

## **4. RESULTADOS**

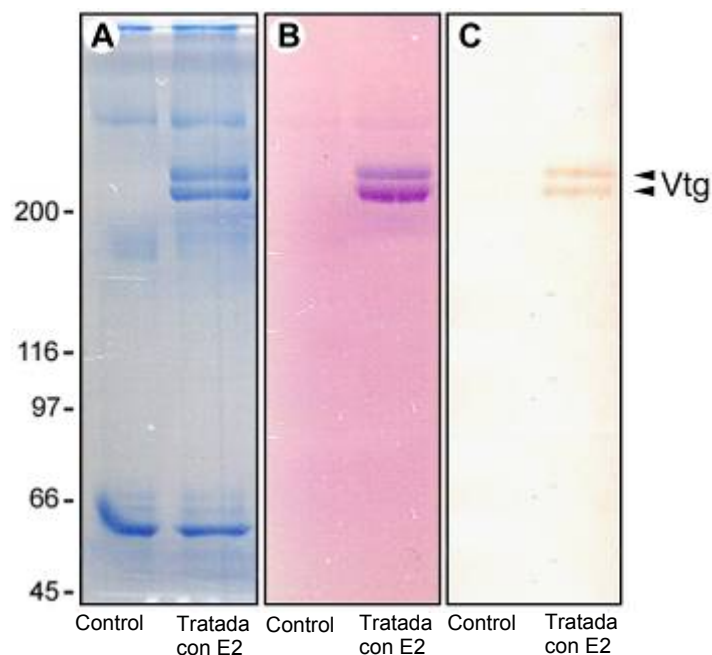
## 4.1 Evaluación de Vtg como biomarcador

### 4.1.1 Inducción de síntesis e identificación

El tratamiento con E2 indujo la expresión de diversas proteínas, entre las que se observaron dos proteínas cuyo peso molecular fue de 205 y 225 kDa en PAGE-SDS. Sus propiedades fisicoquímicas y antigénicas fueron coincidentes con las descritas para Vtg de otras especies ovíparas. Estas proteínas fueron detectadas en todas las muestras de plasma de yacarés tratados con E2, mientras que permanecieron ausentes en yacarés machos sin tratar y animales pre-púberes (figura 29A).

Como se mencionó en Materiales y Métodos, la naturaleza fosforilada de estas proteínas se demostró a través de su tinción de azul-violeta desarrollada con Stains All (figura 29B). Allí se observa que las únicas proteínas que presentaron características de fosforilación, fueron las inducidas con el tratamiento estrogénico. Si bien, las dos bandas presentaron la coloración característica esperada, se observó una diferencia en la tonalidad obtenida que podría evidenciar distinto grado de fosforilación.

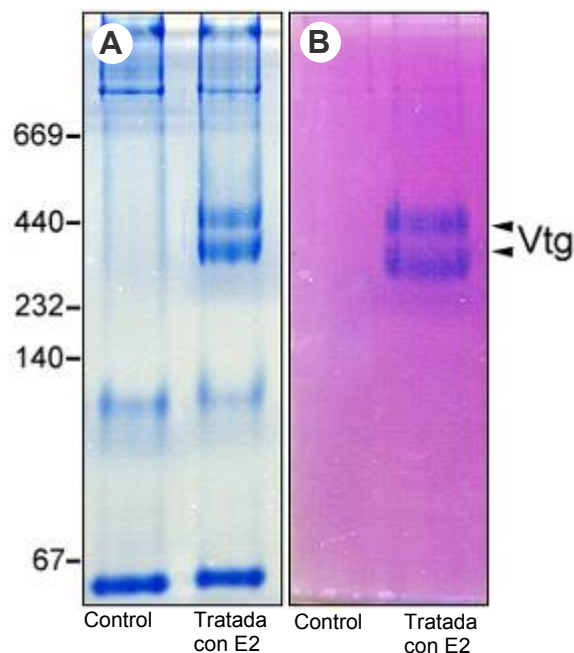
Demostraciones adicionales de la inducción de Vtg se manifestaron por western blot (figura 29C) utilizando como anticuerpo primario el anti-Vtg n° 498 provisto por el Dr. K.W. Selcer, el cual había sido probado satisfactoriamente en la detección de Vtg de aligatores (Selcer y col., 2001). Este anticuerpo policlonal se generó contra un péptido conservado entre diferentes especies, a partir Vtg de *X. laevis*. Como se observa en la figura 29C, este anticuerpo cruzó contra las dos bandas inducidas en yacaré luego del tratamiento con E2, aportando así más evidencias que identificarían a las proteínas como Vtg.



**Figura 29:** Separación electroforética de proteínas plasmáticas de hembras juveniles de yacaré. Las muestras provenientes de animales controles (vehículo) y tratados con E2 se separaron en geles en gradiente de poliácridamida (PAGE-SDS) de 5-8%. **A:** Se observan 2 bandas teñidas con Coomassie blue, pertenecientes a proteínas inducidas por el tratamiento. **B:** Tinción de las proteínas con Stains All que denotó su naturaleza fosforilada. **C:** Se observó reacción cruzada, por western blot, utilizando el anticuerpo policlonal dirigido contra una porción de la molécula de Vtg de *X. laevis*, (dilución 1/100). A la izquierda se indican los pesos moleculares y a la derecha las cabezas de flechas indican las dos bandas correspondientes a Vtg.

Por otro lado, se separaron por electroforesis en condiciones nativas las proteínas plasmáticas de hembras tratadas con vehículo (controles) y con E2. En las muestras analizadas, se observó la inducción de dos proteínas de 395 y 415 kDa luego del tratamiento con E2. Además la naturaleza fosforilada de ambas proteínas fue confirmada en geles teñidos con Stains All (figura 30). En estas condiciones, no fue evidente una variación en las tonalidades de azul observadas para las dos proteínas como se mostró en condiciones desnaturalizantes.

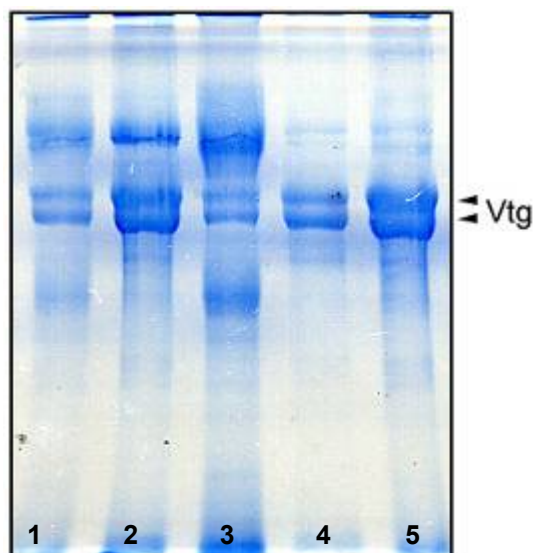
Con estos resultados, podría decirse que las proteínas inducidas fueron dos y que no poseen un grado de fosforilación diferencial.



**Figura 30:** Separación electroforética de proteínas plasmáticas de hembras juveniles de yacaré. Las muestras provenientes de animales controles (vehículo) y tratados con E2, se separaron en geles de poliacrilamida al 5% en condiciones nativas. **A:** La tinción con Coomassie blue muestra 2 proteínas inducidas por el tratamiento estrogénico. **B:** Su naturaleza fosforilada fue evidenciada con Stains All. A la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares y a la derecha las cabezas de flechas indicando las dos bandas correspondientes a Vtg.

#### 4.1.2 Purificación de Vtg

La purificación de Vtg se realizó en dos etapas. En el primer paso, las muestras plasmáticas de hembras tratadas con E2 se sometieron a una primera purificación por precipitación (figura 31). Como se puede observar en la figura 31, se obtuvo un claro enriquecimiento luego de la primera precipitación salina (calle 2 del gel), con pérdidas mínimas en el sobrenadante (calle 3). En esta última fracción se puede observar como, en esta primera precipitación, gran parte de las proteínas plasmáticas que acompañan a la Vtg se liberaron de la muestra. Sin embargo, luego de la segunda precipitación por disminución de la fuerza iónica, se observó que la fracción del sobrenadante poseía un alto contenido de Vtg (calle 5). Es por ello, que se decidió homogenizar esta fracción junto al segundo precipitado, previa eliminación de una fracción con alto grado lipídico presente en el mismo.

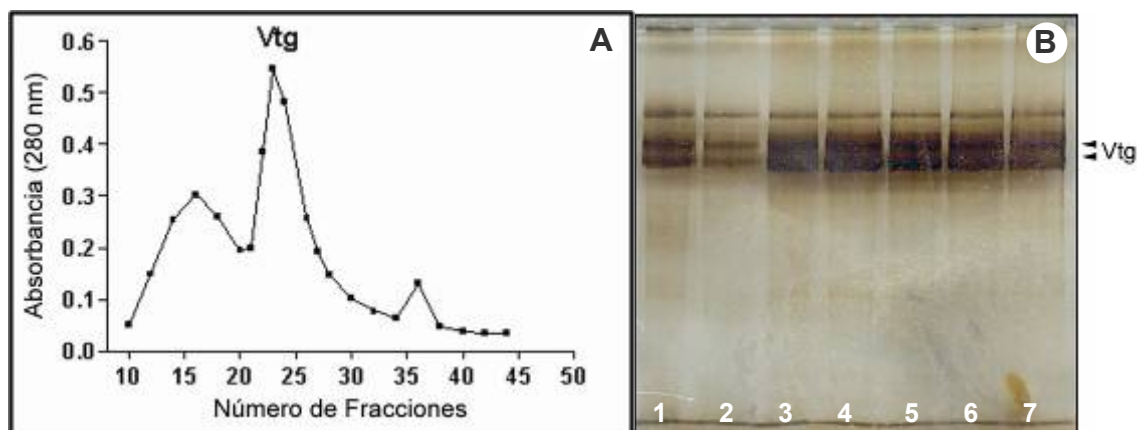


**Figura 31:** Separación electroforética de proteínas obtenidas en cada paso de la purificación por precipitación de plasma de hembra yacaré tratada con E2. Se observan calles sembradas con: 1. Plasma inicial, de hembra tratada con E2, 2. Producto del 1<sup>er</sup> precipitado solubilizado, 3. 1<sup>o</sup> sobrenadante, 4. 2<sup>do</sup> Precipitado solubilizado, 5. 2<sup>do</sup> sobrenadante. Las cabezas de flechas a la derecha indican las dos bandas correspondientes a Vtg.

En la segunda etapa de la purificación, la fracción enriquecida en Vtg (obtenida luego de la homogeneización el 2<sup>o</sup> precipitado libre de la fracción lipídica y el 2<sup>o</sup> sobrenadante) se sometió a cromatografía de intercambio iónico. En esta cromatografía la Vtg eluyó con una fuerza iónica de 550 mM de NaCl en buffer Tris-HCl 25 mM (pH 9).

En la figura 32A se muestra el cromatograma obtenido donde se encuentra señalado el pico de elución de la Vtg. Los otros dos picos observados, correspondieron a proteínas acompañantes de la Vtg que lograron separarse adecuadamente, sin provocar futuras interferencias.

Las fracciones obtenidas durante la elución de la Vtg se separaron utilizando la técnica de PAGE-SDS, y el gel obtenido posteriormente fue teñido con AgNO<sub>3</sub> (figura 32B). Se puede observar, el claro enriquecimiento de la Vtg en las fracciones colectadas (calles 2 a 7) respecto a la muestra original sembrada (calle 1).



**Figura 32:** Purificación de Vtg por cromatografía de intercambio iónico. **A:** Cromatograma de la purificación de la muestra obtenida por precipitación salina. Se muestra el pico de elución de la Vtg, colectado en fracciones de 1 ml. **B:** Gel de poliacrilamida teñido con  $\text{AgNO}_3$  de las fracciones recogidas durante la elución de Vtg. De izquierda a derecha: calle sembrada con la muestra inicial a purificar (1), calles sembradas con las fracciones correspondientes al pico de elución de Vtg (2-7). A la derecha las cabezas de flechas indican las dos bandas correspondientes a Vtg.

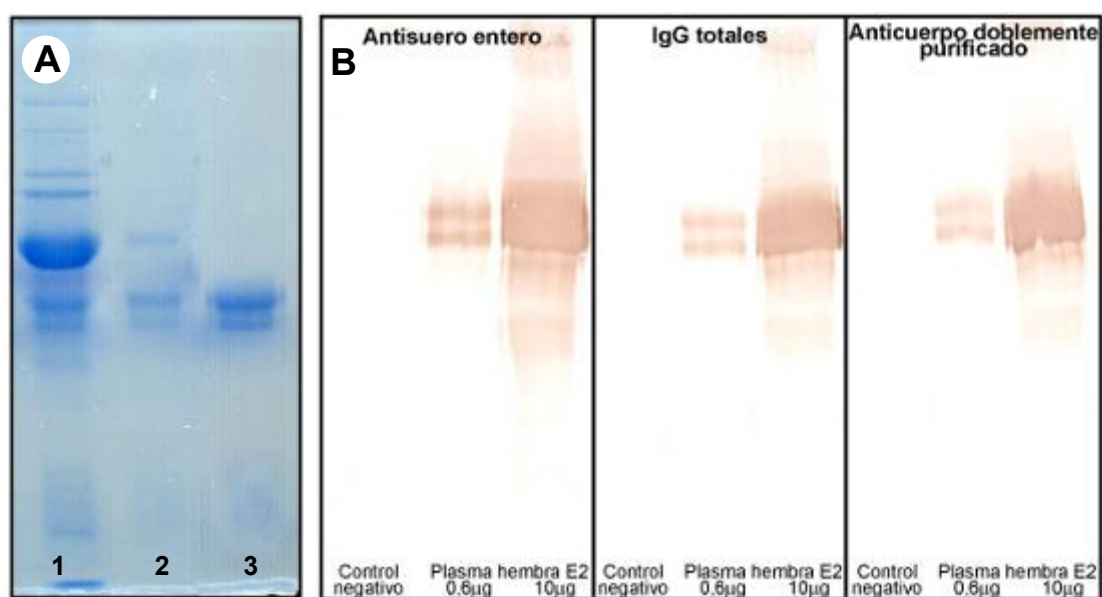
#### 4.1.3 Generación del anticuerpo anti-Vtg

Una vez inoculados los conejos con la Vtg purificada siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, se determinó la generación de anticuerpos realizando titulaciones del suero por dot blot y western blot. Cuando se detectó un título constante de anticuerpos (aproximadamente 1/8000) se procedió al sangrado de los conejos.

El suero se purificó por doble cromatografía de afinidad, en primera instancia purificando a través de una matriz de proteína A, donde se obtuvo la población de IgG totales, y luego por una matriz ligada con Vtg purificada, colectando así la subpoblación de IgG específicas contra Vtg.

El creciente grado de purificación del anticuerpo se evidenció por PAGE-SDS (figura 33A), donde se puede observar el gradual enriquecimiento de IgG específicas luego de las sucesivas purificaciones. En la calle 1 del gel obtenido, teñido con Coomassie blue, se muestra el contenido proteico total del suero de conejo luego de las inmunizaciones. En la calle 2, se observa una importante disminución de las proteínas no específicas, permaneciendo en esta fracción, la población de IgG totales. Finalmente, en la calle 3, se observa la población de IgG específicas como resultado de la purificación de las IgG totales.

Luego, se realizaron diferentes western blot utilizando como anticuerpo primario: suero de conejo obtenido luego de las inmunizaciones (western blot de la izquierda); la población de IgG totales (segundo western blot) y la subpoblación de IgG específicas (mostrado a la derecha) (figura 33B). La sobrecarga de una de las calles utilizadas en estos ensayos se realizó a fin de favorecer la marcación inespecífica, la cual fue disminuyendo con el creciente grado de purificación del anticuerpo primario. En la calle con sobrecarga se sembró 10  $\mu\text{g}$  de proteína total, mientras que un resultado claro se obtuvo sembrando 0,6  $\mu\text{g}$  de proteína total.



**Figura 33:** Evaluación de la pureza del anticuerpo anti-Vtg. **A:** Separación electroforética de muestras conteniendo anti-Vtg en creciente grado de pureza, calle 1: suero de conejo luego de las inmunizaciones, calle 2: población de IgG totales, calle 3: subpoblación de IgG específicas (anti-Vtg). **B:** Western blot utilizando membranas de nitrocelulosa con diferentes cantidades de plasma de hembra tratada con E2 y como anticuerpo primario, anti-Vtg con distintos grados de pureza.

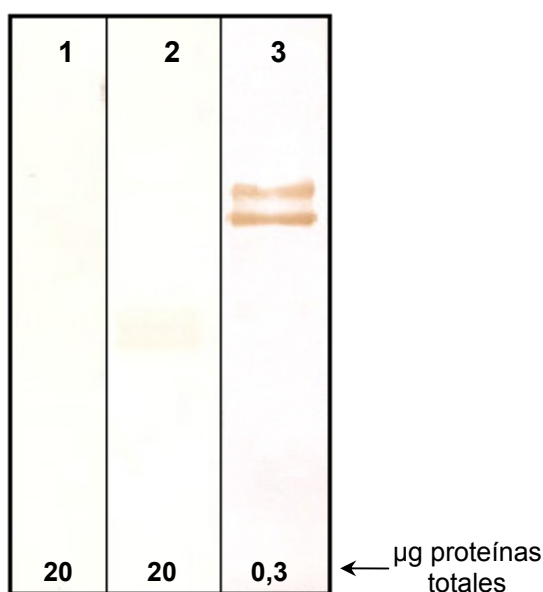
#### 4.1.4 Caracterización del anticuerpo

El anticuerpo policlonal anti-Vtg (LETHW 03-07) generado fue utilizado satisfactoriamente en los ensayos de western blot, dot blot, inmunohistoquímica y ELISA.

##### 4.1.4.1 Western blot y dot blot

Por medio de la técnica de western blot, se detectaron dos bandas intensamente marcadas en plasmas de las hembras tratadas con E2, utilizando

en anticuerpo LETHW 03-07, cuyos pesos moleculares correspondieron a 205 y 225 kDa (figura 34, calle 3). La marcación fue altamente específica sin detectar reacción cruzada con otras proteínas bajo las condiciones establecidas en el ensayo. No se observó detección alguna al utilizar el anticuerpo sobre muestras de animales sin inducir con E2 (calle 2). Asimismo, tampoco se detectó inmunoreactividad al reemplazar el anticuerpo primario por suero normal de conejo o buffer de bloqueo (controles negativos, calle 1). La mínima cantidad de Vtg detectada por western blot fue de 0,3 mg/ml.



**Figura 34:** Caracterización del anticuerpo obtenido mediante la técnica de western blot. Detección específica de dos bandas en plasma de yacarés tratados con E2 (calle 3) que no fueron observadas en yacarés controles (calle 2) ni utilizando suero basal de conejo como anticuerpo primario (calle 1).

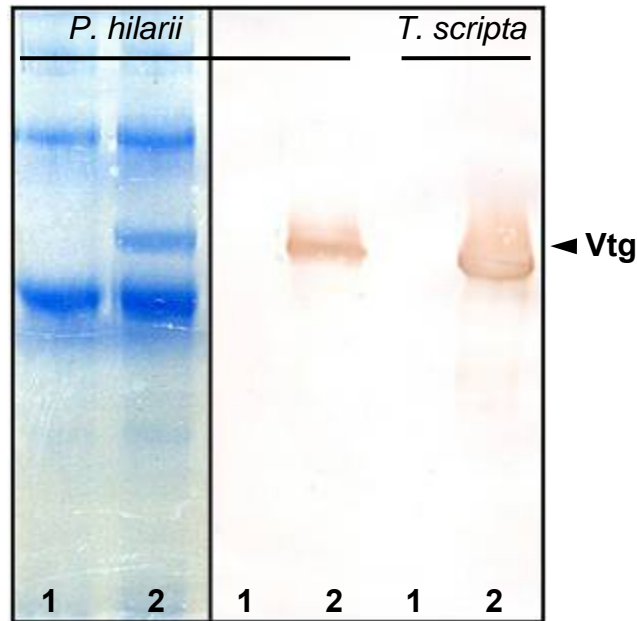
Al realizar la prueba de monitoreo por dot blot, bajo las mismas condiciones que las utilizadas para western blot, no sólo se demostró eficiencia en la detección sino también una alta sensibilidad para la detección de bajas cantidades. De esta manera, se podría establecer este ensayo para un monitoreo rápido, económico y sencillo de muestras en las cuales se desconoce la presencia de Vtg.

#### **4.1.4.2 Actividad cruzada del anticuerpo LETHW 03-07**

La evaluación del reconocimiento de Vtg en otras especies reveló el anticuerpo LETHW 03-07 exhibió reacción cruzada con el plasma de las dos especies de tortuga utilizada, *P. hilarii* y *T. s. dorbignyi*. La proteína reconocida



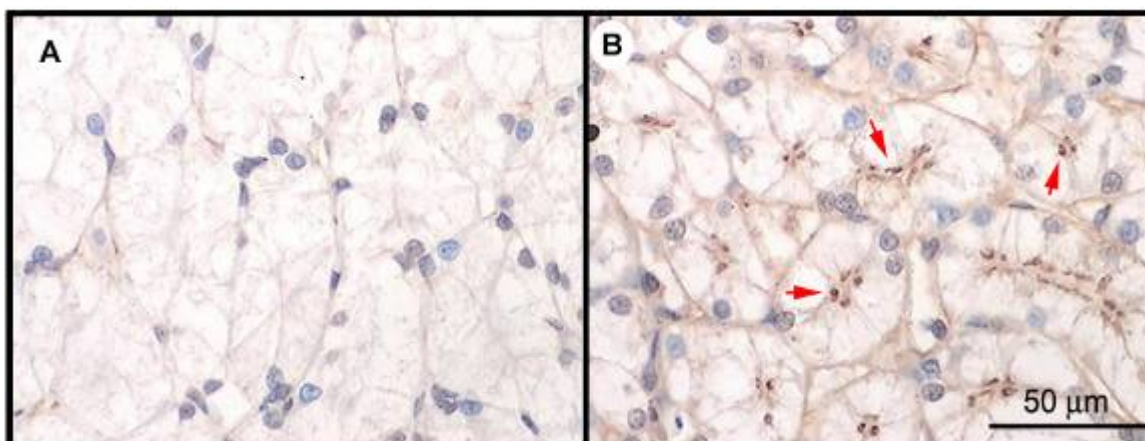
por el anticuerpo se indujo luego del tratamiento de las tortugas juveniles con E2, mientras que no hubo reconocimiento alguno en los plasmas de tortugas sin tratamiento (figura 35). En ambas especies de tortugas la proteína inducida y detectada fue única tal como se puede observar en la figura 35, en la imagen del gel teñido con Coomassie blue y en el western blot, y su peso molecular se determinó en 215 kDa.



**Figura 35:** Determinación de Vtg en tortugas juveniles *P. hilarii* y *T. scripta*, después de la inducción con E2. Calle 1: plasma de tortuga sin tratamiento, calle 2: plasma de hembra pre-púber tratada con E2. A la izquierda, las dos primeras calles corresponden a un gel sometido a PAGE-SDS, teñido con Coomassie blue, mientras que las calles restantes corresponden a un western blot utilizando como anticuerpo primario el anti-Vtg LETHW 03-07

#### 4.1.4.3 Inmunohistoquímica

El anticuerpo LETHW 03-07 presentó muy buena reactividad para la detección de Vtg en cortes histológicos provenientes de tejidos incluidos en parafina. Como se puede apreciar en las fotografías obtenidas de hígados de yacaré se observó una localizada inmunomarcación en los hepatocitos de hembras tratadas con E2. La Vtg se evidenció en forma de agregados citoplasmáticos próximos a la membrana apical, opuestos al núcleo (figura 36).



**Figura 36:** Expresión hepática de Vtg. **A:** Sección de tejido hepático de un yacaré control. **B:** Sección de tejido hepático de un yacaré hembra tratado con E2. Se observan agregados citoplasmáticos marcados con flechas, evidenciando que el anticuerpo es útil para inmunohistoquímica en muestras incluidas en parafina.

#### **4.1.4.4 Desarrollo del ELISA**

Con el objeto de optimizar el ELISA competitivo utilizando el anticuerpo generado para cuantificar Vtg plasmática, previamente se determinaron las condiciones del ensayo.

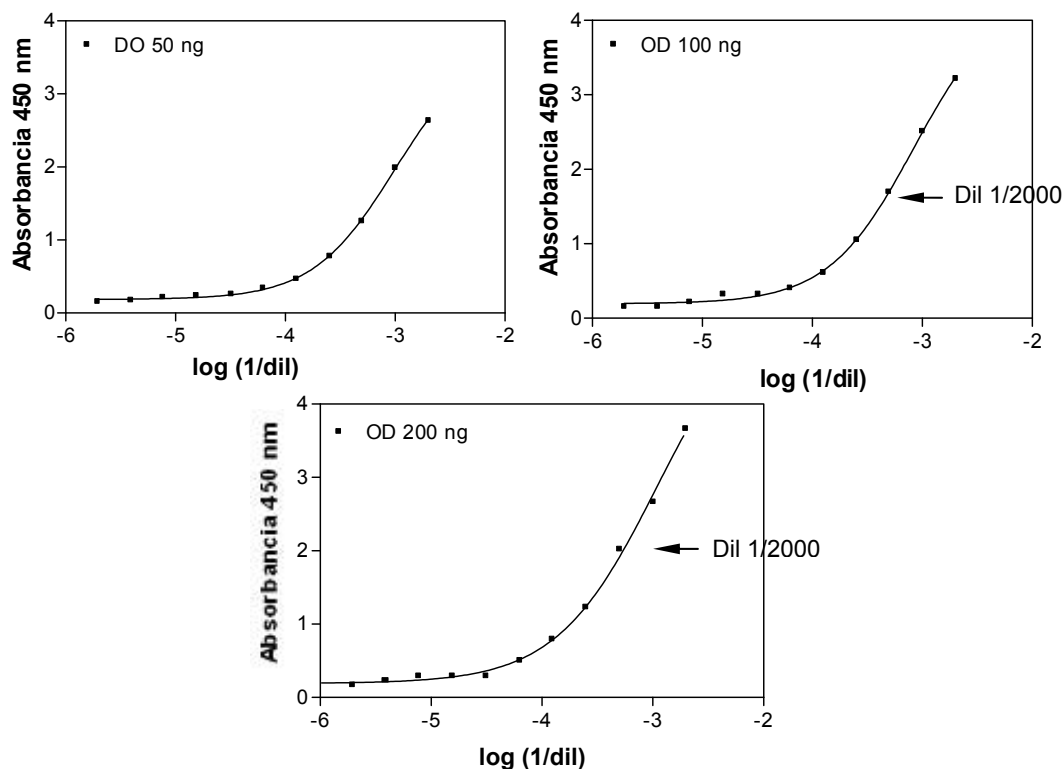
##### *4.1.4.4.1 Selección del buffer de sensibilización*

Se evaluaron dos soluciones para sensibilizar las placas de ELISA: PBS pH 7,5 y buffer carbonato de sodio pH 9,6. Se observó que con el buffer carbonato se obtuvieron mejores rendimientos en la adhesión de Vtg a la fase sólida. Por este motivo, se decidió que el buffer de sensibilización a utilizar en todos los ensayos sería buffer carbonato de sodio pH 9,6.

##### *4.1.4.4.2 Determinación del título de anticuerpo primario*

Se realizaron titulaciones del anticuerpo LETHW 03-07 en placas sensibilizadas con diferentes cantidades de Vtg. Por medio de esta determinación se concluyó que los ensayos que mostraron mayor sensibilidad fueron con 100 y 200 ng de Vtg fijados a la fase sólida, ya que las curvas generadas presentaron mayores pendientes (figura 37). Por otro lado, la dilución 1/2000 del anticuerpo fue elegida por representar el 50% de unión del anticuerpo, teniendo en cuenta la zona lineal de la curva. Trabajando en estas condiciones, se evita que pequeñas variaciones en el comportamiento no

impliquen una pérdida de sensibilidad por encontrarse en los extremos de la recta (figura 37)



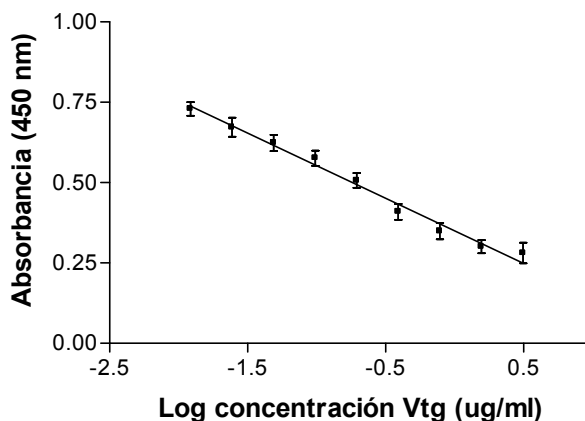
**Figura 37:** Titulación del anticuerpo primario utilizando diferentes cantidades de Vtg en la fase sólida. La mayor sensibilidad en la respuesta fue obtenida sensibilizando la placa con 200 ng de Vtg (DO 200 ng). La dilución 1/2000 del anticuerpo anti-Vtg sería la indicada para evaluar los ensayo de competición.

Sin embargo, empíricamente al realizar las pruebas de competición, se obtuvieron mejores resultados sensibilizando la placa con 200 ng de Vtg por pocillo y utilizando el anticuerpo diluido 1/1000. De esta manera, para todos los ensayos de ELISA de competición se sensibilizaron las placas con 200 ng de Vtg por pocillo y la dilución de uso del anticuerpo primario fue 1/1000, obteniendo así resultados altamente reproducibles.

#### 4.1.4.4.3 ELISA competitivo

Una vez establecidas las condiciones de ensayo, se desarrolló el ELISA competitivo obteniendo un amplio rango de linealidad para la detección de Vtg, entre 0,006 a 1,56  $\mu\text{g/ml}$ . El límite de detección del ensayo fue de 0,1 ng/ml y la sensibilidad, representada por la pendiente de la curva estándar, fue de -0,20 log ml/ $\mu\text{g}$  (figura 38). Durante las etapas de optimización, la curva de calibrado

se construyó por triplicado y una vez establecidos los parámetros del ensayo, se realizaron las curvas y la evaluación de las muestras por duplicado.



**Figura 38:** Curva de calibrado de ELISA competitivo. Los valores ( $x \pm SD$ ) provienen de 9 ensayos independientes. La ecuación de la recta obtenida corresponde a:  $Y = 0,35 - 0,20X$ , donde la pendiente representa la sensibilidad del ensayo.

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo, se realizaron mediciones repetidas de muestras, dentro de un mismo ensayo y en ensayos realizados en diferentes ocasiones. Así, se calcularon los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo. La ecuación empleada fue:

$$CV (\%) = (SD/P) * 100$$

Donde CV representa al coeficiente de variación, SD corresponde la desviación estándar y P, el promedio de las mediciones.

Cuando se determinó el CV intra-ensayo, SD y P, representaron la desviación estándar y el promedio de la cuantificación realizada dentro de un mismo ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo resultante del ELISA se calculó como el promedio de 3 CV obtenidos a diferentes concentraciones dentro del rango lineal de la curva de calibrado.

Para evaluar el CV inter-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de la cuantificación realizada en 3 ensayos diferentes. El coeficiente de variación inter-ensayo del ELISA se calculó como el promedio de 3 CV obtenidos en ocasiones diferentes.

Los resultados del cálculo de los coeficientes de variación fueron para el CV intra-ensayo: 1,99% y el CV inter-ensayo: 3,66%.

Los resultados de la optimización del ELISA de competición muestran la obtención de un ensayo altamente sensible y reproducible para la cuantificación de muestras.

#### **4.1.5 Aplicación de las metodologías desarrolladas.**

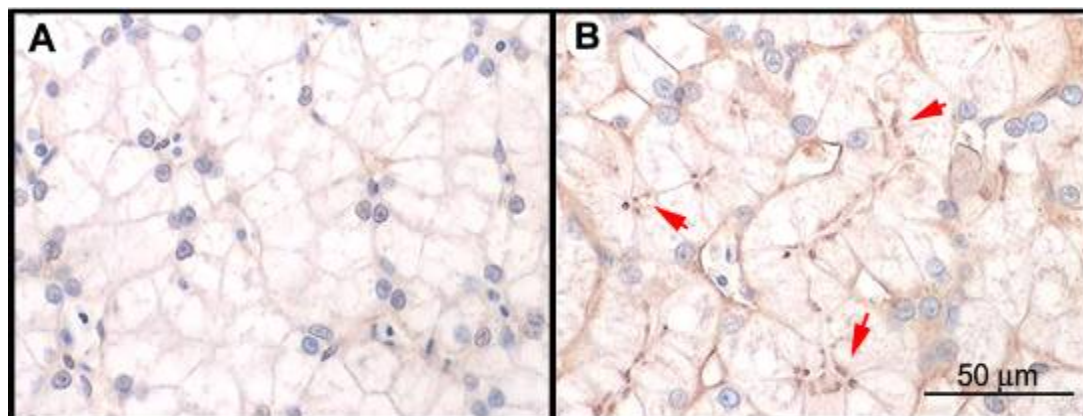
Con las metodologías previamente descritas se logró evaluar la inducción de Vtg en diferentes situaciones experimentales.

##### **4.1.5.1 Inducción de Vtg en yacarés macho juveniles**

Al utilizar yacarés machos juveniles para la inducción de Vtg, se observó que luego del tratamiento con E2, hubo un incremento en la concentración de proteínas plasmáticas totales. La cuantificación de contenido proteico total de las muestras plasmáticas de los yacarés machos, fue de  $53,5 \pm 3,1$  mg/ml a  $58,0 \pm 2,9$  mg/ml y  $65,5 \pm 2,8$  mg/ml luego de la primera y segunda dosis de E2 administrada, respectivamente. Este incremento se debió principalmente a la inducción de proteínas identificadas como Vtg por PAGE-SDS y ensayos de western blot.

El ensayo de ELISA se utilizó para determinar los niveles de Vtg en las diferentes muestras plasmáticas. No se detectó Vtg en los animales tratados con vehículo (control) ni previo al tratamiento (niveles basales). Siete días posteriores a una única administración de E2 (1mg/ml) todos los machos (n=7) presentaron niveles detectables de Vtg:  $1,18 \pm 1,11$  mg/ml. Luego de una segunda administración de E2 a los 7 días posteriores de la primera dosis, se cuantificaron los niveles de Vtg en los mismos animales, pasados 7 días de la última administración. Se encontró que dichos niveles fueron significativamente superiores:  $10,15 \pm 2,40$  mg/ml.

Cuando comparamos la síntesis de Vtg por inmunohistoquímica en tejido hepático observamos que en los machos tratados con E2 se detectó claramente la Vtg ubicada en el citoplasma de los hepatocitos, mostrando un patrón similar al observado en las hembras juveniles (figura 39).



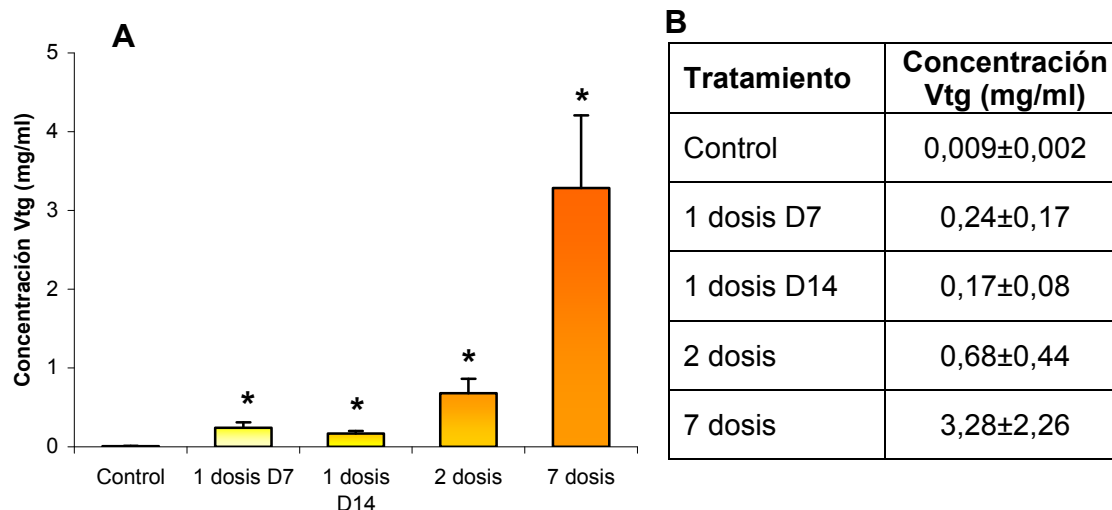
**Figura 39:** Detección de Vtg *in situ* por inmunohistoquímica en machos juveniles tratados con E2. **A:** Tejido hepático de un yacaré macho control. **B:** Detección de Vtg en el citoplasma de los hepatocitos (flechas) de yacaré macho juvenil luego del tratamiento estrogénico.

#### 4.1.5.2 Inducción de Vtg en crías hembra de yacaré overo

Para determinar la capacidad de inducción de Vtg en animales de corta de edad, se evaluaron diferentes protocolos de tratamiento (ver detalles en Materiales y Métodos pág. 54): 1 administración de E2 y sacrificio a los 7 (1 dosis D7); 1 administración de E2 y sacrificio a los 14 días (1 dosis D14); 2 administraciones de E2 espaciadas por 7 días (2 dosis); y 7 días consecutivos con inyecciones de E2 (7 dosis), en estos 2 últimos tratamientos los animales se sacrificaron a los 7 días de la última administración de E2.

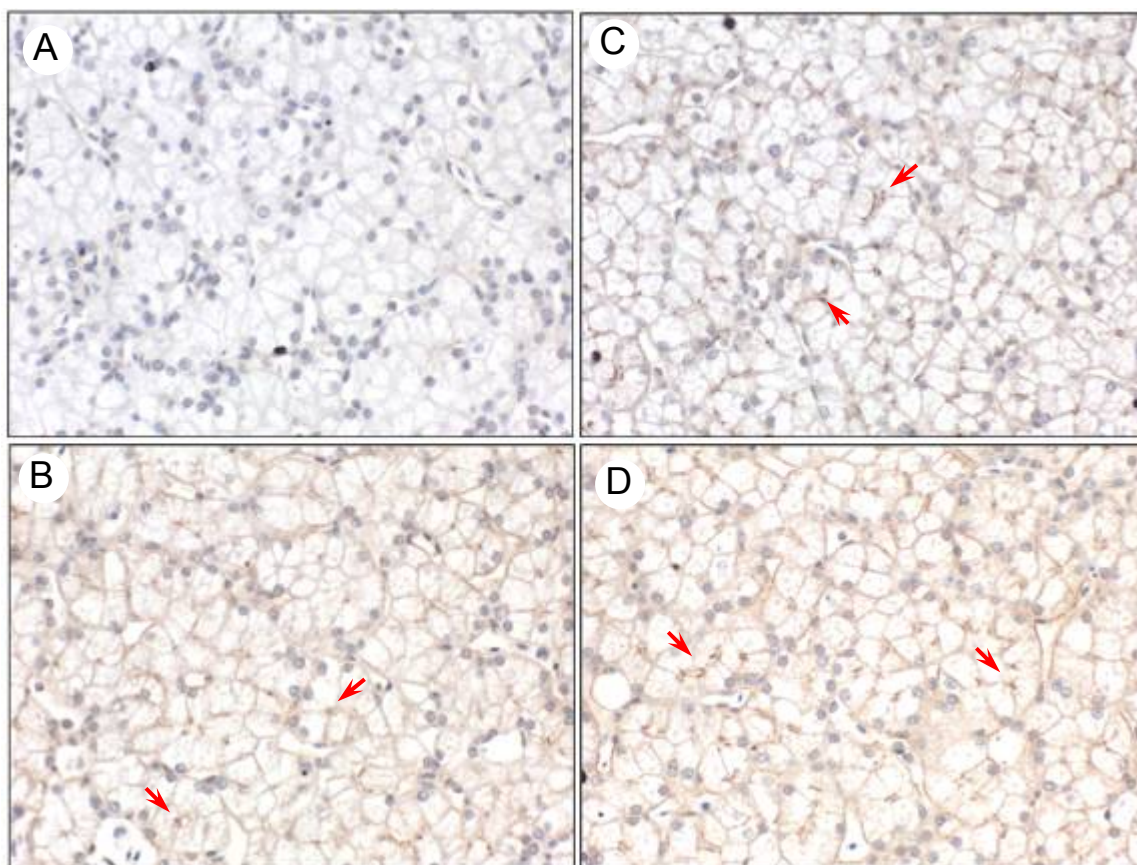
Se observó que en todos los grupos experimentales, el tratamiento estrogénico provocó la inducción de Vtg en las crías de yacaré. Particularmente, una única dosis de E2 fue suficiente para activar la síntesis de Vtg y esta respuesta se mantuvo aún después de 14 días de la administración. Se observaron mayores niveles de Vtg circulante en crías tratadas con 2 dosis y un incremento notable luego de la administración de 7 dosis consecutivas (figura 40). Además, en este último grupo se observa una desviación estándar importante respecto al resto de los grupos, lo que podría deberse a diferentes capacidades de respuesta frente a un tratamiento intensivo con E2 entre las distintas crías sometidas al mismo tratamiento.

En la figura 40 se representan los resultados obtenidos.



**Figura 40:** Detección de Vtg plasmática en crías hembras. **A:** Representación gráfica de los niveles de Vtg plasmática detectados en los diferentes grupos de tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar medio (SEM) y los asteriscos (\*) representan diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). **B:** Resultados de la cuantificación por ELISA de los niveles circulantes de Vtg, expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD).

Además, utilizando la técnica inmunohistoquímica previamente descrita, se evaluó la detección de la síntesis y/o acumulación de Vtg en tejido hepático de las crías tratadas con E2. Los resultados mostraron un patrón de inducción análogo al observado en los animales juveniles (figura 41). Se puede observar la clara formación de los agregados citoplasmáticos como producto de los diferentes tratamientos estrogénicos.



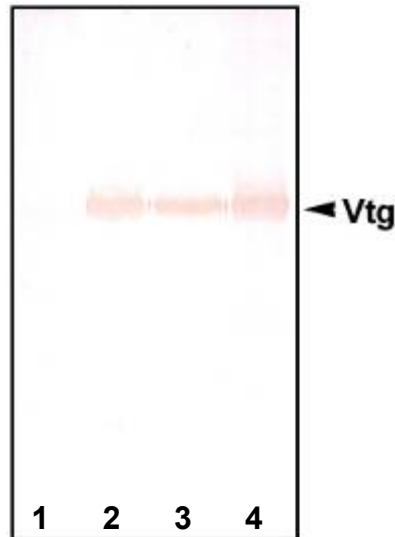
**Figura 41:** Inmunodetección de Vtg en hígado de crías hembras tratadas con E2. **A:** Sección de tejido hepático de una cría de yacaré hembra control. **B, C y D:** Detección de agregados de Vtg (flechas) luego del tratamiento con E2 con 1, 2 y 7 inyecciones, respectivamente. Magnificación: 400X

#### **4.1.5.3 Niveles de Vtg en tortugas silvestres adultas en estación reproductiva**

En tortugas silvestres *P. hilarii* adultas, capturadas durante la estación reproductiva, se tomaron muestras de sangre, y se obtuvo el plasma para realizar la determinación de Vtg. Se observó que en las muestras provenientes de las hembras sexualmente maduras hubo una clara detección de Vtg circulante por western blot utilizando el anticuerpo LETHW 03-07 (figura 42). Al igual que lo observado en las tortugas juveniles sometidas a tratamiento estrogénico la proteína detectada fue única y de una masa molecular semejante al observado previamente (215 kDa).

En la determinación por western blot se utilizó como control negativo una hembra juvenil sin tratamiento donde no se detectó la presencia de Vtg y como control positivo se utilizó plasma de una tortuga tratada con E2 (figura 42).



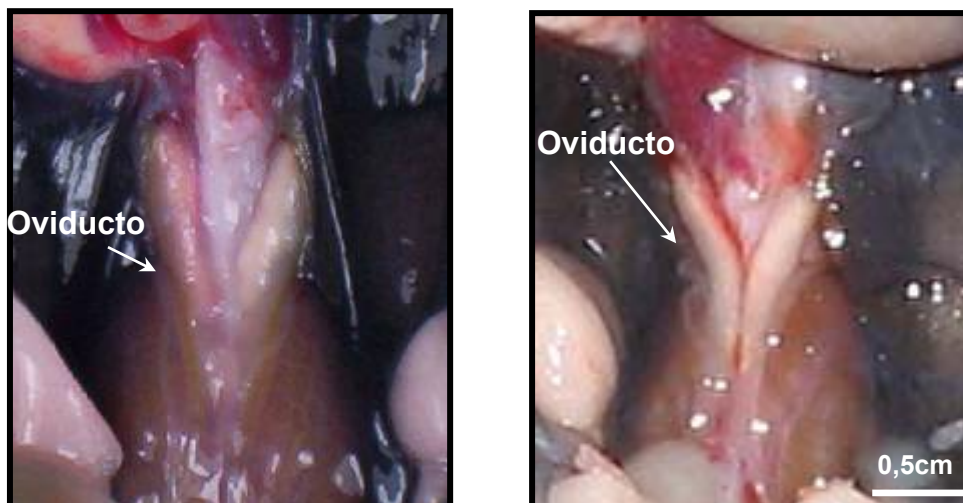


**Figura 42:** Determinación de Vtg en tortugas *P. hylarii* silvestres, sexualmente maduras. Calle 1: hembra pre-púber (control negativo), calle 2: control positivo (hembra inducida con E2), calles 3 y 4: hembras adultas silvestres en etapa reproductiva.

#### **4.2 Identificación de órganos blanco de acción de estrógenos en el tracto reproductor femenino**

Otro objetivo propuesto en esta tesis fue determinar alteraciones morfológicas y modificaciones en la proliferación celular debido al tratamiento con E2 sobre el oviducto, como órgano blanco de acción estrogénica. Para ello, se utilizaron las crías de *C. latirostris* tratadas con 1, 2 y 7 dosis de E2 (para más detalles de los protocolos de tratamientos ver Materiales y Métodos pág. 54)

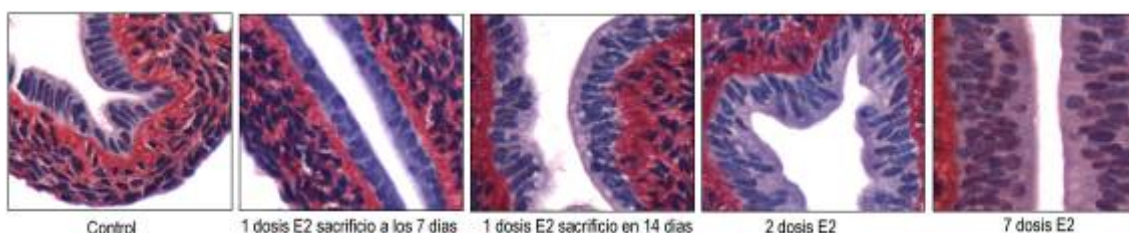
Se observaron alteraciones macroscópicas en el oviducto como se muestra en la figura 43. A continuación se describen las modificaciones observadas a nivel morfológico que fueron puestas de manifiesto a través de técnicas histológicas de rutina y análisis de imágenes. Por inmunohistoquímica se evaluó la proliferación celular como parámetro de respuesta estrogénica en el órgano.



**Figura 43:** Imagen macroscópica del complejo GAM y oviducto de crías *C. latirostris* hembra. **A:** Hembra control tratada con vehículo (aceite de maíz). **B:** Hembra tratada con 7 dosis consecutivas de E2, donde se observa un aumento notable del tamaño del oviducto.

#### 4.2.1 Evaluación de la altura del epitelio del oviducto

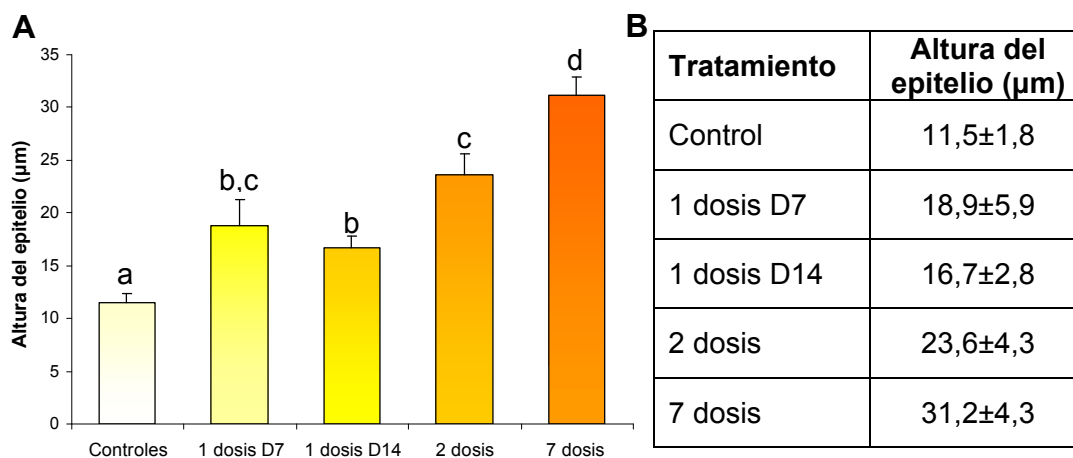
Se evaluó la posibilidad de utilizar la altura del epitelio del oviducto como biomarcador de exposición a xenoestrógenos debido a que este órgano es blanco de acción estrogénica. Para ello, se analizaron imágenes digitalizadas obtenidas a partir de cortes histológicos de los oviductos de crías sometidas a diferentes tratamientos experimentales. Se determinó un incremento en la altura epitelial luego de los tratamientos con E2 como se muestran en las figuras 44 y 45.



**Figura 44:** Microfotografías de porciones de oviducto de las crías sometidas a diferentes tratamientos. Coloración: Picrosirius-hematoxilina. Magnificación 400X

Del mismo modo que fuera observado para la inducción de Vtg, la altura del epitelio sufrió modificaciones significativas incluso con una dosis única de E2 las cuales se fueron incrementando con el aumento de las dosis administradas. Como se puede apreciar en la figura 44, el epitelio, paso de ser cúbico simple en los animales controles, a pseudo-estratificado e incluso

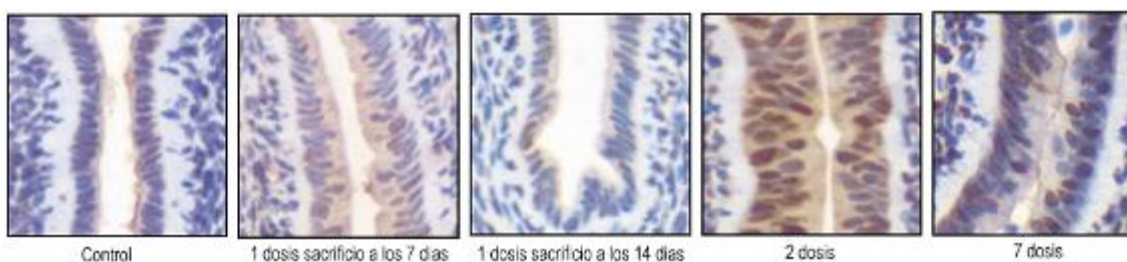
estratificado en algunas porciones del oviducto de las crías tratadas con 7 dosis de E2.



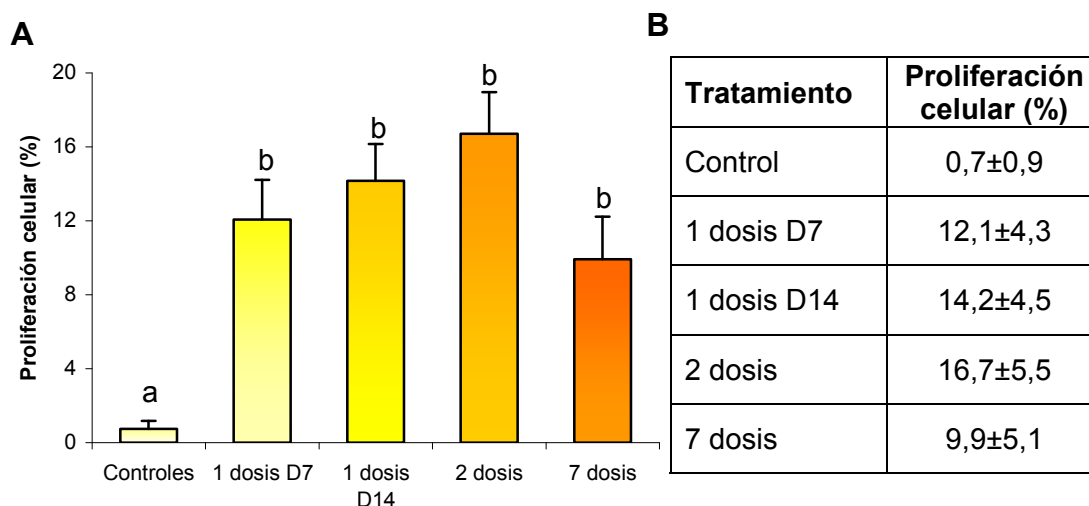
**Figura 45:** Variación de la altura promedio del epitelio del oviducto. **A:** Representación gráfica de la altura promedio epitelial en yacarés tratados con E2. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y las letras (a, b, c, d) representan diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). **B:** Resultados de la cuantificación automatizada sobre imágenes digitalizadas, expresados como media  $\pm$  SD.

#### 4.2.2 Evaluación de la proliferación celular en el oviducto

Con el objetivo de determinar si la proliferación celular del epitelio del oviducto se modificó a raíz del tratamiento con E2, se realizó la técnica inmunohistoquímica para detectar PCNA. Los resultados fueron obtenidos por cuantificación manual de las células intensamente marcadas de marrón (figuras 46 y 47).



**Figura 46:** Efecto de la estimulación estrogénica sobre la actividad proliferativa del epitelio oviductal. Inmunodetección de la expresión de PCNA. Positivo: núcleos marrones (cromógeno DAB), negativo: núcleos azules, contracoloración hematoxilina de Mayer. Magnificación: 400X.



**Figura 47:** Aumento en la actividad proliferativa del epitelio oviductal en respuesta al estímulo estrogénico. **A:** Representación gráfica del porcentaje de células en proliferación en yacaré tratadas con diferentes dosis de E2. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y las letras (a, b) indican diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). **B:** Resultados de la cuantificación utilizando microscopio óptico, expresados como media  $\pm$  SD.

Como se puede apreciar, el epitelio oviductal de las hembras controles presenta, a esta edad, un porcentaje de proliferación muy bajo, mientras que una dosis de E2 fue capaz de aumentar significativamente la actividad proliferativa de estas células hasta alcanzar un pico al tratar a las crías con 2 dosis de E2. Si bien el porcentaje de proliferación permanece alto cuando se administraron 7 dosis de E2, tiende a disminuir en este último grupo experimental, lo que podría deberse a que previamente se haya alcanzado un pico de hiperplasia y que luego su actividad proliferativa permanezca saturada.

### 4.3 Determinación de biomarcadores de exposición prenatal

#### 4.3.1 Características de los nidos cosechados

Los datos obtenidos de los nidos utilizados para los experimentos, se detallan en la tabla 14. No se evidencian diferencias significativas entre los datos recogidos en las diferentes estaciones reproductivas.

**Tabla N°14:** Características de los nidos y del hábitat

<b>Parámetros</b>	<b>Estación reproductiva 2002 (Santa Fe)</b>	<b>Estación reproductiva 2004 (Chaco)</b>	<b>Estación reproductiva 2005 (Entre Ríos)</b>
Número de nidos recogidos	5	2	2
Grado de intervención antrópica*	baja-moderada	baja	baja-moderada
Total de huevos utilizados	175	72	64
Cantidad de huevos/nido (X±SD)	35,0±3,1	36,0±4,2	32,0±2,8
Peso de los huevos (g)** (X±SD)	65,1±6,2	74,9±9,1	68,6 ± 3,9

\* Caracterización del hábitat según el grado de intervención antrópica, ver detalles en Materiales y Métodos pág. 59

\*\* El peso de los huevos corresponde al inicio de la incubación controlada.

### 4.3.2 Incubación

Dentro de las incubadoras, tanto el sistema de calefacción como su mecanismo de regulación fueron adecuados para lograr un rango máximo de variación de 0,8°C.

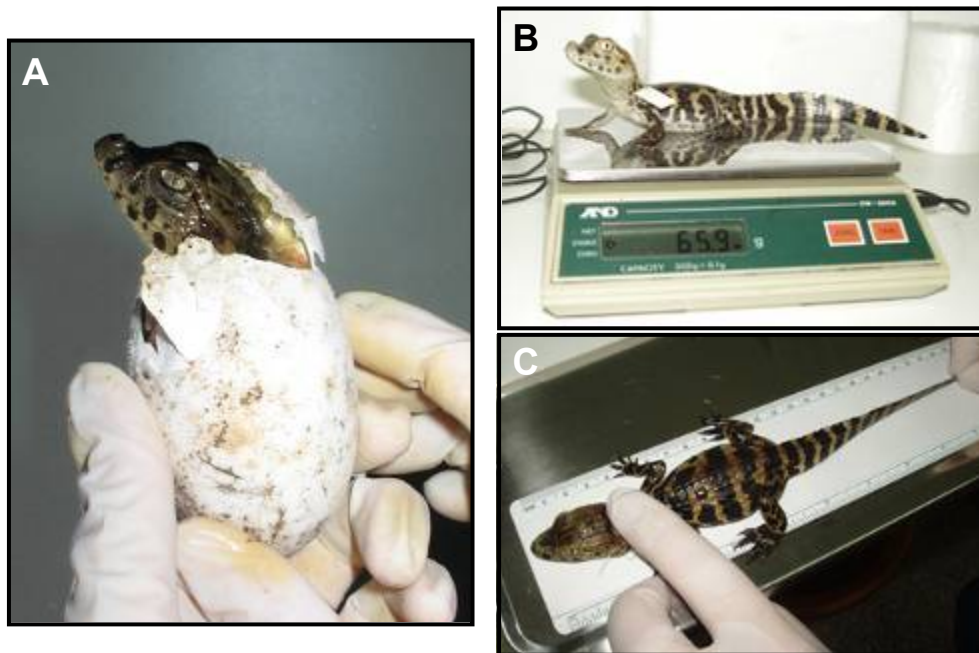
La humedad alcanzada se mantuvo en el rango variable de 92 a 98%, siendo ligeramente superior en la incubadora de 33°C respecto a la de 30°C. Los huevos no mostraron un desarrollo significativo de cámaras de aire, evidenciando ausencia de deshidratación (Grigg, 1993).

Los huevos procedentes de un mismo nido presentaron sincronización del desarrollo embrionario para cada temperatura de incubación. La incubación a 33°C resultó en un desarrollo más acelerado de los embriones respecto de la de 30°C.

### 4.3.3 Nacimientos y variables alométricas.

Los animales nacidos en ambas incubadoras se mostraron saludables y sin signos de deshidratación (figura 48). Con las primeras experiencias, se determinó que el período de incubación a 33°C es de alrededor de 66 días, mientras que a 30°C se extiende a 76 días. Luego de la topicación en la etapa 20 del desarrollo embrionario, los nacimientos ocurrieron al cabo de 41 días en la incubadora de 33°C, y a los 45 días en la de 30°C (tabla 15). El porcentaje

de animales viables a los 10 días de edad fue de 88-100% en relación a los nacidos vivos.



**Figura 48:** Crías de *C. latirostris* recién nacidas. **A:** Asistencia en el nacimiento de las crías. **B:** Registro del peso. **C:** Medición de largo total.

**Tabla 15-** Nacimientos y variables alométricas.

Parámetro	Incubación estación reproductiva 2002		Incubación estación reproductiva 2004		Incubación estación reproductiva 2005	
	Machos N=47	Hembras N=107	Machos N=27	Hembras N=37	Machos N=23	Hembras N=31
Días a 30°C desde etapa 20 al nacimiento	45,0±0,0		45,0±0,0		44,5±0,7	
Días a 33°C desde etapa 20 al nacimiento	40,5±1,0		41,0±1,4		41,0±1,4	
Peso final de los huevos (g)	Nd		68,1±9,2		60,7±3,2	
Animales nacidos vivos (%)*	91,2		97,0		96,4	
Viabilidad a los 10 días (%)**	88,0		100		98,1	
Recién nacidos						
Peso (g)	44,3±5,6	45,7±5,3	50,4±6,2	50,5±7,6	44,8±3,4	44,4±3,1
LT (cm)	3,1±1,110,	2,8±1,110,	3,7±0,711,	3,9±0,711,	3,2±1,610,	3,3±0,911,
LHC (cm)	7±0,6	9±0,6	7± 0,4	7± 0,5	8± 0,4	0± 0,2

Los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar. Abreviaturas: Nd: no determinado, LT: largo total, LHC: largo hocico-cloaca.

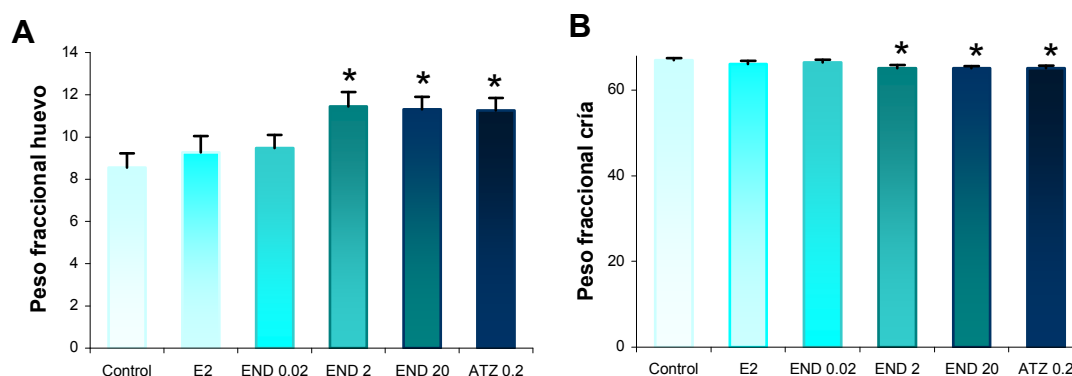
El sexo fue confirmado histológicamente al momento del sacrificio.

\*Se consideraron el total de huevos que fue sometido al período de incubación completo

\*\*Se calculó a partir del total de la población de animales nacidos vivos.

Los diferentes tratamientos aplicados durante la etapa embrionaria no modificaron las variables alométricas evaluadas al nacimiento. Sin embargo, al evaluar la variación de peso de los huevos al inicio y luego de completar la incubación, discriminados por grupo de tratamiento, se observaron diferencias significativas en su pérdida de peso fraccional (PPF,  $[(\text{peso inicial del huevo} - \text{peso final del huevo})/\text{peso inicial}] * 100$ ) (figura 49A).

Del mismo modo, se discriminó por tratamiento el peso de las crías recién nacidas y se evaluó el peso fraccional de estas (PFC,  $[\text{peso cría}/\text{peso inicial del huevo}] * 100$ ). Este valor se obtuvo debido a que el peso del yacaré recién nacido se encuentra íntimamente relacionado al peso del huevo. Así el peso fraccional de la cría de yacaré (PFC) denota la proporción de peso del huevo que el embrión logró convertir en tejido propio, debido a que es una medida relativa al peso inicial del huevo. Se observó una disminución significativa del PFC de las crías tratadas con las mayores dosis de endosulfán y con atrazina respecto al grupo control (figura 49B).



**Figura 49:** Representación gráfica de la variación del peso fraccional de los huevos y del peso fraccional de las crías. **A:** Marcado aumento en la pérdida de peso fraccional de los huevos de los huevos tratados con las mayores dosis de endosulfán y con atrazina. **B:** Disminución significativa del peso fraccional de las crías en los mismos grupos que provocaron un aumento en la pérdida de peso fraccional de los huevos. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Abreviaturas: E2, 17 $\beta$ -estradiol 1,4ppm; END 0.02; endosulfán 0,02 ppm; END 2, endosulfán 2 ppm; END 20, endosulfán 20 ppm; ATZ 0.2, atrazina 0,2 ppm

#### **4.3.4 Determinación sexual**

De todos los huevos topicados con vehículo (controles) incubados a 30°C nacieron hembras mientras que de los incubados a 33°C nacieron machos, el sexo se determinó inicialmente por observación macroscópica de genitales internos. En el 100% de los casos la evaluación macroscópica de las gónadas coincidió con su estudio histológico en cortes de tejidos coloreados con Picrosirius-hematoxilina.

##### **4.3.4.1 Efecto de los tratamientos *in ovo* con pesticidas sobre la determinación sexual.**

Como se mencionó previamente, en condiciones normales la determinación sexual en *C. latirostris* se encuentra bajo influencia de la temperatura, pero la acción de la temperatura puede ser modificada si en la etapa de la determinación sexual el embrión es expuesto a xenoestrógenos. Es así como en la experiencia realizada al tratar los huevos con un agente de uso industrial, el BPA, se demostró que al topicar huevos incubados a 33°C con E2 1,4 ppm y BPA 140 ppm se producía reversión sexual, es decir en lugar de obtener machos al finalizar el período de incubación se obtenían hembras (Stoker y col., 2003). En base a esta experiencia, nos propusimos evaluar si la determinación sexual se modificaba frente a la exposición *in ovo* a dosis ambientalmente relevantes de los agroquímicos endosulfán y atrazina que en otros sistemas han evidenciado acción estrogénica. La determinación sexual no se alteró al topicar los huevos con las diferentes dosis de endosulfán (0,02, 2 y 20 ppm) o de atrazina (0,2 ppm), obteniendo 100% de machos en huevos incubados a 33°C y 100% de hembras cuando se incubaron a 30°C.

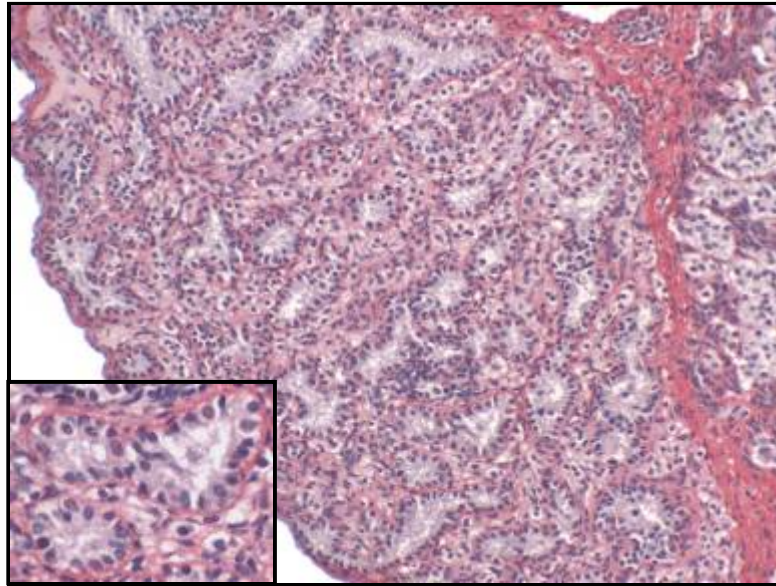
#### **4.3.5 Efectos sobre la histoarquitectura gonadal de machos**

##### **4.3.5.1 Evaluación del perímetro de los túbulos seminíferos**

En los machos controles a los 10 días de edad, los testículos se caracterizan por la presencia de túbulos seminíferos bien diferenciados dentro de los cuales se destacan las células de Sertoli y algunas células germinales, ubicadas sobre la membrana basal (figura 50). Hacia fuera de la membrana basal se encuentra una monocapa de células mioides. Los túbulos están

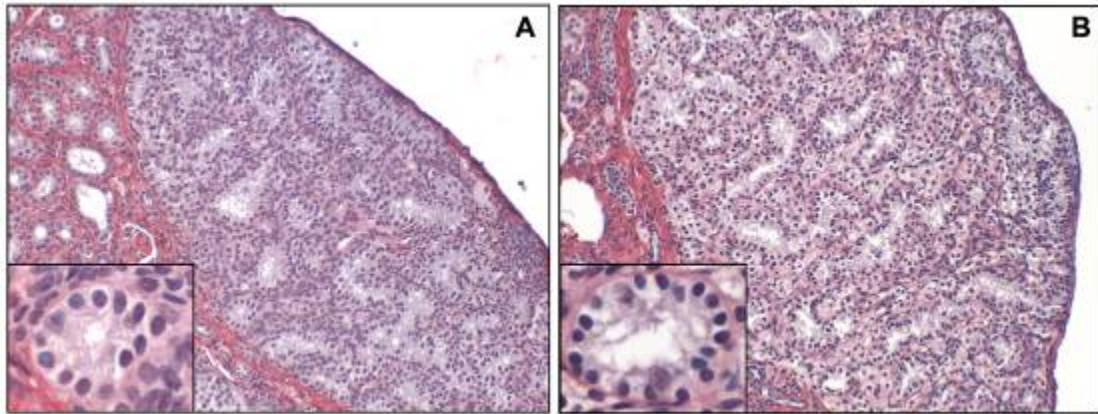


separados entre sí por un estroma muy vascularizado, integrado por fibroblastos, células de Leydig, adipositos y células infiltrantes.



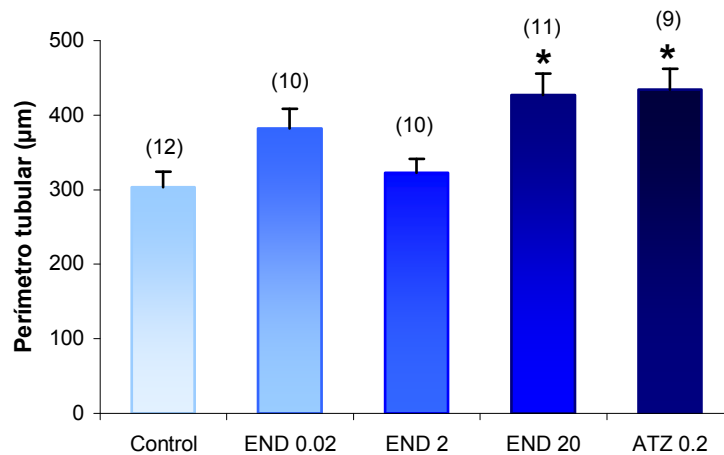
**Figura 50:** Microfotografía de testículo de *C. latirostris* de 10 días de edad. A mayor aumento se observan dos túbulos seminíferos delimitados claramente por la membrana basal, dentro del cual se encuentran células de Sertoli y germinales. Coloración: Picrosirius-hematoxilina. Magnificación: 200X, inserto: 400X.

Si bien los yacarés nacidos de la incubadora de 33°C tratados con las diferentes dosis de endosulfán y de atrazina resultaron machos y la evaluación histológica de sus gónadas no mostró ninguna característica de hembra, el estudio de los testículos de estos animales mostró una alteración en su histoarquitectura. Esta alteración se caracterizó por la presencia de túbulos seminíferos de mayor tamaño, con un aparente aumento de las luces centrales (figura 51).



**Figura 51:** Microfotografías representativas de testículos de *C. latirostris* de 10 días de edad. **A:** Animal control donde se muestra la estructura normal de los túbulos seminíferos, **B:** Animal tratado *in ovo* con atrazina, en el cual se observan alteraciones en el tamaño de los túbulos seminíferos. Coloración: Picrosirius-hematoxilina. Magnificación: 200X, inserto: 400X.

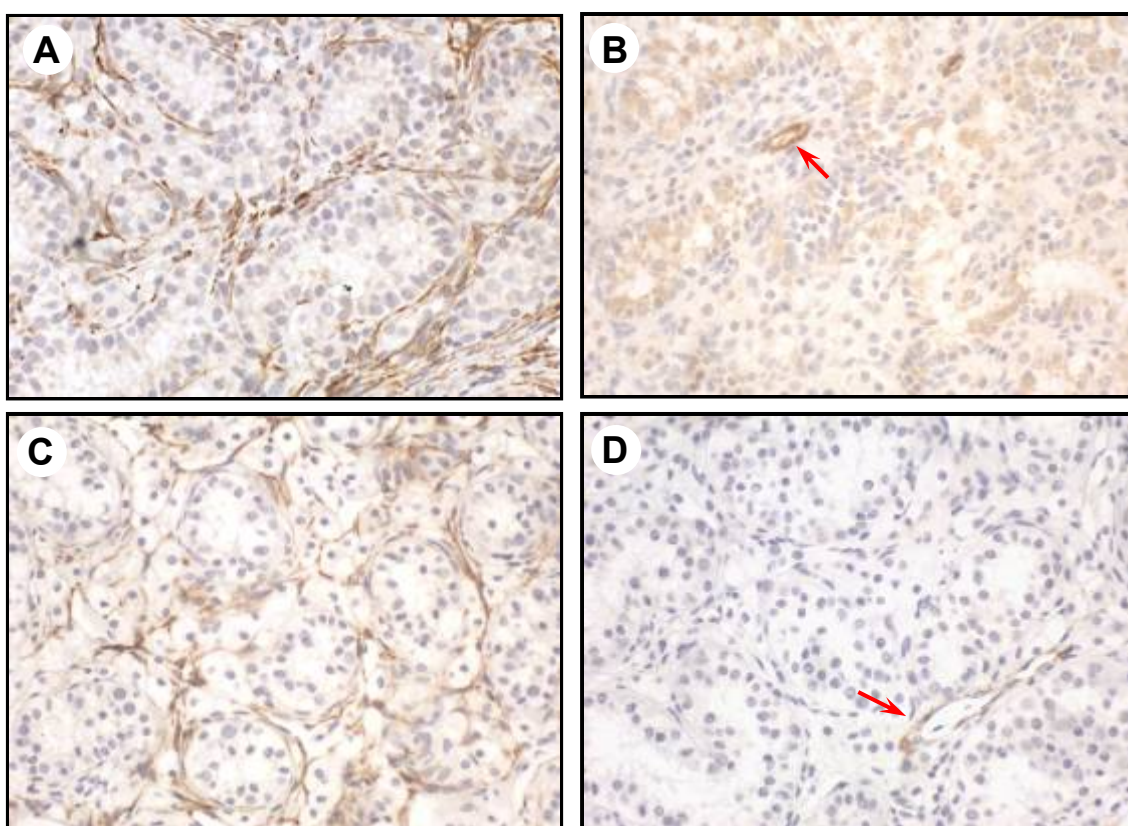
Al evaluar mediante técnicas morfométricas la estructura de los túbulos seminíferos sobre imágenes digitalizadas se evidenció un aumento significativo en el perímetro de los mismos, en los grupos tratados con endosulfán 20 ppm, y atrazina 0,2 ppm (figura 52), respecto al grupo control.



**Figura 52:** Representación gráfica del perímetro tubular de testículos de los animales expuestos a diferentes tratamientos. El aumento significativo en el perímetro de los túbulos seminíferos de los grupos tratados con endosulfán 20 ppm y con atrazina 0,2 ppm respecto al grupo control se encuentra representado por asteriscos (\*) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.5.2. Caracterización de las células mioides en el estroma del testículo

Considerando las alteraciones observadas en el perímetro de los túbulos seminíferos y teniendo en cuenta que las células mioides son las principales componentes del tejido peritubular, que proporcionan integridad estructural (Maekawa y col., 1996; Palombi y col., 1992), utilizamos marcadores de proteínas del citoesqueleto ( $\alpha$ -actina y desmina) para caracterizarlas. Dicha determinación la realizamos, en principio, en animales controles de 10 días y de 12 meses de edad (figura 53).



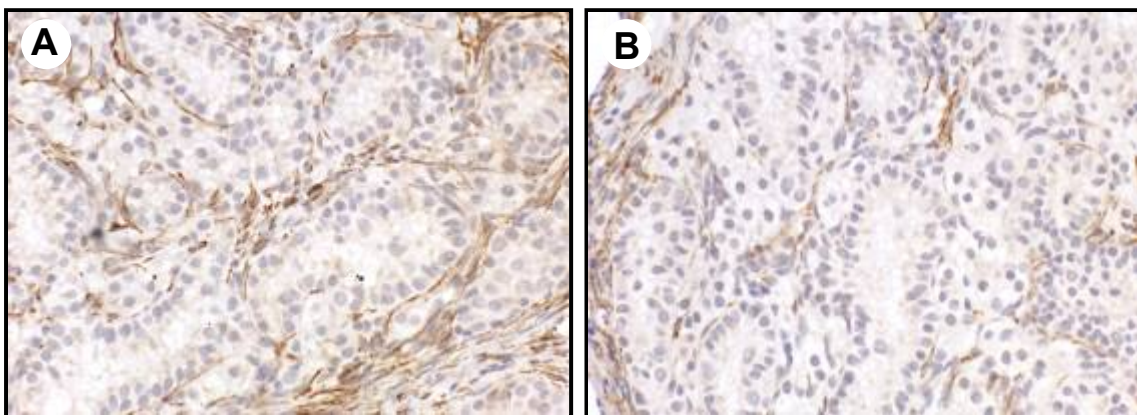
**Figura 53:** Caracterización de las células mioides por medio de la expresión de desmina y  $\alpha$ -actina en animales controles de 10 días y 12 meses de edad. **A-B:** Testículos de crías de 10 días de edad, donde se realizó la inmunomarcación de las células mioides para desmina (**A**) y  $\alpha$ -actina (**B**). **C-D:** Testículos de yacarés de 12 meses de edad, donde se evaluó la expresión de desmina (**C**) y  $\alpha$ -actina (**D**) en las células mioides. El anticuerpo utilizado para  $\alpha$ -actina demostró reactividad en los cortes de testículo empleados denotada por el reconocimiento de esta proteína en las células musculares de los vasos sanguíneos (flechas). Magnificación: 400X.

La detección de la expresión del filamento intermedio desmina permite caracterizar las células mioides. Observamos que estas células expresaron desmina en testículos de yacarés tanto a los 10 días de edad como a los 12

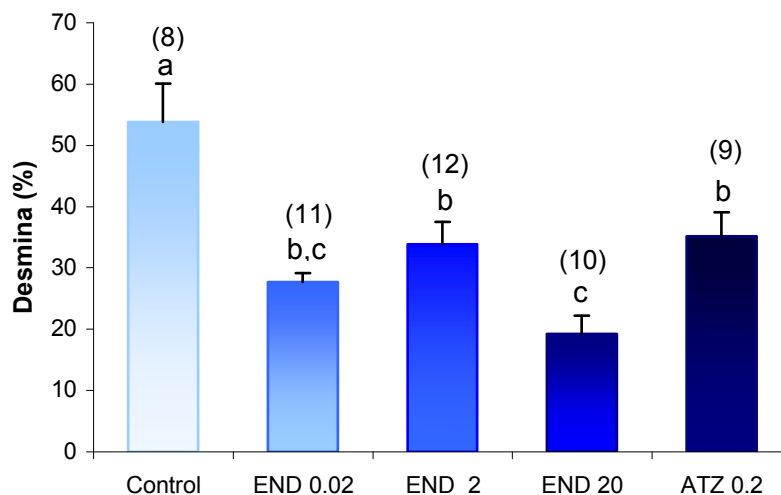
meses (figura 53 A, C) y que aparentemente al año de edad ya se observan más de una capa de células mioides rodeando a los túbulos seminíferos.

Además, las células peritubulares fueron caracterizadas por la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso. Este microfilamento es expresado por las células mioides de diferentes especies una vez que se encuentran funcionalmente maduras. En nuestra experiencia observamos, que ni a los 10 días de edad ni a los 12 meses, las células mioides de los testículos de los yacarés expresaron  $\alpha$ -actina (figura 53 B, D). Esto podría indicar que estos animales aún no son suficientemente maduros para que las células mioides testiculares se encuentren funcionalmente activas. Por otro lado, puede observarse que el anticuerpo utilizado mostró una adecuada reactividad contra  $\alpha$ -actina expresada en la capa muscular (células musculares lisas) que rodea a los vasos sanguíneos. Por lo tanto, puede decirse que la ausencia de reconocimiento de  $\alpha$ -actina en las células mioides se debe a una falta de expresión de la proteína y no por falta de reacción cruzada del anticuerpo.

Al evaluar la expresión de desmina en los testículos de los yacarés de 10 días de edad sometidos a los diferentes tratamientos *in ovo*, se observó que las células mioides mostraron una marcada disminución de la marcación de desmina a lo largo del perímetro tubular, en todos los grupos de tratamiento respecto al grupo control (figuras 54 y 55).



**Figura 54:** Expresión de desmina en testículos de *C. latirostris* de 10 días de edad sometidos a diferentes tratamientos. **A:** Animal control. **B:** Tratado con atrazina 0,2ppm. Magnificación: 400X



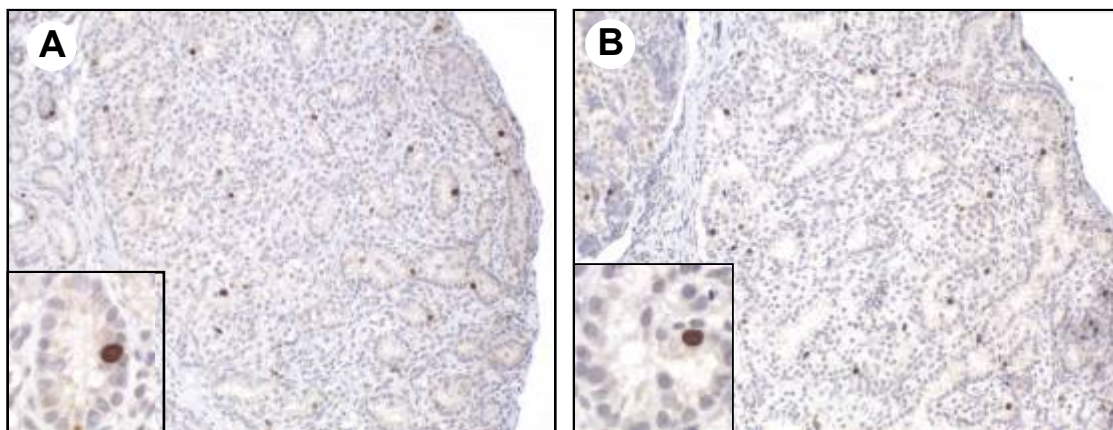
**Figura 55:** Representación gráfica del porcentaje de células que expresan desmina relativas al perímetro tubular. Las diferencias significativas entre los grupos experimentales se encuentran evidenciadas con las letras ( $p < 0,05$ ).

#### **4.3.5.3 Evaluación del recambio celular intratubular**

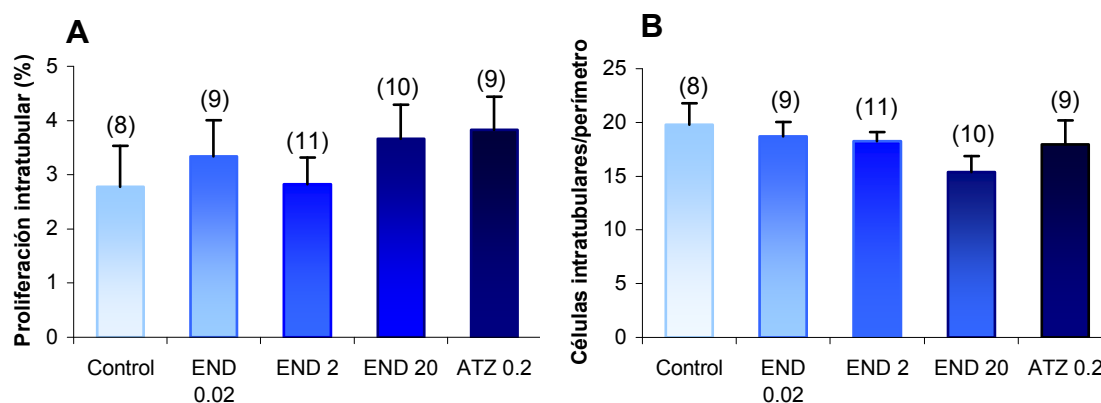
##### **4.3.5.3.1 Evaluación de la proliferación celular**

Para determinar si la discontinuidad observada en la distribución de las células mides y el aumento en el perímetro tubular se debía a un aumento en el número de células intratubulares evaluamos actividad proliferativa por incorporación de BrdU por inmunohistoquímica. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células en proliferación dentro del túbulo seminífero, entre los diferentes grupos de tratamiento (figuras 56 y 57A).

Por otro lado, se encontró que el número de células intratubulares totales por unidad de longitud (micra,  $\mu\text{m}$ ), presentó una tendencia a disminuir en el grupo de animales que fueron tratados *in ovo* con endosulfán 20 ppm (figura 57B). Para realizar esta comparación se obtuvo un factor que fue calculado como 100 veces el número de células totales dentro del túbulo seminífero relativas al perímetro tubular.



**Figura 56:** Determinación de incorporación de BrdU como marcador de proliferación celular. Testículos de *C. latirostris* de 10 días de edad. Animal control (A) y tratado con endosulfán 20ppm (B) donde se muestran células en proliferación (marrón), sin observarse diferencias entre ambos grupos. Magnificación: 200X, inserto: 400X.

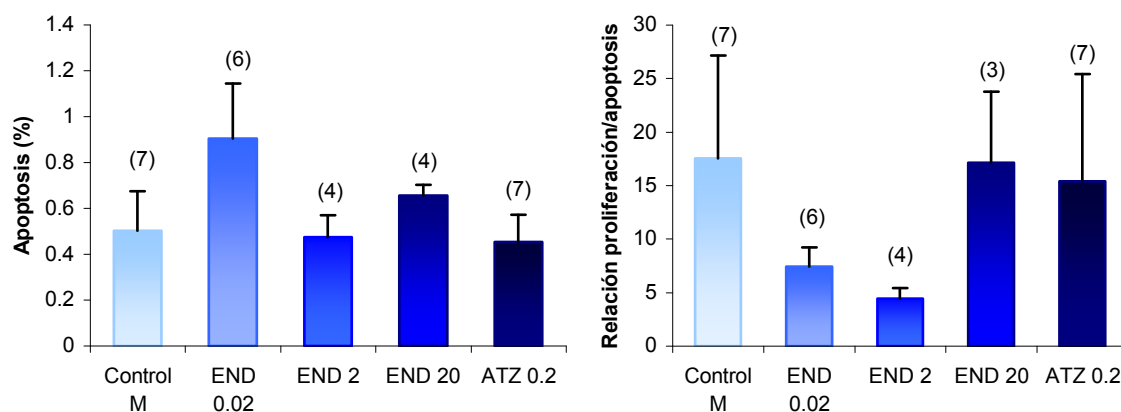


**Figura 57:** Efectos de la exposición a agroquímicos *in ovo* sobre la proliferación de células de los túbulos seminíferos. **A:** Porcentaje de células en proliferación intratubulares evaluadas por incorporación de BrdU. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. **B:** Número de células intratubulares totales relativas al perímetro del túbulo seminífero.

#### 4.2.5.3.2 Determinación de muerte celular programada o apoptosis

El aumento de una población celular puede deberse no sólo a modificaciones en la proliferación sino también debido variaciones en la muerte celular. Al no detectar modificaciones en la proliferación de las células intratubulares, evaluamos el índice de apoptosis en este compartimiento tisular de manera de determinar si alteraciones en el *turnover* celular (relación proliferación celular/apoptosis) justificaban el aumento del perímetro de los túbulos seminíferos. El porcentaje de células en apoptosis detectado por la técnica de TUNEL nunca superó el 1,6%, sin observarse diferencias

significativas en este parámetro entre los diferentes grupos de tratamiento (figura 58A). Asimismo, tampoco se evidenciaron diferencias al evaluar la relación entre el índice de proliferación respecto a la apoptosis celular, lo que estaría indicando que el recambio celular entre los diferentes grupos de tratamientos no se encuentra alterado (figura 58B).



**Figura 58:** **A:** Porcentaje de células en apoptosis dentro de los túbulos seminíferos. **B:** Relación proliferación celular/apoptosis en los túbulos seminíferos. No se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

### 4.3 Niveles circulantes de hormonas esteroides sexuales.

En la búsqueda de biomarcadores de exposición a xenoestrógenos y teniendo en cuenta las alteraciones observadas a nivel gonadal en los diferentes grupos experimentales, determinamos los perfiles de estrógeno y testosterona en *C. latirostris* machos y hembras de diferentes edades. En una primera etapa establecimos los perfiles hormonales en condiciones controles debido a que no se dispone de datos en la literatura.

#### 4.3.1 Perfiles hormonales normales.

Se evaluó  $17\beta$ -estradiol (E2) y testosterona (T) en suero de animales de diferentes edades mantenidos en condiciones de cautiverio, libres de contacto con contaminantes estrogénicos. La cuantificación se llevó a cabo por RIA previamente optimizado.

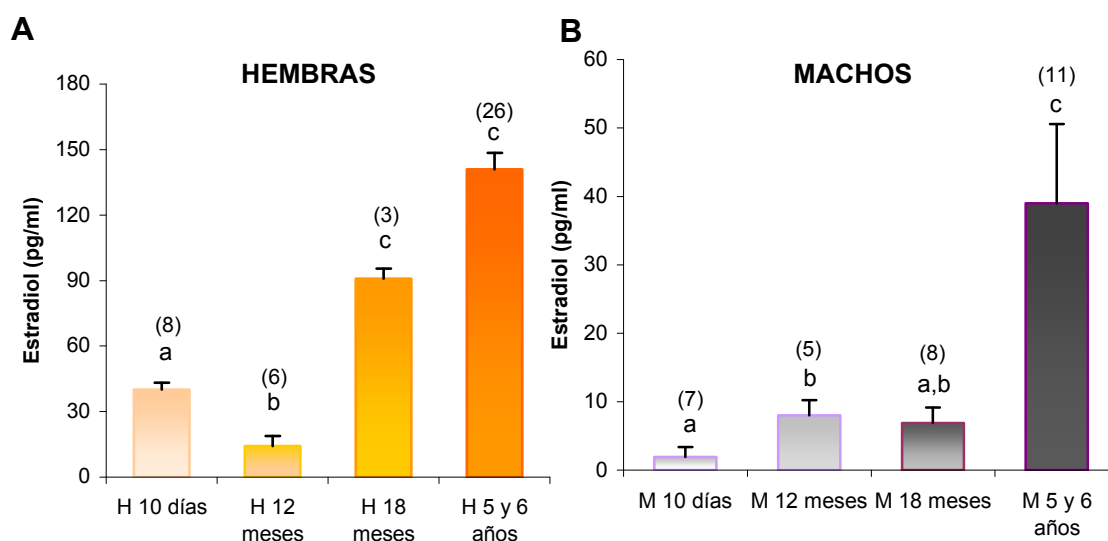
### 4.3.1.1 Estrógenos.

Como se observa en la figura 59A en las hembras juveniles (prepúberes) se observó un incremento sostenido en los niveles circulantes de E2. Este patrón también se observó en los machos, sin embargo en los machos las concentraciones fueron significativamente menores (figura 59B y Tabla 16).

**Tabla N°16:** Niveles de E2 circulante en hembras y machos de diferentes edades

Edad	Hembras (pg/ml)	Machos (pg/ml)
10 días	40,1 ± 3,3 (n=8)	1,9 ± 1,4 (n=7)
12 meses	14,2 ± 4,4 (n=6)	8,0 ± 2,2 (n=5)
18 meses	90,8 ± 4,6 (n=3)	6,9 ± 2,3 (n=8)
5-6 años	140,9 ± 7,5 (n=26)	39,0 ± 11,6 (n=11)

Los valores se expresan con media ± SEM



**Figura 59:** Estradiol circulante en hembras (A) y machos (B) de diferentes edades. Entre paréntesis se colocó el número de animales evaluados y las letras denotan las diferencias entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

En todos los casos las concentraciones de E2 circulante difirieron entre machos y hembras de la misma edad ( $p < 0,05$ ) a excepción en los 12 meses. A esta edad, se observó una tendencia a disminuir los niveles de E2 en los machos respecto a los encontrados en las hembras, pero esta diferencia no fue significativa.



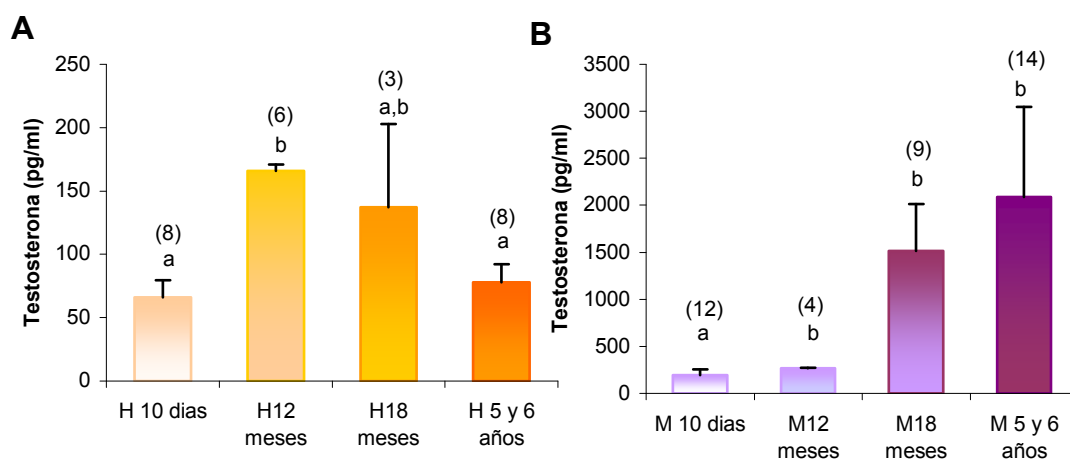
#### 4.3.1.2 Testosterona.

En los mismos sueros utilizados para cuantificar E2 cuantificamos T, observando un patrón diferencial entre machos y hembras que se mantiene en todas las edades estudiadas (tabla 17). En hembras se observó un incremento inicial en los niveles de T circulante que dejó de ser evidente en animales de mayor edad (figura 60A). Contrariamente, en machos se observó un aumento sostenido de los niveles circulantes de T concomitante con la edad (figura 60B).

**Tabla N° 17:** Niveles de T circulante en hembras y machos de diferentes edades

Edad	Hembras (pg/ml)	Machos (pg/ml)
10 días	66,3 ± 13,1 (n=8)	193,3 ± 60,9 (n=12)
12 meses	165,8 ± 5,1 (n=6)	266,3 ± 8,8 (n=4)
18 meses	137,2 ± 65,5 (n=3)	1515,3 ± 499,5 (n=9)
5 – 6 años	77,7 ± 14,7 (n=8)	2088,5 ± 955,0 (n=14)

Los valores se expresan con media ± SEM



**Figura 60:** Testosterona circulante en hembras (A) y machos (B) de diferentes edades. Entre paréntesis se colocó el número de animales evaluados y las letras denotan las diferencias entre los grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2 Efecto de exposición *in ovo* a contaminantes sobre los niveles de hormonas esteroideas sexuales en crías de 10 días de edad

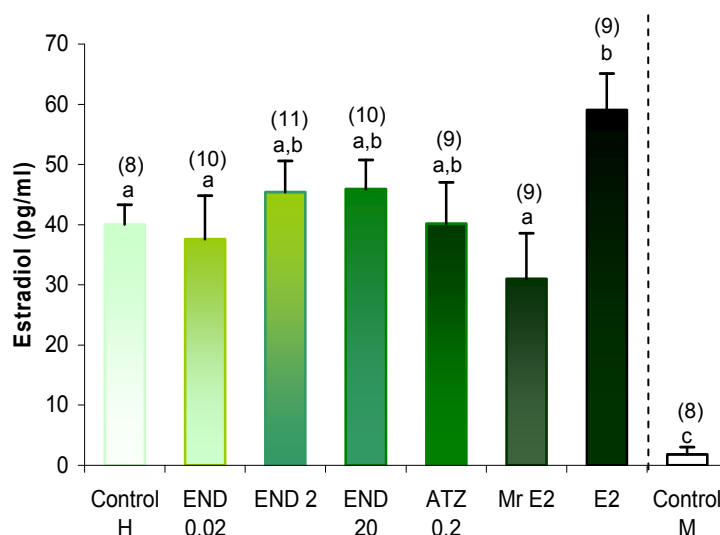
Una vez establecidos los perfiles de E2 y T en condiciones controles evaluamos las concentraciones de ambas hormonas en crías de *C. latirostris*

de 10 días de edad, expuestas *in ovo* a los diferentes compuestos de uso agroindustrial.

#### 4.3.2.1 Estrógenos

Se determinaron las concentraciones séricas en animales de 10 días nacidos de huevos incubados a 30°C y a 33°C que fueron topicados durante la etapa 20 de desarrollo embrionario (etapa de determinación sexual) con vehículo, endosulfán (0,02, 2 y 20 ppm), atrazina (0,2 ppm), E2 (1,4 ppm).

Como habíamos establecido previamente, a pesar de la corta edad de los animales, los niveles de E2 fueron diferentes entre hembras y machos controles. A diferencia de lo que ocurrió en las hembras tratadas *in ovo* con 1,4 ppm de E2 (control positivo), en las que se observó un aumento significativo de los niveles de E2 circulantes respecto a los controles, la exposición *in ovo* a atrazina, y a las diferentes concentraciones de endosulfán no modificó los niveles de E2 (figura 61). Un aspecto interesante a destacar es que los niveles circulantes de E2 en hembras obtenidas por reversión sexual no difieren de los obtenidos en las hembras controles.



**Figura 61:** Representación gráfica de los niveles de E2 sérico en crías hembra de 10 días tratadas *in ovo* con diferentes agentes. En letras (a, b, c) se denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM

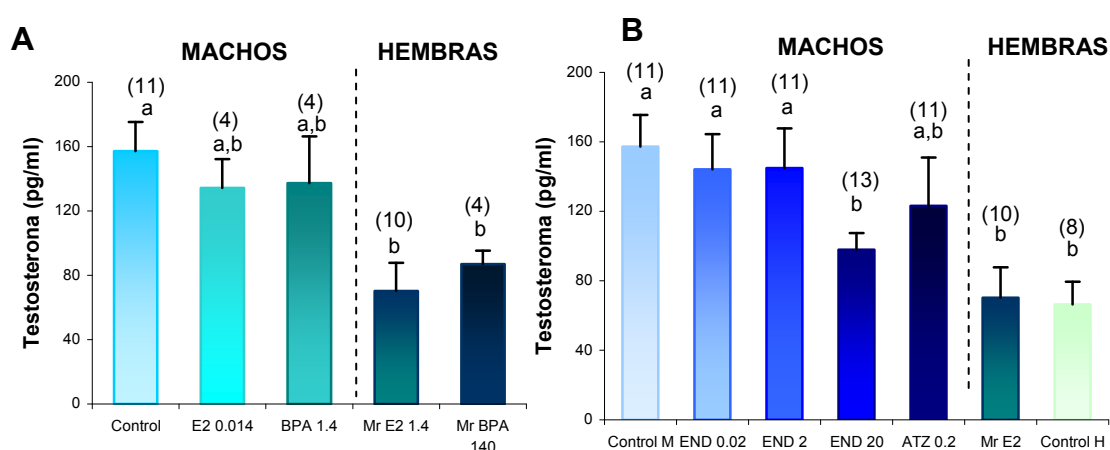
Asimismo se realizó la determinación de los niveles de E2 en machos expuestos a los contaminantes, pero debido a las bajas concentraciones

circulantes, que en ocasiones resultaron indetectables, no se lograron realizar comparaciones estadísticas.

#### 4.3.2.2 Testosterona

La T circulante se cuantificó tanto en hembras como en machos de 10 días de edad. Los resultados obtenidos de la evaluación de esta hormona en machos se representan en la figura 62. Se observó que los machos controles, poseen niveles de T circulante significativamente mayores que los de las hembras controles y que los de hembras producidas por reversión sexual, ya sea por tratamiento con E2 como con BPA. Es decir que, las hembras producidas por reversión sexual tienen los niveles de E2 (figura 61) y de T (figura 62) iguales a las hembras producidas por temperatura de incubación. En los machos tratados *in ovo* con concentraciones de E2 o de BPA que no fueron suficientes como para revertir la acción de la temperatura, los niveles de T fueron más bajos que los de los controles pero las diferencias no alcanzaron a ser significativas (figura 62A).

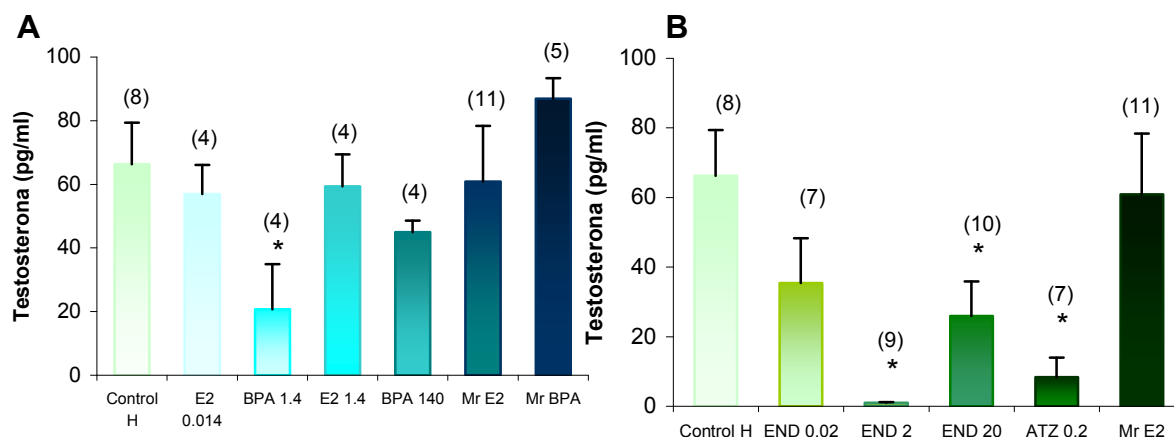
En relación al efecto de la exposición *in ovo* a agroquímicos sobre los niveles de T si bien, en todos los casos, se observó una tendencia a valores menores estos disminuyeron significativamente sólo en el grupo expuesto a endosulfán 20 ppm, que presentó niveles que no diferían de los encontrados en las hembras controles u obtenidas por reversión sexual (figura 62B).



**Figura 62:** Niveles de T circulante en machos *C. latirostris* de 10 días de edad. **A:** Efecto de la acción de E2 y BPA *in ovo* sobre los niveles circulantes de T. **B:** Testosterona sérica en yacarés tratados *in ovo* con pesticidas. En letras (a, b) se muestran las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

Del mismo modo, también se evaluaron los efectos de los contaminantes sobre los niveles de T en las hembras, cuyos resultados se muestran en la figura 63.

Se observaron disminuciones significativas respecto a las hembras controles en los niveles de T circulante de hembras expuestas *in ovo* a BPA (figura 63A) y a las mayores concentraciones de endosulfán y atrazina (figura 63B).



**Figura 63:** Niveles de T circulante en hembras *C. latirostris* de 10 días de edad. **A:** Hembras expuestas *in ovo* a diferentes concentraciones de E2 y BPA. **B:** Hembras expuestas *in ovo* a agroquímicos. Se observaron diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ), denotadas por el asterisco (\*). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

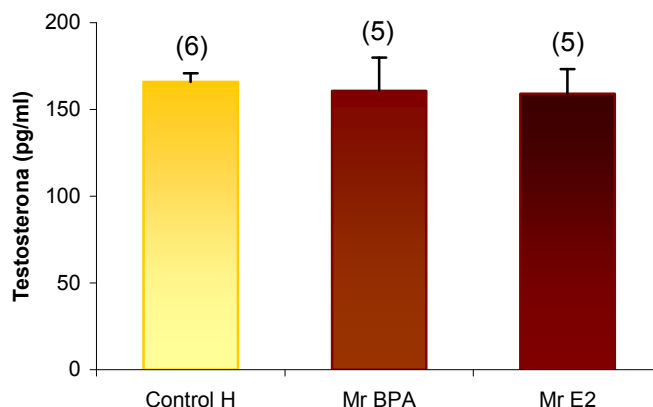
#### 4.3.3 Efectos a largo plazo de la exposición *in ovo* a contaminantes de uso agro-industrial.

Con el objetivo de determinar si los niveles de T y E2 son indicadores de los efectos a largo plazo de la exposición *in ovo* a xenoestrógenos, se evaluaron los niveles de hormonas esteroides sexuales en animales de 1 año de edad que habían sido expuestos *in ovo* a BPA y E2 y luego criados en cautiverio en condiciones controladas y libres de contaminantes.

##### 4.3.3.1 Hembras nacidas por reversión sexual

###### 4.3.3.1.1 Testosterona

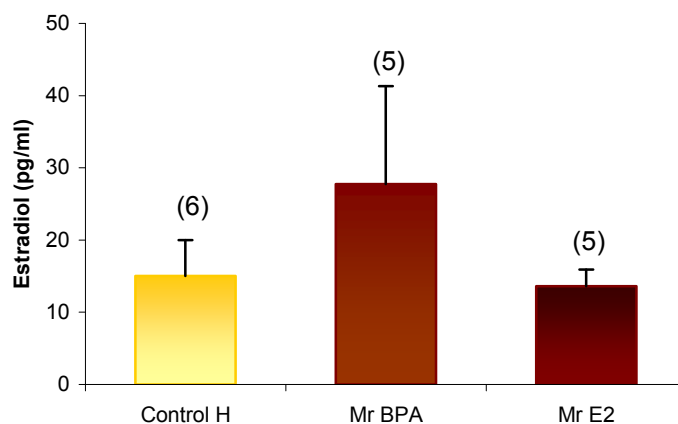
Al determinar los niveles séricos de T en las hembras *C. latirostris* de 1 año de edad, se observó que las hembras producidas por reversión (sea por E2, como por BPA) presentaron niveles de T similares a los de las hembras controles (figura 64).



**Figura 64:** Niveles de T circulante en hembras de 1 año de edad controles y obtenidas por reversión sexual. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

#### 4.3.3.1.2. Estradiol

De manera similar a lo observado con la cuantificación de T, se determinó que las concentraciones circulantes de E2, en las hembras revertidas, tanto por efecto de E2 y BPA *in ovo*, no diferían de las encontradas en las hembras controles (figura 65).



**Figura 65:** Niveles de E2 circulante en hembras controles y obtenidas por reversión sexual de 1 año de edad. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

Estos resultados evidenciaron que la alteración permanente del sexo fue acompañada por niveles hormonales que tampoco fueron modificados a largo plazo, mostrando una clara analogía con las hembras controles para estos parámetros evaluados.

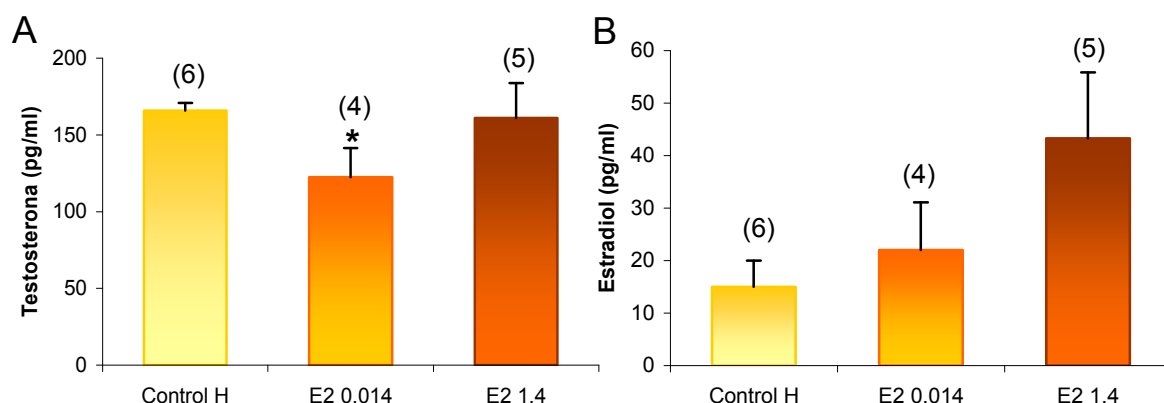
#### 4.3.3.2. Efectos de la exposición a E2 *in ovo* sobre los niveles hormonales de machos y hembras.

Para estudiar los efectos a largo plazo, sobre los niveles hormonales provocados por tratamiento *in ovo* con E2, determinamos T y E2 circulantes en animales de 12 meses de edad, que fueron criados en cautiverio.

En hembras, se observó que la menor concentración evaluada de E2 (0,014ppm), provocó una disminución significativa de los niveles de T respecto a las hembras controles (figura 66A). Este efecto no había sido observado previamente a los 10 días de edad (figura 63A), por lo que se podría decir que este tratamiento provocó una alteración que se sólo manifestó a largo plazo.

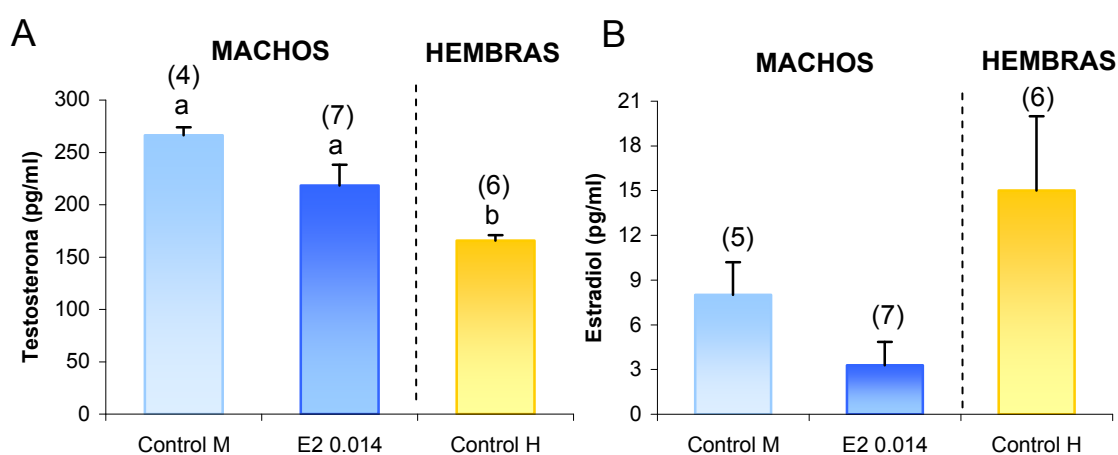
Al evaluar los niveles de E2 circulante en las hembras tratadas *in ovo* con E2 0,014ppm, no observamos diferencias entre los grupos de animales expuestos a las diferentes concentraciones de E2 respecto a las hembras controles (figura 66B). No se pudieron establecer comparaciones con los niveles de E2 de los animales de 10 días de edad que recibieron este mismo tratamiento debido a la falta de volumen necesario para realizar la determinación.

Por otro lado, habíamos observado que las hembras tratadas con la mayor concentración E2 (1,4ppm) *in ovo*, a los 10 días de edad presentaron niveles significativamente mayores de E2 circulante respecto a las hembras controles (figura 61), lo que no se observó a los 12 meses de edad. Este constituiría un ejemplo de una alteración que revirtió a largo plazo.



**Figura 66:** Determinación de hormonas esteroides sexuales circulantes en hembras de 1 año de edad sometidas a diferentes concentraciones de E2 *in ovo*. **A:** Testosterona. **B:** Estradiol. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

En los machos tratados con E2 *in ovo*, observamos que al año de edad poseían niveles de T circulante no que difirieron de los encontrados en los machos controles, pero sí se diferenciaron respecto a los determinados en hembras (figura 67A). A los 10 días de edad, los machos tratados con E2 tampoco presentaron niveles de T diferentes de los encontrados en los machos controles (figura 62A). Sin embargo, a los 10 días de edad, no se habían observado diferencias entre los machos tratados con E2 y las hembras como se determinó al año de edad, sugiriendo que los efectos observados a los 10 días fueron reversibles.



**Figura 67:** Determinación de hormonas esteroides sexuales circulantes en *C. latirostris* de 1 año de edad controles y tratados a E2 0.014ppm *in ovo*. **A:** Testosterona. **B:** Estradiol. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Las letra (a, b) expresan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

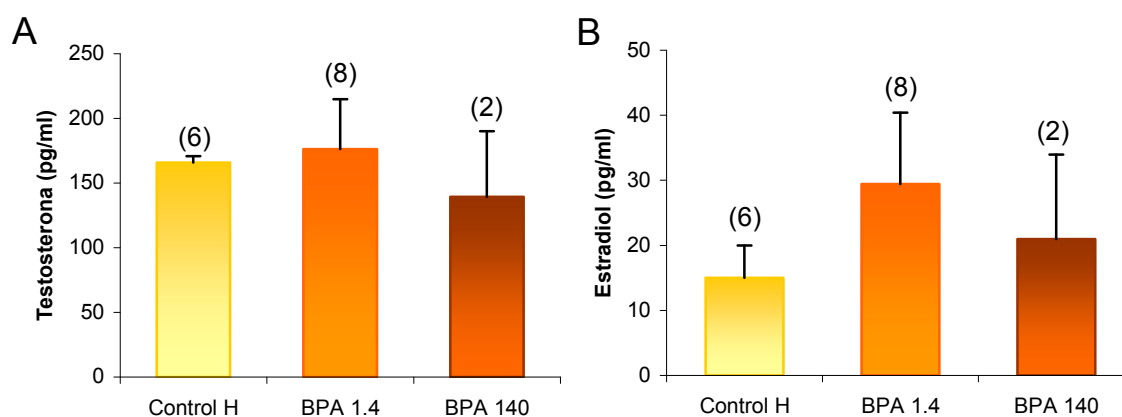
#### 4.3.3.3. Efectos de la exposición a bisfenol A *in ovo* sobre los niveles hormonales de machos y hembras.

Del mismo modo que estudiamos los efectos sobre los niveles hormonales provocados a largo plazo con E2, también lo hicimos con los animales tratados con BPA *in ovo*.

En las hembras de 1 año de edad, no observamos diferencias significativas en las concentraciones circulantes de E2 y T entre los grupos de tratamiento (figura 68). A los 10 días de edad, habíamos observado que la menor concentración de BPA (1,4 ppm) a la que fueron expuestos los animales, provocaron una disminución significativa de los niveles de T respecto a las hembras controles (figura 63A). Esta alteración fue revertida al año de

edad en este grupo de tratamiento, sugiriendo que se trataría de un efecto activacional.

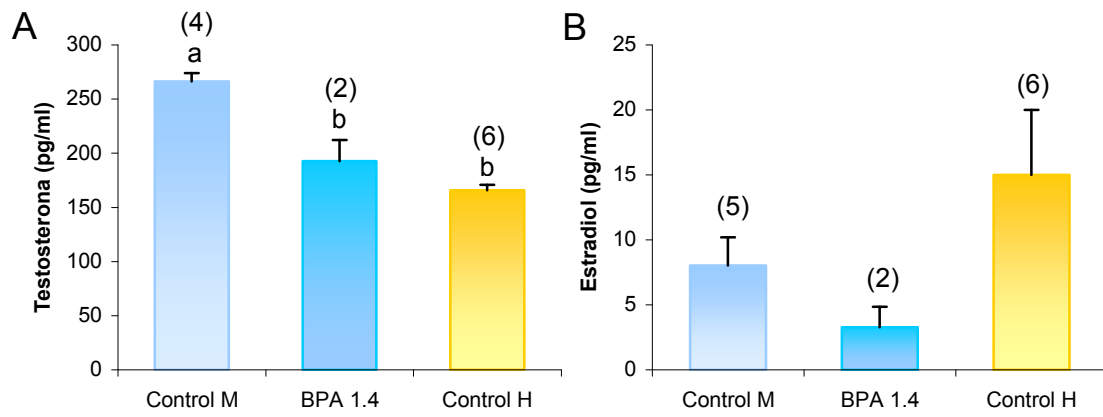
Con respecto a los niveles de E2 circulante, como mencionamos previamente no se encontraron diferencias significativas al tratar los animales *in ovo* con BPA, tal como también fue observado con las hembras tratadas con E2. Probablemente, esta edad (1 año) no sea adecuada para establecer una exposición a xenoestrógenos utilizando la determinación de E2 circulante como biomarcador. Cabe destacar que esta edad tampoco se encontraron diferencias en los niveles circulantes de E2 entre machos y hembras controles.



**Figura 68:** Testosterona (A) y E2 (B) circulantes en hembras de 1 año de edad controles y tratadas con diferentes concentraciones de BPA *in ovo*. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM.

En machos de 1 año de edad, tratados *in ovo* con los diferentes contaminantes, se observó una disminución significativa de los niveles de T respecto al grupo control en los animales tratados con la menor dosis de BPA (1,4 ppm) (figura 69A). Dicho efecto no había sido observado en los animales de 10 días de edad pertenecientes al mismo grupo de tratamiento, aunque cabe destacar que a esa edad se pudo establecer una tendencia a poseer menores concentraciones de T (figura 62A). Además, se observó que en los machos de 1 año pertenecientes a este grupo experimental (BPA 1,4 ppm) los niveles circulantes de T fueron similares a los observados en las hembras controles, tal como fuera establecido también a los 10 días de edad.





**Figura 69:** Testosterona (A) y E2 (B) circulantes en animales de 1 año de edad controles y tratados con BPA 1,4ppm *in ovo*. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Las letra (a, b) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).