de manera de preservar la ubicación original dentro del nido. **B:** Recipiente para el traslado de los huevos

3.3.2 Procedimiento para la incubación de los huevos.

Los huevos se ubicaron en incubadoras, con condiciones de temperatura y humedad controladas. Para la construcción de las incubadoras no se utilizaron materiales plásticos ni orgánicos (material de nido), evitando el posible aporte de xeno o fitoestrógenos durante la incubación.

Las incubadoras consistieron en recipientes de vidrio de 80cm x 50cm x 40cm con 20cm de agua corriente en su interior que otorga la humedad necesaria al ambiente y se recubrieron de material aislante. En el interior de las incubadoras, los huevos se colocaron sobre una bandeja de alambre galvanizado, sostenida por pilares de vidrio, con cinco carriles para separar los huevos correspondientes a los diferentes grupos experimentales. En la base de cada incubadora, se colocaron tres aclimatadores automáticos regulados por un termostato, cuyo sensor estaba sumergido a dos centímetros por debajo de la superficie de agua (figura 20).

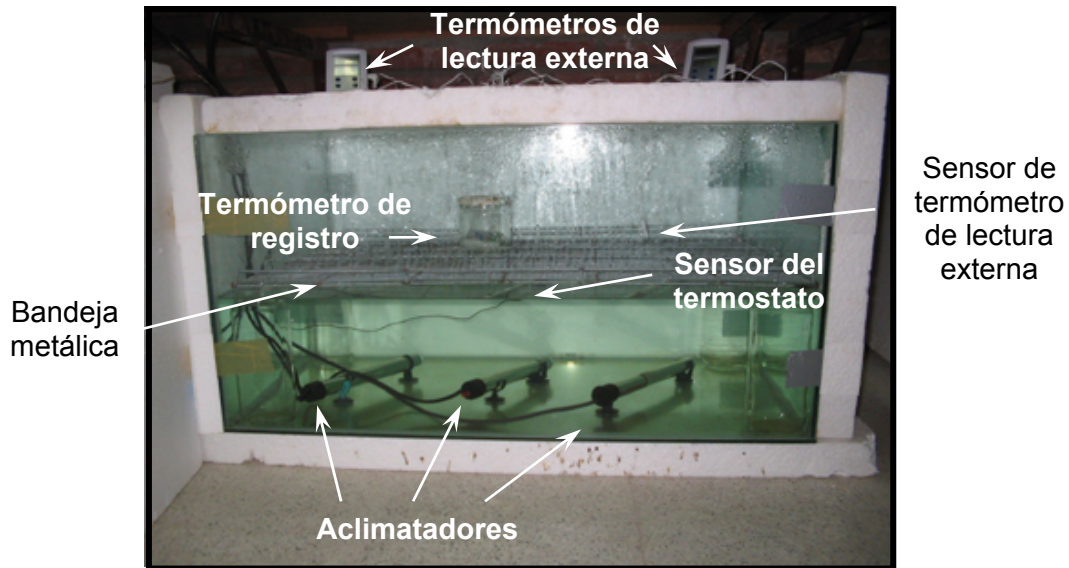


Figura 20: Incubadora con el instrumental requerido para mantener la temperatura y humedad constantes.

La temperatura se registró simultáneamente por un termómetro de lectura externa (Alla[®]) cuyo sensor de temperatura se colocó dentro de la incubadora a la altura de los huevos y un termómetro de registro de datos (Boxcar[®] for Windows Versión 3.6.0.6 Onset Computer Corp. Copyright 1999) colocado en la incubadora y a la altura de los huevos. Este sistema es más sensible que el anterior y se programó para tomar datos de temperatura cada 10 minutos hasta la estabilización de la temperatura y luego en rangos más amplios hasta el momento del nacimiento de las crías. El registro de temperaturas se realizó cada 48h aproximadamente al comienzo y una vez por semana luego de la estabilización de la temperatura. La humedad fue controlada a través de un humidímetro (Alla[®]).

Aproximadamente 30 días antes de la cosecha de los huevos se optimizaron las incubadoras encendiendo el sistema, controlando la temperatura y regulando los termostatos hasta llegar a la estabilidad en las temperaturas deseadas. Una de las incubadoras se estabilizó a 33°C, temperatura a la cual se obtienen 100% machos bajo condiciones normales. Otra incubadora se estabilizó a 30°C que es la temperatura óptima para la obtención de 100% hembras (figura 21).

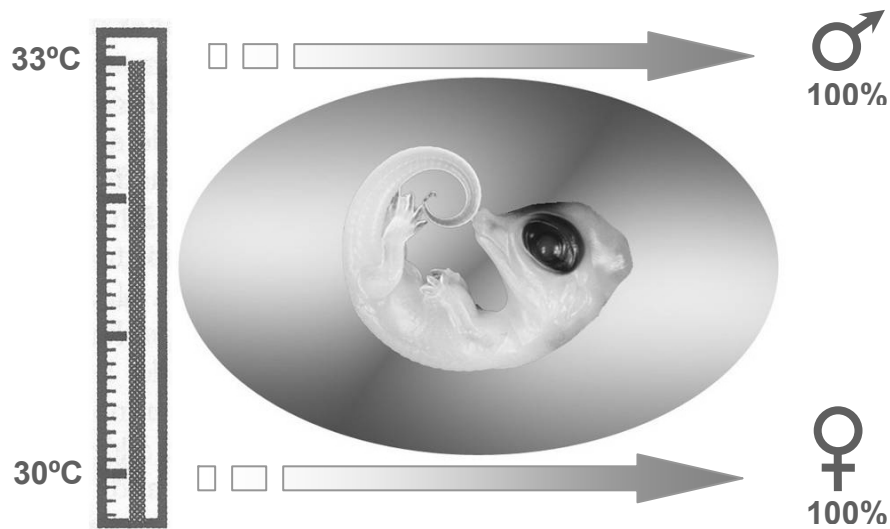


Figura 21: Representación esquemática de la determinación sexual en *C. latirostris*. La incubación de huevos a 33°C, bajo condiciones normales produce el 100% de machos, mientras que a 30°C se obtienen el 100% de hembras.

3.3.3 Determinación de estadios embrionarios

Una vez cosechados los huevos, se determinó el estadio de desarrollo en el cual se encontraban los embriones al momento de la recolección, en base a criterios establecidos previamente en nuestro laboratorio (Stoker y col., 2003; Stoker, 2004). Los parámetros principales para determinar las etapas fueron el tamaño y las características morfológicas de los miembros. Así, se identificó con precisión la etapa 20 del desarrollo en *C. latirostris* que corresponde estadio inmediatamente previo al comienzo del período de ventana de sensibilidad a la temperatura para la determinación del sexo (Lang y Andrews, 1994; Ferguson, 1985; Stoker y col., 2003). Además, resultados previos de nuestro laboratorio y de otros autores han demostrado que es un momento particularmente sensible a la acción de perturbadores endocrinos (Guillette y col., 2000; Stoker y col., 2003). Es importante destacar que la determinación de los estadios embrionarios se realizó para las dos temperaturas de incubación seleccionadas (figura 22).



Figura 22: Apertura de huevos de *C. latirostris* para determinar el estadio embrionario. **A:** Corte inicial en un extremo para eliminar exceso de fluido corioalantodeo y comprobar la posición de embrión. **B:** Completa apertura del huevo. **C:** Embrión dentro del huevo, observar la marcada irrigación sanguínea.

En la etapa 20, el embrión mide aproximadamente 30 mm (eje mayor del animal plegado). Las uñas primordiales se presentan en los tres dígitos del medio de miembros superiores e inferiores y las aperturas interdigitales se extienden aproximadamente un cuarto a lo largo de los dedos. Se completa el desarrollo de los maxilares alcanzando la misma relación entre ambos que presentará a su nacimiento. El embrión en esta etapa posee una coloración blanca propia del proceso de osificación a lo largo de los márgenes de ambos maxilares, alrededor de los meatos auditivos externos y dentro de los elementos proximales y distales de los miembros. Además, presenta una formación marcada de escamas en el dorso y se comienzan a observar los escudillos en la región del cuello (Stoker, 2004). En este estadio de desarrollo se realizó la topicación de los huevos (figura 23).

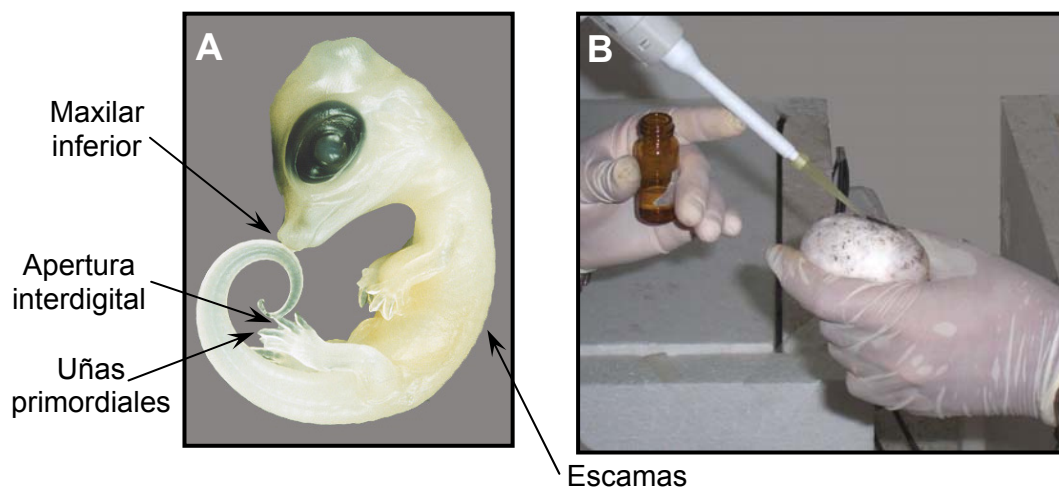


Figura 23: **A:** Embrión *C. latirostris* en etapa 20 de desarrollo. **B:** Tratamiento de los huevos por topicación.

3.3.4 Diseño de los tratamientos *in ovo*.

Todos los tratamientos en los huevos fueron aplicados en forma tópica sobre la cáscara (Crews y col., 1991) en la zona donde se inicia la denominada “banda opaca” correspondiente a la zona de mayor irrigación y de poros más grandes (Ferguson, 1985) (figura 23B). Los tratamientos se realizaron en un volumen final promedio de 50 μ l utilizando etanol absoluto como vehículo (Crain y col., 1997; 1999). Para una correcta administración de la dosis seleccionada para cada tratamiento se tuvo en cuenta el peso individual de los huevos y se ajustó el volumen de solución de topicación de manera tal que todos los huevos recibieran la misma dosis de tratamiento.

3.3.4.1 Exposición prenatal a un xenoestrógeno de uso industrial: Bisfenol A.

En la estación reproductiva del año 2002 se utilizaron 5 nidos (n=175 huevos) cosechados en la provincia de Santa Fe, que fueron distribuidos al azar e incubados a 30°C o 33°C. En cada grupo de incubación, los huevos fueron equitativamente distribuidos en seis grupos experimentales (tabla 11).

Tabla 11: Esquema de topicación de tratamientos en huevos *C. latirostris* en etapa 20 de desarrollo embrionario.

Grupo experimental	Distribución de nidos (N)				
	N1	N2	N3	N4	N5
Control sin tratamiento	N1	N2	N3	N4	N5
Control vehículo, etanol	N1	N2	N3	N4	N5
E2 0,014 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
E2 1,4 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
BPA 1,4 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
BPA 140 ppm	N1	N2	N3	N4	N5

En cada incubadora (30 y 33°C) se colocaron como mínimo 15 huevos por grupo experimental pertenecientes a nidos diferentes. Los huevos correspondientes al grupo control fueron tratados con vehículo (50 μ l etanol), mientras que los huevos correspondientes a los grupos de tratamiento, recibieron 0,014 o 1,4 ppm de E2 (Sigma) o 1,4 o 140 ppm de BPA (Aldrich, Milwaukee, WI, USA).

Las muestras obtenidas en esta temporada forman parte de un trabajo más extenso realizado en nuestro laboratorio (Stoker, 2004).

3.3.4.2 Exposición prenatal a agroquímicos: Endosulfán y Atrazina

En la temporada del año 2004 se cosecharon huevos de 3 nidos (n=109) provenientes de la provincia de Chaco. Lamentablemente uno de los nidos se descartó por resultar en huevos inviables, probablemente la causa podría deberse a que el nido se encontraba con un exceso de agua sobre un embalsado. En esta estación reproductiva se trabajó con un total de 72 huevos.

En la siguiente temporada (2005) se colectaron huevos de 2 nidos (n=64) de la provincia de Entre Ríos.

El esquema de tratamiento para ambas temporadas fue el mismo (tabla 12).

Tabla 12: Tratamiento de huevos *C. latirostris* en etapa 20 de desarrollo embrionario

Grupo experimental	Distribución de nidos (N)				
	N1	N2	N3	N4	N5
Control vehículo, etanol	N1	N2	N3	N4	N5
Control positivo, E2 1,4 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
Endosulfán 0,02 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
Endosulfán 2 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
Endosulfán 20 ppm	N1	N2	N3	N4	N5
Atrazina 0,2 ppm	N1	N2	N3	N4	N5

Se distribuyeron en forma aleatoria los huevos en las dos incubadoras (30°C y 33°C) y equitativamente en cada grupo de tratamiento. A medida que fueron distribuyéndose en los grupos, los huevos fueron pesados para registrar el peso inicial de los mismos.

Los huevos correspondientes al grupo control negativo fueron tratados con vehículo (50 µl etanol absoluto); en el grupo control positivo, se trataron con 1,4 ppm de E2 (dosis en la que previamente se determinó reversión sexual), mientras que los huevos correspondientes a los grupos de tratamiento recibieron 0,02; 2 y 20 ppm de endosulfán (Icona SA, Buenos Aires, Argentina) y 0,2 ppm de atrazina (Icona).

3.3.5 Nacimiento de las crías. Identificación, caracterización y mantenimiento.

El día del nacimiento de las crías de yacaré, los huevos se pesaron, para luego calcular la pérdida de peso fraccional de los huevos, representada como PPF: $[(\text{peso inicial del huevo} - \text{peso final del huevo})/\text{peso inicial}] * 100$.

El nacimiento de la primera cría de cada nido en cada incubadora, fue asistido luego de escuchar el llamado de la cría o percibir su movimiento dentro del huevo y se tomó como día de nacimiento para todo el nido provocando el nacimiento de los demás animales. Las crías fueron identificadas individualmente, pesadas y medidas. Se registró el largo total (LT) desde la punta del hocico hasta la punta de la cola, y el largo desde el hocico hasta la cloaca (LHC). Con el peso de las crías al nacer y el de los huevos, se calculó el peso fraccional de las crías como PFC: $[\text{peso cría}/\text{peso inicial del huevo}] * 100$.

Los animales que serían sacrificados a los 10 días de edad fueron mantenidos en un habitáculo de vidrio en cuyo interior se colocó agua y una rampa de vidrio que permitió que los animales tuvieran acceso a un sector seco y a otro con agua. Como fuente de calor se colocó un calefactor cuyo termostato se fijó a 30°C aproximadamente. Durante este período, no fue necesario alimentar a los pichones ya que a esa edad aún poseen vitelo para consumo como fuente de alimentación.

3.3.6 Obtención de muestras.

Los animales de 10 días fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma, 6mg/100g de peso) 2 h antes del sacrificio (realizado por decapitación). La BrdU, es un análogo de la timidina que se incorpora a la hebra de ADN en la fase S del ciclo celular. Luego del sacrificio se colecta la sangre para obtener suero por centrifugación y se extrae el complejo GAM junto a sus ductos sexuales como se describió en el punto 3.1.9. El complejo GAM, se sumerge en formol buffer y se continúa con el procesado de rutina hasta su inclusión en parafina.

En los yacarés de 12 y 18 meses se registró el peso, LT, LHC y el sexo, y se tomaron muestras de sangre del seno occipital para luego obtener suero por centrifugación.

3.3.7 Determinación del sexo.

3.3.7.1 Sexado por evaluación macroscópica de genitales internos.

La observación de los genitales internos se realizó en el momento de la cirugía de los yacarés de 10 días de edad teniendo en cuenta la presencia o ausencia del oviducto, textura, coloración y estructura del complejo GAM.

En la figura 24 se muestran los complejos GAM de machos y de hembras. En ambos sexos, los complejos GAM son órganos pares siendo el complejo derecho más alargado que el izquierdo. En los machos, cada gónada forma una estructura cilíndrica alargada adyacente a la glándula adrenal. En las hembras, en cambio, la corteza ovárica envuelve por delante el cuarto craneal de la glándula adrenal formando una única estructura homogénea. El color y la textura del complejo GAM también son diferentes en ambos sexos, esta característica también ayuda en la diferenciación. Los ovarios presentaron textura rugosa y color rojizo, mientras que los testículos se observaron como estructuras claras y de superficie lisa. La presencia de los oviductos, que recorren todo el margen dorso-lateral de las gónadas de las hembras, es otra característica que facilita el diagnóstico macroscópico del sexo (figura 24A). En los machos se observa la ausencia de los oviductos y la presencia de los ductos deferentes que nacen del extremo caudal del complejo GAM (figura 24B). El diagnóstico macroscópico siempre fue confirmado por examen histológico de las gónadas.

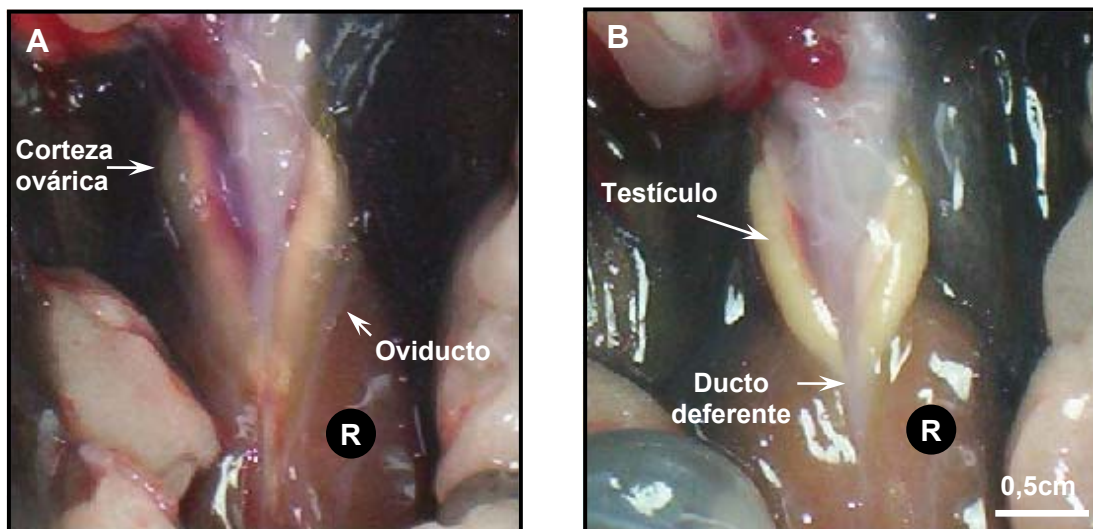


Figura 24: Genitales internos de hembra y macho en *C. latirostris* de 10 días de edad. En **A** se observan los oviductos y los complejos GAM de una hembra que se diferencian por su forma y color del GAM del macho (**B**). En ambos sexos el complejo GAM se encuentra apoyado en su región caudal sobre los riñones (R).

3.3.7.2 Sexado por evaluación histológica de genitales internos.

En cada gónada fijada, procesada e incluida en parafina, se realizaron cortes histológicos transversales en los cuales se identificaron las estructuras que permitieron definir el sexo luego de la coloración con Picrosirius-hematoxilina (Stoker, 2004). Estas características en las hembras fueron: presencia del oviducto, desarrollo de la corteza ovárica y atrofia de la médula. En los machos: ausencia del oviducto, desarrollo de túbulos seminíferos en la médula y atrofia de la corteza (Pieau, 1999).

El complejo GAM de la hembra consiste en tejido adrenal, corteza y médula ovárica, asociados al mesonefros. Los oviductos se unen dorsolateralmente a la gónada por el mesosalpinx (figura 25A).

En el macho, el complejo GAM es una asociación de tejido adrenal, testículos y mesonefros. En el testículo, la corteza se ha atrofiado totalmente y no se distingue en el corte histológico. Los machos carecen de oviducto o presentan vestigios de ducto de Müller (figura 25B).

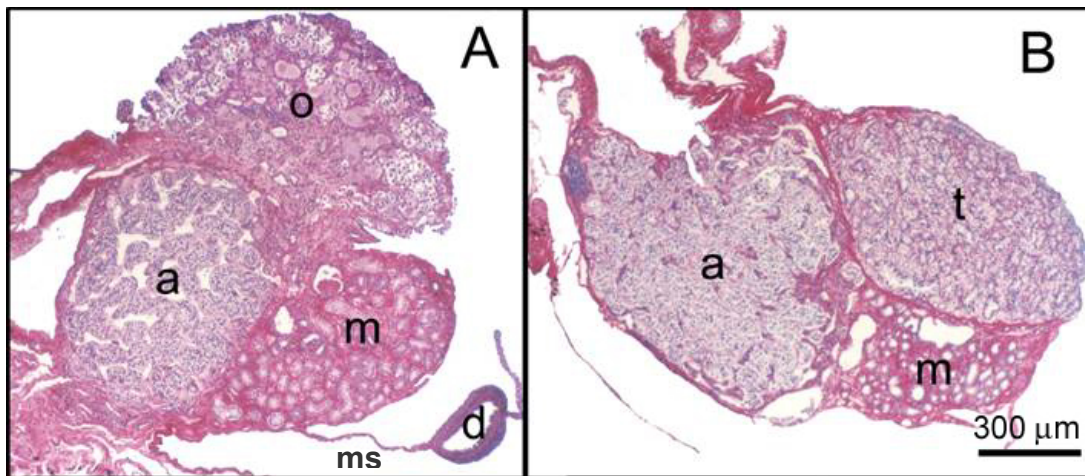


Figura 25: Microfotografías a bajo aumento de complejos GAM de crías *C. latirostris*. **A:** Hembra control de 10 días de edad, donde se distinguen ovario (o), mesonefros (m), adrenal (a), oviducto (d) y mesosalpinx (ms). **B:** Macho control de 10 días de edad, se distinguen: testículo (t), adrenal (a) y mesonefros (m). Cortes transversales teñidos con Picrosirius-hematoxilina.

3.3.7.3 Sexado por evaluación macroscópica de genitales externos.

La identificación del sexo por inspección de los genitales externos se realizó en yacarés juveniles mediante la separación de los límites de la cloaca con fórceps para lograr la extrusión de la estructura fálica. Los animales fueron

clasificados como machos o hembras en base al tamaño y la coloración del clítoris-pene, para esto se tomó el criterio descrito para aligatores por Guillette y col. (1996), validado en yacarés (Stoker y col., 2003).

3.3.8 Evaluación de histoarquitectura gonadal de machos.

3.3.8.1 Morfometría de los testículos.

En imágenes digitalizadas de cortes histológicos de testículos teñidos con Picrosirius-hematoxilina obtenidos a partir de animales de 10 días de edad, se midió el perímetro de los túbulos seminíferos utilizando el sistema Image Pro-Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Se analizaron 3 cortes histológicos de complejo GAM a diferentes profundidades (espaciadas cada 150 μm), cada una de estas profundidades se realizó por duplicado. Usando objetivo de 20X se digitalizaron campos microscópicos abarcando toda la muestra. Las imágenes fueron tomadas tal como se describe en el punto 3.2.1. Los túbulos seminíferos fueron definidos manualmente en la pantalla como se muestra en la figura 26. Los parámetros fueron medidos en secuencias automáticas generadas por el analizador.

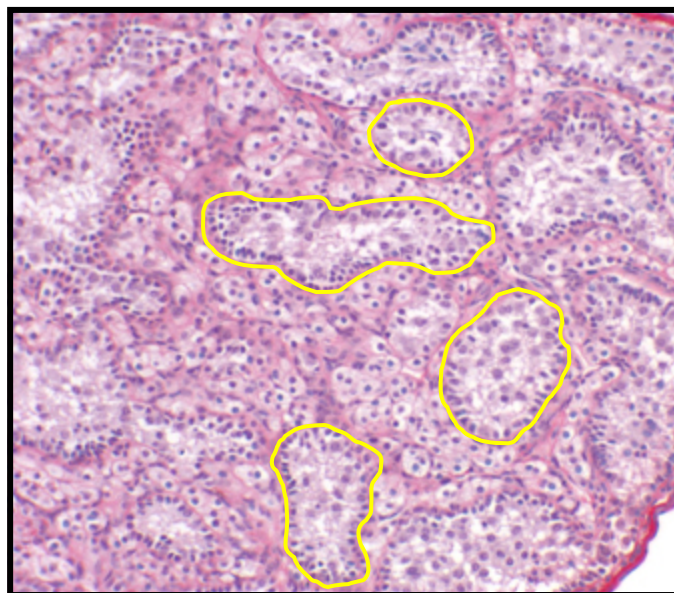


Figura 26: Delimitación del perímetro de los túbulos seminíferos (líneas amarillas) en una imagen digitalizada de un corte histológico de testículo de cría *C. latirostris*, utilizando el sistema Image Pro-Plus. Coloración: Picrosirius-Hematoxilina. Magnificación: 200X.

Utilizando la misma metodología de análisis de imágenes, se evaluó el área estromal. Para ello, se determinó el área ocupada por el testículo sobre imágenes digitalizadas con objetivo de 4X, y el área comprendida por la totalidad de los túbulos seminíferos en el corte histológico, a través de la delimitación manual de las estructuras de interés. El área estromal se obtuvo como la diferencia entre el área total del testículo en el corte histológico y el área ocupada por los túbulos seminíferos. A esta área también se la denominó área intersticial.

3.3.8.2 Caracterización de las células mioides.

Se caracterizaron las células estromales que rodean al túbulo seminífero a través de la expresión de proteínas del citoplasma celular: desmina y actina. La desmina es una proteína que compone los filamentos intermedios y la actina forma parte de los microfilamentos, ambas constituyen el sistema de fibras del citoesqueleto. Normalmente la desmina se encuentra en células musculares y es responsable de estabilizar los sarcómeros del músculo contráctil. La actina es una abundante proteína estructural que interactúa con otras. Cumple un rol fundamental en la contracción muscular y el movimiento celular, entre otras funciones. El monómero globular polimeriza para formar los filamentos de actina, que en células musculares interactúan con miosina durante la contracción.

Para la detección de ambas proteínas se realizó la técnica inmunohistoquímica descrita en el punto 3.1.10, modificando la recuperación antigénica donde el efecto de microondas fue más leve (3 min. a 100% sin colocar las muestras, luego, colocando las muestras, 1 min a 100%, 14 min. a 40% y 20 min. apagado). Las condiciones de uso de los anticuerpos contra estas proteínas se detallan en el siguiente cuadro:

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Sistema de revelado
Anti-desmina, clon Der-11 (Novocastra)	1/50	Anti-ratón biotinilado (Sigma) diluido 1/80 y un complejo avidina-peroxidasa, generado en nuestro laboratorio
Anti- α actina, clon α -SM1 (Novocastra)	1/50	Anti-ratón biotinilado (Sigma) diluido 1/130, seguido de estreptavidina-peroxidasa 1/150

3.3.8.3 Evaluación del “turnover” celular (proliferación/apoptosis)

Para llevar a cabo esta evaluación se realizó un estudio del balance entre la proliferación celular y la muerte celular programada o apoptosis, como indicativo del recambio celular dentro de los túbulos seminíferos.

3.3.8.3.1 Proliferación celular por inmunohistoquímica

La proliferación celular se evaluó en animales de 10 días de edad mediante la determinación inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU, inyectada en los animales 2 h antes del sacrificio, tal como se describió en el punto 3.3.6.

La técnica de inmunohistoquímica aplicada fue la descrita en el punto 3.1.10 con una modificación luego del tratamiento de recuperación antigénica que consistió en una hidrólisis ácida de manera de desnaturalizar la hebras de ADN del tejido contribuyendo a exponer la BrdU incorporada, de acuerdo al protocolo optimizado en nuestro laboratorio (Kass y col., 2000). En la tabla se detalla la técnica aplicada:

Tabla 13: Técnica inmunohistoquímica para la determinación de BrdU

<i>-Desparafinar e hidratar</i>	
Xilol	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°	3 min
PBS	5 min
<i>-Recuperación Antigénica</i>	
Calentamiento en horno microondas en solución de buffer citrato 0,01 M, pH 6	3 min 100%, 12 min 40%, 20 min apagado
PBS	5 min
<i>-Apertura de la hebra de ADN</i>	
Hidrólisis ácida a 37°C con HCl 2N	30 min
Buffer borato de sodio 0.1M pH 8.5	10 min
PBS	10 min
<i>-Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena</i>	
Agua oxigenada 3% en metanol	15 min
PBS	15 min
<i>-Bloqueo de los sitios de unión no específicos</i>	
Suero normal de cabra 5% adicionado con leche en polvo descremada 1.5%.	30 min (en cámara húmeda)
<i>-Incubación con anticuerpo primario</i>	14-16 hs a 4°C (en cámara húmeda)
PBS	15 min
<i>-Sistema de revelado</i>	
Anticuerpo secundario biotinilado	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Estreptavidina-peroxidasa	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Sustrato de la enzima (0,001% H ₂ O ₂) + cromógeno (2 mg/ml DAB) disueltos en 0,05 M Tris-HCl pH 7,5	
Agua destilada	5 min
<i>-Contracoloración</i>	
Hematoxilina de Harris	15 segundos
<i>-Deshidratar y Montar</i>	

El anticuerpo primario, anti-BrdU se diluyó 1/100 (clon 85-2C8, Novocastra) y para el sistema de revelado se utilizó anticuerpo secundario, anti-ratón biotinilado (Sigma) diluido 1/80 y estreptavidina-peroxidasa (Sigma) 1:100, ambas diluciones preparadas con PBS-BSA 1%.

La evaluación se realizó en microscopio óptico con objetivo de 40X. El testículo se analizó dividiéndolo en los compartimientos intratubular e intersticial (figura 27). En el intratubular se contaron las células del interior del túbulo seminífero, delimitadas por la membrana basal: células germinales y células de Sertoli. De este modo se determinó el porcentaje de proliferación de la población completa de las células intratubulares. Asimismo, se determinó el número de células por unidad micrométrica teniendo en cuenta el perímetro tubular determinado según el punto 3.3.8.1.

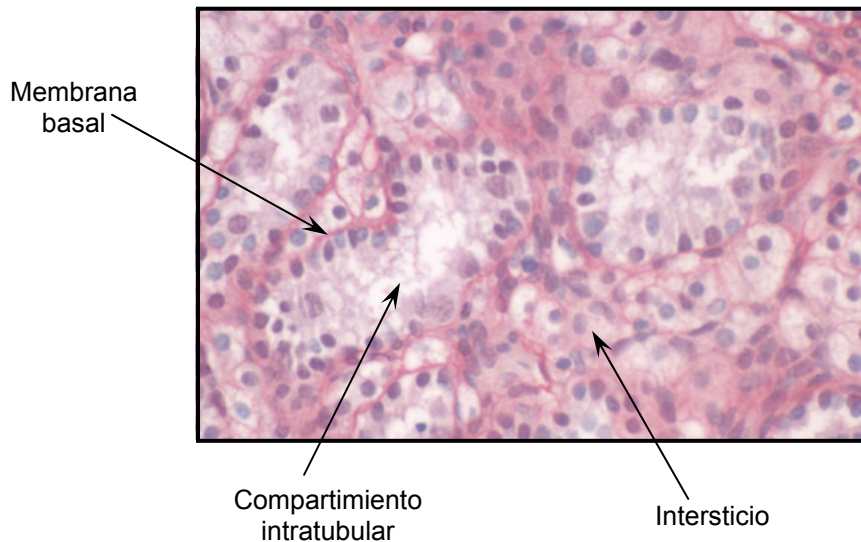


Figura 27: Microfotografía de un corte histológico de testículo de *C. latirostris* de 10 días de edad. Se observan túbulos seminíferos delimitados por sus membranas basales, separados entre sí por espacio intersticial. Coloración: Picrosirius-Hematoxilina. Magnificación: 400X.

3.3.8.3.2 Evaluación de apoptosis *in situ* por el método de TUNEL

Los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis pueden identificarse por inmunohistoquímica y localizarse *in situ* (Gavrieli y col., 1992). La particularidad de estos fragmentos es el predominio de terminales 3'OH libres en cadenas simples o dobles de ADN, que pueden ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina por acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El heteropolímero formado se pone de manifiesto mediante la aplicación de un

anticuerpo anti-digoxigenina, conjugado con la enzima peroxidasa, responsable de generar una señal a partir del sustrato cromogénico (DAB).

La metodología descrita se define como método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*), para la cual existen kits comerciales que permiten la detección de las células en apoptosis de cortes histológicos. En nuestro laboratorio utilizamos el ApopTag[®]Kit (Intergen Co., Purchase, New York, USA).

El protocolo de trabajo puede resumirse del siguiente modo:

- desparafinar e hidratar,
- bloquear la actividad endógena de peroxidasa incubando las muestras con agua oxigenada al 3% diluida en PBS durante 10 min a temperatura ambiente,
- agregar la mezcla de reacción: desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) sin marcar + dNTP conjugados con digoxigenina + la enzima TdT, e incubar durante 1 h a 37°C (en cámara húmeda),
- incubar con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente, realizar la reacción de color utilizando una mezcla del cromógeno + sustrato de la enzima (DAB + H₂O₂) durante 8 min,
- contracolorar con hematoxilina de Mayer, deshidratar y montar.

Como control positivo se utilizaron cortes histológicos de mama de rata en involución (post-destete), procesadas de la misma manera que las muestras en estudio. Los controles negativos se realizaron sobre cortes histológicos sometidos a las mismas condiciones de reacción pero reemplazando la enzima TdT por agua destilada.

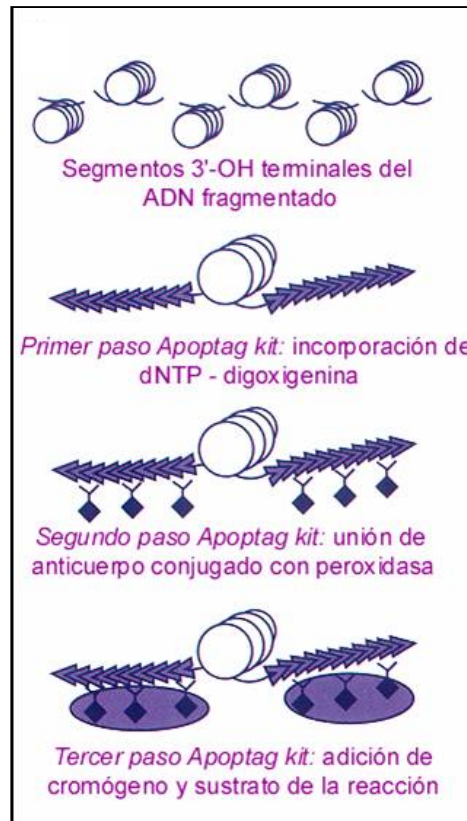


Figura 28: Metodología para la detección de células en apoptosis. Representación esquemática de la técnica inmunohistoquímica para determinar células en apoptosis, utilizando la enzima TdT y dNTP's marcados con digoxigenina

3.3.9 Niveles séricos de estrógenos y testosterona evaluados por radioinmunoanálisis (RIA).

Con el objetivo de determinar posibles alteraciones en los niveles hormonales de animales que fueron expuestos *in ovo* a contaminantes, se evaluó E2 y testosterona (T) circulantes por RIA. Debido a la ausencia de la caracterización de los perfiles hormonales normales en *C. latirostris*, previamente se determinaron estas hormonas en sueros de animales de diferentes edades provenientes de zonas libres de manipulación antrópica. Además, para la elaboración de los perfiles hormonales se tuvieron en cuenta los animales controles una vez que se determinó una ausencia de efecto debido al tratamiento con vehículo. Luego de determinar los perfiles hormonales normales, se evaluaron los animales expuestos a contaminantes en forma prenatal.

Para evaluar las hormonas T y E2 en animales experimentales, se utilizó suero de yacarés machos y hembras neonatales (10 días de edad) y juveniles sacrificados por decapitación. La determinación de ambas hormonas se realizó

mediante RIA optimizado en nuestro laboratorio. Se utilizó E2 y T radioisotópicamente marcadas con tritio, obtenidas comercialmente ([2,4,6,7,16,17- H^3] E2 y [1,2,6,7- H^3] T, PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Boston, MA, USA). Los anticuerpos específicos para ambas hormonas fueron provistos por el Dr. G.D. Niswender.

Las concentraciones hormonales fueron obtenidas luego de realizar una extracción del suero con 2 ml de éter etílico (Merck, Buenos Aires, Argentina) (Lacau-Mengido y col. 2000, Kass y col. 2004). Se mezclaron íntimamente con vórtex y ambas fases se separaron llevando a $-80^{\circ}C$. La fase orgánica permanece líquida, se recogió y se llevó a extracto seco en baño térmico. La fase acuosa se descongeló y se volvió a extraer, repitiendo la operación 3 veces. Para la cuantificación de E2 se trabajó con 600 μ l de muestra, mientras que para T con 200 μ l. El extracto seco se resuspendió en buffer PBS con el agregado de azida y gelatina (Sigma) durante 1:30 h en baño térmico. Paralelamente se generaron tubos con diversas diluciones conocidas de hormona sin marcar que se utilizaron para construir una curva de calibrado. Para cuantificar T, las diluciones se encuentran en el rango entre 4 y 0,062 ng/ml y para E2, entre 400 y 1,56 pg/ml. Luego se agregó una cantidad constante de hormona marcada con tritio y de anticuerpo y se incubó toda la noche a $4^{\circ}C$. Al día siguiente, se adicionó carbón-dextrán (0,5%-0,05%) (Sigma) y se incubó 10 min con agitación periódica. Se centrifugó a 3500 rpm a $4^{\circ}C$ durante 10 min con el objeto de separar el carbón-dextrán. El sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 10 veces superior. Las cuentas se leyeron en un contador de centelleo (WinSpectral, PerkinElmer). En todos los ensayos se evaluaron sueros humanos controles valorados. La recuperación fue calculada teniendo en cuenta una cantidad conocida de hormona marcada agregada a un suero preabsorbido con carbón-dextrán que fue sometido a la extracción y evaluando las cuentas recuperadas luego de este proceso. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada. Para la determinación de E2 la recuperación fue de 84% (sobre la base de 9 ensayos) y para T fue de 95% (teniendo en cuenta 11 ensayos). La sensibilidad de los análisis fue, para la determinación de E2 1,6 pg/ml y para T de 40 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo para E2 fueron de 2,89% y

3,85%, respectivamente. Para los ensayos de T, el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 6,96 y el inter-ensayo resultó ser de 10,44%.

3.3.10 Análisis estadístico

Se sometieron los resultados a un análisis de variancia paramétrico y no paramétrico de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis. Para la comparación de pares de grupos se utilizó el post-test de Dunn. Cuando fue necesario se utilizó análisis de regresión lineal R y no lineal empleando una ecuación dosis-respuesta sigmoidea, de pendiente variable. En todos los casos un $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.