

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**“EXPRESIÓN DE AROMATASA CEREBRAL Y GONADAL
Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS GONADALES
COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN
A CONTAMINANTES AMBIENTALES”**

Noelia F. Guyón



2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“EXPRESIÓN DE AROMATASA CEREBRAL Y GONADAL Y
CAMBIOS HISTOLÓGICOS GONADALES COMO
BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES
AMBIENTALES”**

Noelia Fernanda Guyón

Directora de tesis: Dra. María de los Ángeles Bistoni

Co-directora de tesis: Dra. María Valeria Amé

Lugar de realización: Cátedra de Diversidad Animal II

FCEFN- UNC

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

Dra. María de los Ángeles Bistoni, Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA-CONICET-UNC), Cátedra de Diversidad Animal II (FCEfyN-UNC)

Dra. María Julia Cambiasso, Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC).

Dr. Gustavo Manuel Somoza, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-CONICET-Chascomús).

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:.....

Aclaración:

Firma:.....

Aclaración:

Firma:.....

Aclaración:

A mi familia,
a Emiliano y Valentina,
por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Las palabras nunca resultan suficientes para agradecer a todas las personas que colaboran y aportan su granito de arena para que una tesis de doctorado se lleve a cabo. Por eso quiero comenzar agradeciendo profundamente a toda mi familia, a Emiliano y nuestra bebé Valentina, a mis padres, mis hermanos y sobrinos, por su amor incondicional, por estar siempre presentes, por darme ánimo para seguir adelante, por la contención, por entender mis malos momentos y ausencias, por ser el pilar fundamental de mi vida, mi sostén. A mis suegros, cuñadas y familia política por todo su apoyo; especialmente a Ceci y Delfi que cuidaron a Valen para que pudiera terminar la tesis.

A mis directoras de tesis, Dra. María de los Ángeles Bistoni y Dra. María Valeria Amé, por su confianza, su paciencia, su ayuda, sus enseñanzas, por entender mis momentos de crisis y brindarme palabras de aliento.

A la Comisión Asesora de tesis, Dra. María Julia Cambiasso y Dr. Gustavo Manuel Somoza, por su valioso aporte para el desarrollo de este trabajo y el acompañamiento durante todas las etapas del mismo. Especialmente a Gustavo, por abrirme las puertas de su laboratorio y al Dr. Pablo Strobl-Mazzulla por ayudarme con las técnicas de laboratorio.

A todos mis compañeros de trabajo de la Cátedra de Diversidad Animal II (los presentes y pasados): Mari, Gustavo, Andrea, Ricardo, Mariano, Laura, Angelina, Eugenia, Alejo, Sabri y Ricardo B., por el apoyo, los consejos, las charlas, las enseñanzas, la compañía diaria, las risas, los llantos, en fin, la amistad. Especialmente a Ange, en cuya compañía realicé gran parte de esta tesis y fue un sostén muy importante, sin el cual no hubiese sido lo mismo.

Al Dr. Daniel Wunderlin por permitirme realizar parte de este trabajo en las instalaciones del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Químicas.

A todos mis compañeros de mesada del laboratorio de Bromatología, por enseñarme y ayudarme con las tareas de laboratorio, por la compañía, por hacer el trabajo más ameno y por hacerme sentir una más del laboratorio. Especialmente a Vale y Lucas que sufrieron mi primer contacto con la Biología Molecular.

A todas las personas que me acompañaron en el arduo trabajo de campo y se animaron a hacer cosas que “sólo a los biólogos nos gusta hacer”.

A mis amigas y amigos, por acompañarme siempre y por todos los buenos momentos que compartimos, que ayudan a sobrellevar las desventuras del trabajo.

Gracias a todos !!!

PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Guyón, N.F.; Roggio, M.A.; Amé, M.V.; Hued, A.C.; Valdés, M.E.; Giojalas, L.C.; Wunderlin, D.A.; Bistoni M.A. 2012a. Impairments on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality of male fish exposed to 17 β -estradiol. *Environ Toxicol Chem* 31 (5): 935-940.
- Guyón, N.F.; Bistoni, M.A.; Wunderlin, D.A.; Amé, M.V. 2012b. Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality. *J Braz Soc Ecotoxicol* 7 (1): 97-104.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	5
<u>CAPÍTULO 1: Aspectos generales</u>	
1.1 Disruptores endocrinos.....	7
1.2 Biomonitores y biomarcadores. Los peces como indicadores.....	10
1.3 Citocromo P450 aromatasas.....	13
1.4 Estrógenos y receptores de estrógenos	18
1.5 Regulación de la expresión de la aromatasas	19
1.6 Aromatasas como biomarcador	20
1.7 <i>Jenynsia multidentata</i> como indicador	21
1.8 Objetivo general, hipótesis y objetivos específicos	23
1.8.1 Objetivo general	23
1.8.2 Hipótesis.....	23
1.8.3 Objetivos específicos.....	23
<u>CAPÍTULO 2: Aislamiento y cuantificación de la secuencia parcial de ADNc de los genes <i>cyp19a1a</i> y <i>cyp19a1b</i> de la especie <i>Jenynsia multidentata</i></u>	
2.1 Introducción	25
2.2 Materiales y Métodos.....	26
2.2.1 Recolección de peces.....	26
2.2.2 Aislamiento del ARN y Transcripción Reversa (TR)	27
2.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
2.2.4 Análisis filogenético.....	30
2.2.5 PCR en tiempo real.....	30
2.3 Resultados y Discusión.....	31
<u>CAPÍTULO 3: Análisis de biomarcadores en machos expuestos a tóxicos de diferente naturaleza química</u>	
3.1 Aspectos generales	36
3.2 Materiales y Métodos.....	41
3.2.1 Recolección de peces y aclimatación	41
3.2.2 Condiciones de exposición.....	41
3.2.3 Biomarcadores.....	42
3.2.3.1 Índices somáticos.....	42
3.2.3.2 Medición de <i>cyp19a1a</i> y <i>cyp19a1b</i>	42
3.2.3.3 Análisis histológico.....	43
3.2.4 Análisis estadístico.....	43
3.3 Sección A-17 β -estradiol (E ₂)	44
3.3.1 Introducción.....	44
3.3.2 Condiciones de exposición.....	45
3.3.3 Resultados	46

3.3.3.1 Contenido de E ₂ en agua	46
3.3.3.2 Mortalidad e índices somáticos	46
3.3.3.3 Efectos del E ₂ sobre la expresión de aromatasa <i>cyp19a1</i>	47
3.3.3.4 Análisis histológico	48
3.3.4 Discusión	53
3.4 Sección B-17 α -etinilestradiol (EE ₂)	57
3.4.1 Introducción.....	57
3.4.2 Condiciones de exposición.....	59
3.4.3 Resultados	59
3.4.3.1 Mortalidad e índices somáticos.....	59
3.4.3.2 Efectos del EE ₂ sobre la expresión de aromatasa <i>cyp19a1</i>	60
3.4.3.3 Análisis histológico.....	61
3.4.4 Discusión	66
3.5 Sección C-4 <i>n</i> -nonilfenol (NF)	70
3.5.1 Introducción.....	70
3.5.2 Condiciones de exposición.....	72
3.5.3 Resultados	72
3.5.3.1 Contenido de NF en agua	72
3.5.3.2 Mortalidad e índices somáticos.....	73
3.5.3.3 Efectos del NF sobre la expresión de aromatasa <i>cyp19a1</i>	73
3.5.3.4 Análisis histológico.....	74
3.5.4 Discusión	77
3.6 Sección D-17 α -Metiltestosterona (MT).....	80
3.6.1 Introducción.....	80
3.6.2 Condiciones de exposición.....	82
3.6.3 Resultados	82
3.6.3.1 Contenido de MT en agua.....	82
3.6.3.2 Mortalidad e índices somáticos.....	83
3.6.3.3 Efectos de la MT sobre la expresión de aromatasa <i>cyp19a1</i>	83
3.6.3.4 Análisis histológico.....	84
3.6.4 Discusión	88

CAPÍTULO 4: Análisis de biomarcadores en machos de *Jenynsia multidentata* provenientes de sitios con diferente calidad de agua

4.1 Introducción	90
4.2 Materiales y Métodos.....	92
4.2.1 Área de estudio	92
4.2.2 Sitios de estudio	92
4.2.3 Parámetros de calidad de agua	94
4.2.4 Recolección y procesamiento de las muestras	94
4.2.5 Análisis estadístico.....	95
4.3 Resultados	95
4.3.1 Parámetros de calidad de agua	95
4.3.2 Biomarcadores.....	97
4.3.2.1 Índices somáticos.....	97
4.3.2.2 Expresión de los genes <i>cyp19a1</i>	100
4.3.2.3 Análisis histológico.....	102
4.4 Discusión.....	107

<u>CAPÍTULO 5</u> : Consideraciones finales.....	114
<u>CAPÍTULO 6</u> : Bibliografía	119
APÉNDICES.....	152

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

APEOs: alquilfenoles polietoxilados

ARN: ácido ribonucleico

Ct: “threshold cycle”, ciclo de PCR donde ocurre un aumento en la fluorescencia sobre el nivel de fondo

Cyp19: Citocromo P450 aromatasa

C19: 19 átomos carbonos

DBO-5: demanda biológica de oxígeno a los 5 días

DDT: diclorodifeniltricloroetano

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DVB-CAR-PDMS: Divinilbenceno- Carboxeno-Polidimetilsiloxano

EDCs: “endocrine disrupting chemicals”, químicos disruptores endocrinos

Ecp: espermatoцитos primarios

Ecs: espermatoцитos secundarios

EE₂: 17 α -etinilestradiol

ERE: elementos de respuesta a estrógenos

Et: espermátidas

Ez: espermatozoides

E₂: 17 β -estradiol

FC: factor de condición

H&E: hematoxilina-eosina

ICA: Índice de Calidad de Agua

IGS: índice gonadosomático

IHS: índice hepatosomático

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LD: límite de detección

ME₂: 17 α -metilestradiol

M-MLV: "Moloney Murine Leukemia Virus"

MS222: tricafina metanolsulfonato

MT: 17 α -metiltestosterona

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NMP: número más probable

NF: 4*n*-nonilfenol

PCBs: bifenilos policlorados

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PTE: planta de tratamiento de efluentes

RE: receptores de estrógeno

SPME-GC-MS: Microextracción en fase sólida- Cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masas

T: testosterona

TR: Transcripción Reversa

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue realizar un análisis integral, que contemple el efecto de la exposición a contaminantes ambientales sobre biomarcadores de diferentes niveles de organización (moleculares, histológicos y somáticos) en peces. Para ello se evaluó la respuesta de los genes *cyp19a1* (aromatasa), la histología de las gónadas y los índices somáticos en machos de la especie íctica autóctona *Jenynsia multidentata* tanto en condiciones de laboratorio como a campo. En bioensayos se analizaron los cambios en los biomarcadores frente a la exposición a 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, $4n$ -nonilfenol y 17α -metiltestosterona; mientras que a campo se realizó una caracterización de la calidad del agua y de los niveles de expresión de los genes *cyp19a1*, y se compararon las respuestas de los biomarcadores entre dos sitios con diferente calidad de agua de la cuenca del Río Suquía.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la aromatasa cerebral responde como un biomarcador sensible frente a la exposición a compuestos que presentan actividad estrogénica en condiciones de laboratorio, respondiendo incluso ante la concentración más baja de estos compuestos. El análisis histológico de los testículos reveló un gran impacto de la exposición a los diferentes químicos sobre este órgano. A diferencia de lo observado a nivel molecular y tisular, los índices somáticos (Factor de Condición, Índice Hepatosomático e Índice Gonadosomático) no mostraron marcados cambios frente a la exposición a compuestos estrogénicos.

A campo se observaron fluctuaciones de la expresión de la aromatasa cerebral a lo largo del año, siendo máxima durante la estación reproductiva en ambos sitios de muestreo, sugiriendo su implicancia en el control del ciclo reproductivo. Se observó un desfase en el incremento de la expresión del gen entre los sitios, registrándose el aumento con un mes de retraso en el sitio contaminado respecto al de referencia, lo cual podría estar relacionado con desfases en el comienzo del ciclo reproductivo. Los índices somáticos revelaron efectos adversos debidos a la exposición a poluentes ambientales y la histología de los testículos se vio severamente afectada en el sitio contaminado, evidenciando lesiones que incluyeron la desorganización del tejido testicular, alteraciones severas de las células germinales, presencia de células vacuolares, desincronización del proceso de espermatogénesis y necrosis.

Las concentraciones de los compuestos utilizados para los ensayos de laboratorio se encuentran dentro del rango detectado en aguas superficiales de Argentina, demostrando que los peces están expuestos a estos niveles de contaminantes en el ambiente. Los cambios deletéreos observados en *J. multidentata* frente a la exposición crónica a contaminantes ambientales (tanto en condiciones de laboratorio como a campo), podrían afectar su capacidad reproductiva y representar una amenaza para la especie.

ABSTRACT

The overall aim of this Doctoral Thesis was to perform an integral analysis that considers the effect of exposure to environmental contaminants on biomarkers of different levels of organization (molecular, histological and somatic) in fish. For that purpose the response of genes *cyp19a1* (aromatase), the histology of the gonads and somatic indexes were evaluated in males of the native fish species *Jenynsia multidentata* both under laboratory and field conditions. In bioassays, changes in biomarkers were analyzed after exposure to 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, 4*n*-nonylphenol and 17 α -methyltestosterone. In the field, both water quality and expression levels of *cyp19a1* genes were characterized and the responses of biomarkers were compared between two sites with different water quality in the Suquía River Basin.

The results obtained in this investigation demonstrate that brain aromatase is a sensitive biomarker of exposure to compounds which have estrogenic activity in laboratory conditions, even responding to the lowest chemical concentration tested. Histological analysis revealed a large gonads impact from exposure to the studied compounds. Unlike what was observed at the molecular and tissue level, somatic indexes (Condition Factor, Gonadosomatic Index, and Hepatosomatic Index) did not show changes after the exposure to estrogenic compounds.

In field studies, a fluctuation was observed in the expression of brain aromatase throughout the year, being highest during the breeding season in both sampling sites, suggesting its implication in the control of the reproductive cycle. When making a comparison between the study sites, a mismatch in the increase of the gene expression, which begins with a one month delay in the contaminated site relative to reference, was observed. This fact could be related to offsets in the beginning of the reproductive cycle. Somatic indexes revealed adverse effects due to exposure to environmental pollutants and histology of the testes was severely affected by the contaminated site, showing injuries that included disorganization of testicular structure, severe alterations of germ cells, vacuolated cells, desynchronization of spermatogenesis process and necrosis.

The concentrations of compounds used for the laboratory tests are within the range detected in surface waters in Argentina, demonstrating that fish are exposed to these levels of contaminants in the environment. Deleterious changes observed in *J.*

multidentata after chronic exposure to environmental pollutants (both under laboratory and field conditions), could affect its reproductive capacity and represent a threat to the specie.



CAPÍTULO 1
Aspectos Generales

1.1 *Disruptores endocrinos*

La creciente contaminación de los cuerpos de agua a nivel mundial por compuestos químicos fabricados por el hombre es un hecho indiscutido. Las actividades antrópicas y el modo de utilización de los tóxicos han alterado los procesos físicos, químicos y biológicos de las fuentes de agua, afectando en consecuencia a la biota (Jobling & Owen, 2013). Estos compuestos ingresan en los cursos de agua por diferentes rutas, incluyendo aplicación directa, descargas de efluentes urbanos e industriales y escorrentía superficial desde fuentes difusas como campos aledaños, deposición de material particulado, lluvia, fumigación aérea, entre otras. Una vez que ingresan en el ambiente, pueden dispersarse y persistir por mucho más tiempo de lo que se estimaba, y significar una amenaza tanto para la vida silvestre como para el hombre mismo (Vos et al., 2000; Fox, 2001; Curtis & Skaar, 2002). La preocupación que genera la degradación incompleta de estos compuestos, su ocurrencia en ríos y su toxicidad para las especies acuáticas ha conducido a un notable incremento en su estudio (Snyder, 2008). Sin embargo, a pesar de la vasta literatura dedicada a este tópico, el conocimiento y entendimiento actual es aún muy escaso para permitir una total comprensión de los mecanismos de acción y posibles efectos de estos compuestos en los seres vivos. Muchos químicos naturales y sintéticos presentes en el ambiente ejercen efectos adversos sobre los organismos provocando disrupción endocrina. Esos compuestos se denominan químicos disruptores endocrinos (“endocrine disrupting chemicals”, EDCs) e incluyen un amplio rango de moléculas. Entre ellas podemos mencionar pesticidas, herbicidas, bifenilos policlorados (PCBs), metales pesados, alquilfenoles, fármacos, compuestos naturales como fitoestrógenos y micoestrógenos (que se encuentran en plantas y hongos), así como hormonas naturales y sintéticas.

Estos compuestos son capaces de interferir a través de varios mecanismos con el sistema endocrino, existiendo una fuerte evidencia de que pueden alterar el crecimiento, comportamiento, reproducción y actividad inmune en los organismos, provocando efectos adversos tanto a nivel individual como poblacional (Vos et al., 2000; Mills & Chichester, 2005; Ortiz-Zarragoitía & Cajaraville, 2005; Vajda et al., 2011; Jobling & Owen, 2013; Wen et al., 2013).

Los EDCs actúan imitando o antagonizando las hormonas endógenas, alterando el patrón normal de síntesis, almacenamiento, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción y eliminación de las hormonas o modificando los niveles de sus receptores (Kavlock et al., 1996; Sonnenschein & Soto, 1998). En el ambiente acuático, la habilidad de un EDC para afectar a un individuo o población puede depender de un gran número de factores tanto inherentes al compuesto (como la potencia, eficacia y concentración) como a la biota (estadío de vida, sensibilidad, movilidad del individuo) y a factores ambientales (presencia de otros EDCs, estación del año, temperatura).

Entre los disruptores endocrinos más importantes se encuentran los estrógenos ambientales o xenoestrógenos (compuestos que mimetizan la acción de hormonas naturales estrogénicas) tanto naturales como sintéticos. Estos compuestos merecen una particular atención tanto por su alto nivel de actividad biológica como por su potencial para provocar efectos indeseables a escala poblacional, ya que se caracterizan por alterar el desarrollo y la maduración sexual tanto de organismos invertebrados como vertebrados (Gillesby & Zacharewski, 1998; Jobling & Owen, 2013).

Los receptores de hormonas esteroideas son promiscuos en relación a la unión de ligandos y muchos EDCs pueden unirse con más de un tipo de receptor esteroideo (Cooper & Kavlock, 1997); en particular, el receptor de estrógenos es capaz de unirse a diferentes análogos de estrógenos así como compuestos no esteroideos de diversa estructura (Anstead et al., 1997). Esto hace posible que muchos xenoestrógenos puedan unirse a los receptores de estrógeno (RE) con una afinidad idéntica o similar a la hormona endógena (17 β -estradiol), y estimular una respuesta biológica similar a la producida por ésta (Jobling & Sumpter, 1993; Korner et al., 2000; Mills & Chichester, 2005).

Los compuestos estrogénicos provienen de una gran variedad de fuentes tales como papeleras, industrias, actividades agrícolas y ganaderas, muchas de las cuales pasan a través de sistemas de desagüe y son descargadas en los cursos de agua (Johnson

et al., 2005). A pesar de su capacidad para purificar los efluentes, las plantas de tratamiento de efluentes (PTE) liberan una mezcla compleja de estos compuestos (desechos domésticos, industriales y/o agrícolas) en el ambiente acuático (Jobling et al., 2004; Vajda et al., 2011) y pueden representar fuentes puntuales de EDCs debido a una eliminación incompleta de los contaminantes en los procesos de tratamiento (Gomes et al., 2003; Schaar et al., 2010). Incluso, durante estos procesos algunos compuestos pueden ser activados y/o aumentados (Aguayo et al., 2004). Por ejemplo, los estrógenos naturales son excretados en forma inactiva debido a procesos de conjugación en el hígado; sin embargo, las bacterias que se encuentran presentes en las PTE pueden degradar estos esteroides a compuestos no conjugados y biológicamente activos (Ying et al., 2002), que pueden ejercer su toxicidad sobre los organismos a concentraciones tan bajas como ng/L (Mills & Chichester, 2005; Jobling & Owen, 2013).

Al igual que la mayoría de los cursos de agua que atraviesan grandes ciudades, el Río Suquía, ubicado en la provincia de Córdoba, Argentina, recibe descargas de composición compleja de diversas fuentes (Wunderlin et al., 2001; Nimptsch et al., 2005; Contardo-Jara et al., 2009). Este río provee de agua para consumo y riego de cultivos a los habitantes de distintas poblaciones aledañas a la ciudad de Córdoba y posee también importancia para recreación. Numerosos estudios han demostrado que la ciudad de Córdoba realiza aportes de gran magnitud, provenientes de efluentes industriales, municipales, aguas de escorrentía y vertidos clandestinos, tanto industriales como domésticos, directamente al lecho del Río Suquía. Esto provoca un grave impacto ambiental que acelera los procesos de degradación de la calidad de sus aguas y repercute en los componentes de la biota acuática, habiéndose detectado cambios a nivel bioquímico, molecular y morfológico en diversos organismos por acción de la contaminación, así como también variaciones en la estructura de las comunidades de peces (Pesce & Wunderlin, 2000; Hued & Bistoni, 2002, 2005; Guzmán et al., 2004; Cazenave et al., 2005; Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Guyón et al., 2012b; Hued et al., 2012; Maggioni et al., 2012). La contaminación del río es muy elevada aguas abajo de la planta de tratamientos de efluentes cloacales de Bajo Grande (PTE), donde debido al constante ingreso de los líquidos cloacales se ha detectado la presencia de hormonas tales como estradiol, estrona, testosterona, androstenediona, dihidrotestosterona y metiltestosterona (Valdés et al., 2012). La expansión de la frontera agrícola en el margen Este de la ciudad contribuye con el ingreso al río de

pesticidas ampliamente utilizados en campos aledaños, en consecuencia, se han detectado en el río compuestos como atrazina, endosulfán-sulfato, acetoclor, clorpirifos y cipermetrina (Bonansea et al., 2013a).

1.2 Biomonitores y biomarcadores. Los peces como indicadores

Las especies silvestres que viven en ecosistemas contaminados con EDCs muestran una variedad de alteraciones reproductivas (Jobling et al., 1998, 2002a, 2002b; Vajda et al., 2008; Harris et al., 2011; Hou et al., 2011) y se sospecha que la exposición a estos compuestos puede ser la causa de numerosos desórdenes reproductivos observados tanto en humanos como en la naturaleza (Colborn, 1996; Guillette & Gunderson, 2001; McLachlan, 2001; Milnes et al., 2006; Jobling & Owen, 2013). Por vivir en el ambiente acuático, los peces son blancos primarios para los EDCs, donde estos compuestos están fácilmente biodisponibles a través de una variedad de rutas como la respiración acuática, la osmorregulación, la transferencia materna de contaminantes en la reserva de lípidos del huevo, el contacto dérmico con sedimentos contaminados y la ingestión de alimento contaminado (Van Der Kraak et al., 2001). El crecimiento, desarrollo y reproducción de los peces son etapas ecológicamente relevantes y sumamente sensibles a los estresores ambientales (Billard, 1981; Goede & Barton, 1990), de modo tal que estos organismos son excelentes biomonitores de las potenciales amenazas de disrupción endocrina producida por diferentes compuestos químicos (Kime, 1999).

Muchos estudios se han dedicado a comprender las causas de la disrupción endocrina en peces, no sólo porque estos animales a menudo están expuestos a múltiples fuentes de EDCs y se han detectado diversas alteraciones posiblemente causadas por la exposición a los mismos (Sumpter, 1998; Eggen & Segner, 2003; Segner et al., 2003; Goksøyr, 2006; Guillette & Edwards, 2008), sino también debido a la posibilidad de extrapolación y predicción de riesgo para los vertebrados superiores, incluyendo los humanos, ya que el sistema endocrino y las vías de señales moleculares de los peces son similares a otros vertebrados (Takatsuki & Yamaguchi, 2001; Segner, 2009). Esto sugiere que más allá de las diferencias entre especies, tejidos, estadíos de vida, etc; si un químico puede unirse a RE en peces y provocar una determinada

respuesta, posiblemente también puede unirse a los RE de los humanos y otros vertebrados (Welshons et al., 2003). Algunos de los problemas que se han detectado en poblaciones de peces expuestos a EDCs, incluyendo la disminución de la fecundidad, anormalidades gonadales, patrones de comportamiento alterados y la respuesta al estrés y las enfermedades, han sido observados también en seres humanos (Colborn, 1996), de modo tal que los peces pueden proporcionar una alerta temprana de efectos que más tarde pueden ser evidentes en otras especies.

En un ambiente acuático degradado, particularmente donde los contaminantes se encuentran en concentraciones subletales y crónicas, los cambios en la estructura y función de los organismos ocurren más frecuentemente que su mortalidad en masa y sus efectos pueden medirse a través de respuestas biológicas detectables a nivel de células, tejidos u órganos de cada individuo. Estas respuestas se denominan biomarcadores y se definen como un cambio en la estructura celular o bioquímica, función, o comportamiento que es medible en un organismo o parte de un organismo como órganos, heces, orina o bilis (Hansen, 2003; van der Oost et al., 2003). Estas mediciones son utilizadas para evaluar cambios en los niveles basales que pueden ser atribuidos a la exposición a cierto grupo de condiciones y que indica una desviación del estado normal de dicho individuo, permitiendo detectar daños tempranos en los ecosistemas debidos al estrés ambiental. Los biomarcadores pueden ser utilizados para medir la exposición a estresores químicos, físicos o biológicos (van der Oost et al., 2003) y se utilizan como complemento de técnicas de monitoreo químico para analizar la calidad del agua en los medios acuáticos (Lauenstein & Daskalakis, 1998; Watanabe et al., 1999; Richman et al., 2011). Entre los diversos biomarcadores que pueden ser estudiados, se encuentran las enzimas de biotransformación y sus productos, la actividad de las enzimas antioxidantes, parámetros hematológicos e inmunológicos, parámetros reproductivos y endocrinos, mediciones de genotoxicidad y estimaciones morfológicas, fisiológicas o histológicas (van der Oost, 2003).

Los índices órgano-somáticos proveen una estimación relativamente simple y rápida de la salud del pez en su ambiente (Goede & Barton, 1990). Además, pueden reflejar la exposición a tóxicos ya que son manifestaciones de alteraciones bioquímicas y fisiológicas expresadas a nivel de organismo (Goede & Barton, 1990). Estos índices, como el factor de condición de Fulton (FC), el índice hepatosomático (IHS), y el índice gonadosomático (IGS) proveen evidencia de la salud general de un pez y son una

medida de la respuesta biológica a nivel individual. El FC relaciona la masa del pez con su longitud (Fulton, 1904), y generalmente, cuanto mayor es el FC mayor es el contenido de grasa del pez y hay más energía disponible (Neff & Cargnelli, 2004). El IHS relaciona la masa del hígado respecto a la masa del pez y se utiliza de manera general para evaluar el daño hepático (Schweer, 2002), mientras que el IGS relaciona la masa de las gónadas respecto a la masa del pez y es utilizado para detectar alteraciones relacionadas con la reproducción de los organismos. Tanto machos como hembras son susceptibles a los efectos de los EDCs, y en ambos sexos el tamaño de las gónadas puede verse alterado ante la exposición a tóxicos (Jobling et al., 1996; Gimeno et al., 1998b; Sohoni et al., 2001; Schweer, 2002; Barber et al., 2007; Douxfils et al., 2007; Hinfray et al., 2010).

Por otra parte, el impacto que un tóxico ejerce sobre los organismos puede evidenciarse a través de alteraciones histológicas, las cuales constituyen una herramienta muy valiosa para estudios de toxicidad. Los compuestos con actividad de disrupción endocrina producen cambios histológicos en las gónadas, que pueden ser predictivos del “fitness” reproductivo del individuo y de la población en estudio. Los peces expuestos a xenohormonas exhiben un rango de problemas reproductivos que incluyen el desarrollo restringido de las gónadas (Metcalf et al., 2001; Van den Belt et al., 2003; Martyniuk et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2010), y alteraciones en la histología gonadal tales como cambios en la proporción de tipos celulares en los testículos (Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Silva et al., 2012), muerte de células germinales, hipertrofia de células de Sertoli (Kinnberg et al., 2000), disminución del esperma eyaculado o de la movilidad espermática (Baatrup & Junge, 2001; Bayley et al., 2002; van der Ven et al., 2003; Aravindakshan et al., 2004; Kristensen et al., 2005); e incluso presencia de ovocitos en testículos (Gray & Metcalfe, 1997; Metcalfe et al., 2001; Zhong et al., 2005).

Los índices somáticos y las alteraciones histológicas se encuentran entre los biomarcadores más utilizados para proveer una estimación de la salud general y reproductiva de los peces. Sin embargo, los cambios en estos indicadores pueden ser atribuidos a un gran número de factores lo cual hace difícil establecer una relación directa con la presencia de tóxicos en el agua, por lo cual frecuentemente se utilizan en combinación con otros biomarcadores específicos. En este sentido, la ciencia está avanzando hacia el estudio de respuestas biológicas que permitan una detección aún

más temprana del efecto que un tóxico ejerce debido a la contaminación del ambiente (Contardo-Jara & Wiegand, 2008) y que puedan ser relacionados con un tipo de contaminante en particular. De este modo, la evaluación de cambios en la expresión de genes emerge como la herramienta molecular más prometedora.

La enzima citocromo P450 aromatasa (Cyp19a1), codificada por los genes *cyp19a1*, cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos. Estos genes son blanco potenciales para compuestos que actúan como disruptores endocrinos (Cheshenko et al., 2008), por lo cual en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo de investigación tendiente a detectar cambios en su expresión o actividad en respuesta a la presencia de contaminantes en el agua (Orlando et al., 2002; Noaksson et al., 2003; Lavado et al., 2004; Greytak et al., 2005; Douxfils et al., 2007; Hinfray et al., 2010; Geraudie et al., 2011).

1.3 Citocromo P450 aromatasa

Las hormonas, incluyendo los esteroides sexuales, están involucradas en el control de una gran cantidad de funciones fisiológicas que van desde el metabolismo a la reproducción y cognición. Los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) son los factores endógenos clave para el control endocrino de la reproducción en los vertebrados (Simpson et al., 2002). La enzima esteroideogénica Citocromo P450 aromatasa (Cyp19a1) es un miembro de la superfamilia de Citocromo P450 que cataliza la conversión de andrógenos de 19 carbonos como la testosterona y androstenediona en estrógenos de 18 carbonos como el estradiol y la estrona, respectivamente (Simpson et al., 1994). Esta superfamilia está compuesta por más de 480 miembros distribuidos en 74 familias, de los cuales la aromatasa es el único miembro de la familia 19 (Nelson et al., 1993). El complejo catalíticamente activo está formado por una citocromo P450 aromatasa y una flavoproteína, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo P450 reductasa, que facilita el flujo de electrones necesarios para la oxidación del sustrato (Conley & Hinshelwood, 2001).

La aromatización de andrógenos a estrógenos tiene lugar en el retículo endoplasmático liso, al cual se halla anclado el complejo enzimático. Para la conversión del sustrato se requieren tres moléculas de NADPH y de oxígeno por molécula de

estrógeno formado. El NADPH provee los equivalentes reducidos que son transferidos vía la flavoproteína a la citocromo P450 aromatasa, la cual se une al sustrato e inserta el oxígeno en la molécula mediante tres hidroxilaciones secuenciales (Fig. 1.1). La primera hidroxilación tiene lugar en la posición C19 (grupo metilo) para generar el alcohol C19. La segunda hidroxilación ocurre también en la posición C19, resultando en la pérdida de una molécula de agua y la formación del aldehído C19. El mecanismo exacto de la tercera hidroxilación no se conoce con certeza, pero puede tener lugar en la posición C19 resultando en la pérdida del grupo metilo C19 como ácido fórmico y la aromatización del anillo A (Lephart, 1996).

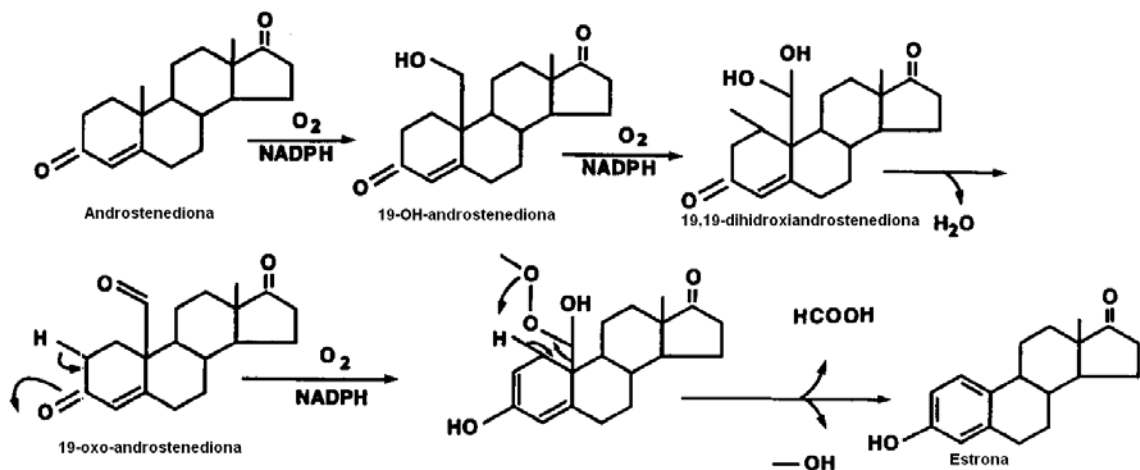


Figura 1.1 Representación esquemática del proceso de aromatización. Modificada de Lephart (1996).

La citocromo P450 aromatasa, producto del gen *cyp19a1*, se encuentra altamente conservada en todos los vertebrados (Callard et al., 1978). En la mayor parte de las especies estudiadas hasta el momento, el cerebro y las gónadas son el principal sitio de expresión de la aromatasa. En los mamíferos se expresa también en otros tejidos tales como hígado, tejido adiposo, riñón, tracto digestivo, piel, placenta y tejido nervioso (Harada et al., 1993; Simpson et al., 2002); mientras que en los peces la expresión en los ojos, hígado, riñón, corazón, músculo, bazo, tiroides, intestino, branquias y sangre, es ocasional (Tchoudakova & Callard, 1998; Chiang et al., 2001; Kishida & Callard, 2001; Trant et al., 2001; Halm et al., 2002; Menuet et al., 2003; Fenske & Segner, 2004; Goto-

Kazeto et al., 2004; Chang et al., 2005; Choi et al., 2005; Strobl-Mazzulla et al., 2005; Sawyer et al., 2006; Wong et al., 2006).

A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos (excepto en el cerdo), en donde existe una copia única del gen *cyp19* y su expresión tejido-específica se regula mediante mecanismos de corte y empalme alternativos (Harada et al., 1993), en los peces teleósteos se han identificado dos genes (*cyp19a1a* y *cyp19a1b*) que codifican para dos proteínas estructural y funcionalmente diferentes de aromatasa P450. Estos genes poseen sus propios mecanismos regulatorios y están diferencialmente programados y regulados durante el desarrollo temprano (Callard et al., 2001; Cheshenko et al., 2008; Vizziano-Cantonnet et al., 2011). *Cyp19a1a*, comúnmente conocida como aromatasa gonadal, se expresa predominantemente en las gónadas jugando un rol muy importante en la diferenciación sexual y el desarrollo de los ovocitos. *Cyp19a1b*, llamada aromatasa cerebral, se expresa principalmente en el cerebro y estaría involucrada en el desarrollo del sistema nervioso central, la supervivencia y morfología neural, sinaptogénesis, neurogénesis, neuroplasticidad, neuroprotección, diferenciación sexual y en el comportamiento sexual y agresivo (Kishida & Callard, 2001; Kishida et al., 2001; Kwon et al., 2001; Trant et al., 2001; García-Segura et al., 2003; Clotfelter & Rodríguez, 2006; Meucci & Arukwe, 2006a; Diotel et al., 2010; Guiguen et al., 2010; Strobl-Mazzulla et al., 2010).

En los peces teleósteos, la actividad de la aromatasa *Cyp19a1b* en el cerebro es unas 10 veces mayor a la observada en el tejido gonadal y de 100 a 1000 veces mayor comparada con el cerebro de los mamíferos (Callard et al., 1993). Dicha actividad se localiza en células de la glía radial que bordean los ventrículos en el telencéfalo, área preóptica, hipotálamo, mesencéfalo e hipófisis (Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2003; Strobl-Mazzulla et al., 2005) (Fig. 1.2). Esta localización en las células de la glía contrasta con lo que ocurre en mamíferos y aves, en donde la expresión de la aromatasa se restringe a las neuronas (Lephart, 1996; Balthazart & Ball, 1998; Zhao et al., 2008). Se ha observado que las células de la glía pueden actuar como progenitoras de nuevas neuronas, por lo cual una hipótesis razonable que justifica esta expresión de aromatasa neural exagerada en el cerebro puede estar relacionada con la capacidad de neurogénesis y la neuroplasticidad observada durante la adultez en los peces teleósteos (Gelinas et al., 1998; Callard et al., 2001; Ekstrom et al., 2001; Zupanc et al., 2005;

Pellegrini et al., 2007; Mouriec et al., 2008; Diotel et al., 2010; Strobl-Mazzulla et al., 2010; Vizziano-Cantonnet et al., 2011).

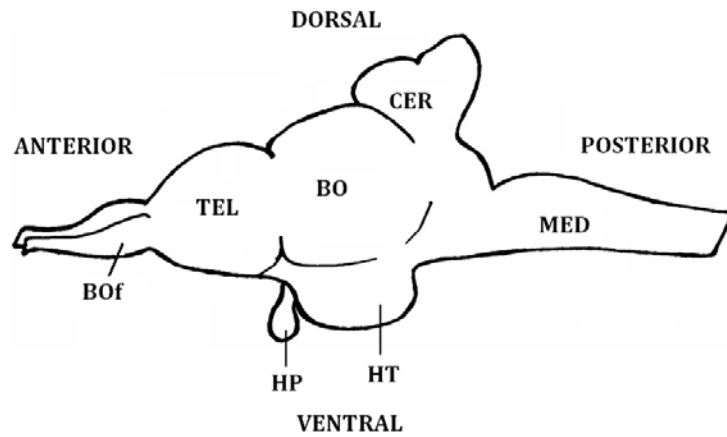


Figura 1.2 Esquema representativo de las principales áreas del cerebro de peces teleosteos. Referencias: BOF: bulbos olfatorios; TEL: telencéfalo; BO: bulbo óptico; CER: cerebelo; MED: médula; HP: hipófisis; HT: hipotálamo.

El rol de la aromatasa cerebral ha sido ampliamente investigado como un regulador de comportamientos específicos del sexo en mamíferos (MacLusky & Naftolin, 1981; Parsons et al., 1984) y aves (Schlinger & Callard, 1990; de Bournonville et al., 2012); y de la reproducción en peces (Pasmanik et al., 1988; Goto-Kazeto et al., 2004; Jeng et al., 2005; Choi et al., 2005; Cheshenko et al., 2008).

La aromatasa se expresa en áreas del cerebro relacionadas con el control de la reproducción y el comportamiento sexual (Naftolin et al., 1975; Balthazart & Ball, 1998; Menuet et al., 2005; Strobl-Mazzulla et al., 2005). Naftolin et al. (1975) postularon que la testosterona (T) es convertida a estradiol (E_2) vía la enzima aromatasa en áreas específicas del cerebro antes de ejercer sus efectos biológicos mediante la unión a RE, sugiriendo por lo tanto, que los efectos masculinizantes de la T gonadal en el comportamiento reproductivo son parcialmente dependientes de su conversión local a E_2 por la aromatasa en el cerebro.

Los neuroesteroides, particularmente los neuroestrógenos, juegan un rol crítico en el desarrollo neural, la diferenciación sexual del cerebro (MacLusky & Naftolin, 1981; McEwen, 1997; Morris et al., 2004) y en el comportamiento reproductivo específico del

sexo (Hutchinson, 1993), mediando efectos organizacionales y activacionales de las hormonas circulantes. En los mamíferos estos neuroesteroides causan un dimorfismo sexual irreversible. En algunas especies de peces se ha observado un dimorfismo sexual en la expresión y actividad de la aromatasa cerebral, en donde los machos muestran mayor actividad que las hembras en áreas denominadas “cerebro reproductivo”, siendo el telencéfalo, el área preóptica y el hipotálamo basal las áreas de mayor densidad de expresión (Forlano et al., 2001; Melo & Ramsdell, 2001; González & Piferrer, 2003; Strobl-Mazzulla et al., 2005).

Estudios en los cuales se relacionan alteraciones en la expresión o actividad de la aromatasa cerebral con el comportamiento sexual de los machos sugieren que es necesaria una función normal de la aromatasa en el cerebro para observar comportamientos sexuales normales (Hallgren et al., 2006; Guyón et al., 2012a). Se han observado, además, diferencias en las tácticas reproductivas de los machos del pez sapo (*Porichthys notatus*) asociadas con distintos niveles de actividad de la aromatasa cerebral (Schlinger et al., 1999).

Por otra parte, la aromatasa se halla implicada en el sentido del olfato. En los ratones se requiere la aromatización de la T para que los machos puedan distinguir mediante señales olfativas cuando una hembra está receptiva (Bakker et al., 2002). En los peces, alteraciones en la expresión o actividad de la aromatasa pueden disminuir la habilidad de los machos para identificar a las hembras a través de señales olfativas (Hallgren et al., 2006) y por lo tanto afectar el comportamiento reproductivo.

A pesar de su relación con el comportamiento sexual y de que la actividad de la aromatasa cerebral es excepcionalmente elevada, el rol del proceso de aromatización en el control del comportamiento sexual de los peces permanece poco claro (Blázquez & Somoza, 2010; Vizziano-Cantonnet et al., 2011). Sin embargo, los resultados presentados anteriormente (Schlinger et al., 1999; Hallgren et al., 2006; Guyón et al., 2012a) sugieren un papel importante en la modulación de comportamientos específicos en los machos.

La regulación de los genes *cyp19a1* determina el balance de andrógenos/estrógenos y es por lo tanto crítica en los procesos de diferenciación sexual y en la reproducción (Trant et al., 2001). Se ha informado que la actividad de la aromatasa en el cerebro está sujeta a variaciones estacionales (Borg et al., 1987; Pasmanik & Callard, 1988; González & Piferrer, 2002) y es máxima durante la época

reproductiva en varias especies de peces tales como *Dicentrarchus labrax* (González & Piferrer, 2003), *Carassius auratus* (Gelinás et al., 1998), *Acanthopagrus schlegelii* (Lee et al., 2000), *Ictalurus punctatus* (Kazeto et al., 2003), *Halichoeres tenuispinis* (Choi et al., 2005) y *Rutilus rutilus* (Geraudie et al., 2011). Esto sugiere que puede estar involucrada en el control del ciclo reproductivo ya sea regulando la maduración final o controlando el comportamiento sexual durante el período reproductivo (González & Piferrer, 2003; Cheshenko et al., 2008). El pico de aromatasa generalmente ocurre en paralelo con el aumento en el IGS (Jeng et al., 2005; Geraudie et al., 2011) y una elevación en la concentración de esteroides en plasma, sugiriendo ya sea un rol de la actividad de la aromatasa cerebral en la maduración gonadal o su sensibilidad a esteroides plasmáticos elevados (Trant et al., 2001; Blázquez et al., 2008; Geraudie et al., 2011).

1.4 Estrógenos y receptores de estrógenos

En los vertebrados los estrógenos influyen en numerosos procesos fisiológicos incluyendo la ovogénesis, vitelogénesis, la producción de gonadotropina en la hipófisis, el desarrollo testicular y otros aspectos de la reproducción, crecimiento y homeostasis general, ejerciendo sus efectos en tejidos blanco (Nilsson et al., 2001; Martyniuk et al., 2006; Zhang & Trudeau, 2006). Debido a que son hormonas lipofílicas difunden dentro de la célula y se unen a RE intracelulares para inducir la transcripción de genes específicos. La unión a su ligando (E_2), facilita la activación y dimerización del receptor y la unión a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en la región promotora de la mayoría de los genes blanco para estrógenos que han sido estudiados. De esta manera, modula la transcripción a través de interacciones con otros factores de transcripción y componentes de complejos de iniciación de la transcripción (Hall et al., 2002). Este tipo de mecanismo genómico requiere de horas a días para llevarse a cabo. Sin embargo, además de unirse a receptores nucleares, el E_2 interactúa con receptores transmembrana para ejercer efectos bioquímicos y fisiológicos rápidos en algunas células (Levin, 2001; Zhang & Trudeau, 2006).

1.5 Regulación de la expresión de la aromatasa

El hecho de que tanto tratamientos con andrógenos aromatizables como con estrógenos produzcan un incremento en la expresión de *cyp19a1b* (Pasmanik et al., 1988; Gelinas et al., 1998; Kishida et al., 2001; Kazeto & Trant, 2005; Sawyer et al., 2006; Vosges et al., 2011), sugieren que los estrógenos pueden formar parte de una retroalimentación positiva autorreguladora mediante la cual promueven la expresión de su propia enzima biosintética (Callard et al., 2001). Esta regulación estrógeno dependiente implica la existencia de RE funcionales y la unión de este complejo ligando-RE a ERE y $\frac{1}{2}$ ERE que se encuentran localizados en la región promotora de *cyp19a1b* (Tchoudakova et al., 2001; Menuet et al., 2005; Le Page et al., 2006). La regulación de *cyp19a1b* también requiere de un factor glial específico que se une a un elemento de respuesta glial que actúa de modo sinérgico con la secuencia ERE (Le Page et al., 2008, 2010) (Fig. 1.3). Este mecanismo le confiere al gen *cyp19a1b* una alta sensibilidad a los estrógenos y una especificidad en las células de la glía radial.

Por el contrario, no se han detectado ERE en la secuencia promotora de *cyp19a1a* (Kazeto et al., 2001; Tchoudakova et al., 2001), y los reportes de efectos de tratamientos con estrógenos en la expresión de este gen son inconsistentes (Kishida et al., 2001; Kazeto et al., 2004; Hinfrey et al., 2006a), de modo tal que la implicancia de los esteroides en la regulación de la expresión de la aromatasa gonadal no es clara.

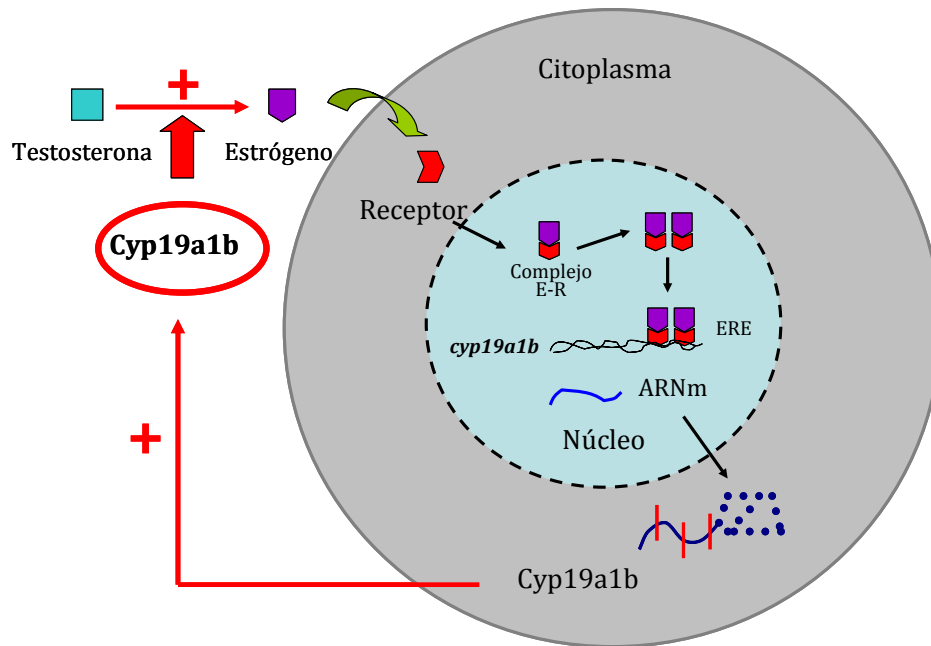


Figura 1.3 Esquema representativo de la regulación de la expresión de la aromatasa cerebral. Modificado de Denslow & Sepúlveda (2007).

1.6 Aromatasa como biomarcador

La aromatasa es considerada un posible blanco para los EDCs debido a que la modulación de su expresión y función puede alterar dramáticamente la tasa de producción de estrógenos afectando los niveles locales y sistémicos, y de este modo puede conducir a disrupción de procesos biológicos relacionados con estrógenos (Cheshenko et al., 2008). Existe evidencia de que interferencias con el sistema Cyp19 aromatasa puede conducir a un funcionamiento alterado del sistema reproductivo, el cual es el síntoma más frecuentemente informado de disrupción endocrina en peces (Cheshenko et al., 2008). En los últimos años se han detectado alteraciones de la expresión o actividad de la aromatasa de cerebro y de ovario en peces silvestres colectados en sitios contaminados (Noaksson et al., 2001, 2003; Orlando et al., 2002; Lavado et al., 2004; Greytak et al., 2005; Douxfils et al., 2007; Geraudie et al., 2011; Guyón et al., 2012b), sugiriendo que las poblaciones están expuestas a sustancias que perturban la biosíntesis de estrógenos. Se ha encontrado que ciertos compuestos, muchos de los cuales son frecuentemente detectados en los cursos de agua, tales como el estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, benzo(a)pireno y el o,p-DDT aumentan la

expresión del gen *cyp19a1b* (Melo & Ramsdell, 2001; Halm et al., 2002; Kazeto et al., 2004; Kuhl et al., 2005; Lee et al., 2006; Lyssimachou et al., 2006) en tanto que otros compuestos como el fadrozol, el fungicida clotrimazol y el metilmercurio inhiben la actividad de la aromatasa (Noaksson et al., 2003; Hallgren et al., 2006; Hinfray et al., 2006b). Dado el rol importante que juega esta enzima en la diferenciación sexual, desarrollo, reproducción, y comportamiento, particularmente en el cerebro y las gónadas (Callard et al., 2001), las interferencias con la actividad catalítica o expresión de la aromatasa podría esperarse que resulten, entre otras cosas, en la alteración de procesos endocrinos tales como la producción y maduración del esperma, desarrollo de la pubertad, masculinización y feminización del comportamiento sexual, y la inhibición o estimulación del desarrollo estrógeno dependiente (Lyssimachou et al., 2006).

Como se mencionó previamente, la regulación positiva del estradiol sobre su propia enzima biosintética comprende una autorregulación positiva. Este tipo de mecanismo puede conducir a altos niveles de estrógenos en respuesta a pequeños estímulos y es un blanco potencial para la interacción con xenobióticos que pueden provocar disrupción endocrina en presencia de pequeñas alteraciones en los niveles de estrógenos (Melo & Ramsdell, 2001). De este modo, el gen de la aromatasa podría resultar no sólo un buen biomarcador de exposición a compuestos estrogénicos sino también un gen crítico cuya disrupción puede afectar profundamente el funcionamiento de todo el eje reproductivo (Menuet et al., 2005).

1.7 *Jenynsia multidentata* como indicador

A pesar del incremento en el número de investigaciones que describen compuestos químicos capaces de modificar el sistema endocrino y producir alteraciones en la aromatasa, este esfuerzo de investigación se ha limitado, en general, a un pequeño número de especies del hemisferio norte, principalmente aquellas de importancia comercial. Entre los peces neotropicales, los genes *cyp19a1* han sido descritos sólo en dos especies: *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al., 2005), y *Gambusia holbrooki* (Orlando et al., 2002).

Considerando que la mayoría de los cursos de agua reciben algún tipo de descarga de efluentes, la disrupción endocrina puede estar mucho más expandida de lo

que actualmente se ha documentado. Por lo tanto, identificar biomarcadores en peces nativos que puedan ser utilizados como centinela es extremadamente necesario para contribuir al entendimiento de cómo un EDC puede afectar la sostenibilidad de los peces, y también para conocer y preservar la biota local. Por otra parte, el efecto de un contaminante sobre la biota varía de acuerdo a la especie, el sexo, las concentraciones del tóxico, el tiempo de exposición al mismo y las características físico-químicas del medio, lo cual podría ocasionar que las especies autóctonas respondan de modo diferente a las exóticas. Se propone como modelo de estudio una especie íctica autóctona: *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes), la cual se encuentra ampliamente distribuida en la región neotropical de Sudamérica, desde la provincia de Río Negro (Argentina) a la ciudad de Río de Janeiro (Brasil) (Malabarba et al., 1998). Esta especie presenta la habilidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes, incluyendo aquellos contaminados (Haro & Bistoni, 1996; Malabarba et al., 1998; Hued & Bistoni, 2005), y ha sido utilizada en numerosos estudios de toxicidad en laboratorio y en monitoreos a campo (Cazenave et al., 2005, 2008; Ballesteros et al., 2007, 2009a, 2009b; Pesce et al., 2008; Amé et al., 2009; Hued et al., 2011, 2012; Monferrán et al., 2011; Guyón et al., 2012a, 2012b; Maggioni et al., 2012).

El propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto de la exposición a compuestos que actúan como disruptores endocrinos sobre la especie íctica *Jenynsia multidentata*, en condiciones de laboratorio y a campo, mediante la aplicación de biomarcadores somáticos, histomorfológicos y moleculares.

1.8 OBJETIVO GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.8.1 *Objetivo general:*

- ❖ Evaluar la expresión de la enzima esteroideogénica aromatasa (Cyp19a1) en cerebro y gónadas y cambios histológicos gonadales en machos de la especie íctica autóctona *J. multidentata* como biomarcadores de exposición a contaminantes ambientales en condiciones de laboratorio y a campo.

1.8.2 *Hipótesis:*

- ❖ La exposición en laboratorio a tóxicos de diferente naturaleza química (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, 4*n*-nonilfenol y 17 α -metiltestosterona) produce alteraciones en la expresión de los genes aromatasa *cyp19a1a* y *cyp19a1b* en gónadas y cerebro de peces como así también alteraciones en la histología de los testículos y los índices somáticos.
- ❖ Los peces colectados en un sitio contaminado en la cuenca del Río Suquía presentan niveles de expresión de aromatasa *cyp19a1a* y *cyp19a1b* diferentes a los provenientes de un sitio control, evidenciando la presencia de compuestos con actividad estrogénica en el río. Por otra parte, se observan cambios en la histología de las gónadas y los índices somáticos. Estos biomarcadores pueden ser utilizados como indicadores de la presencia de contaminantes en el agua.

1.8.3 *Objetivos específicos:*

- Aislar y cuantificar la secuencia parcial de ADNc de los genes *cyp19a1a* y *cyp19a1b* de *J. multidentata*.
- Analizar la expresión del ARNm de la aromatasa en gónadas (*cyp19a1a*) y cerebro (*cyp19a1b*) de individuos machos de *J. multidentata* expuestos a tóxicos

de diferente naturaleza química (17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, $4n$ -nonilfenol y 17α -metiltestosterona).

- Determinar alteraciones en la histología gonadal y los índices somáticos de los peces machos de *J. multidentata* expuestos a tóxicos de diferente naturaleza química (17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, $4n$ -nonilfenol y 17α -metiltestosterona).
- Determinar los niveles de expresión de aromatasa en cerebro y gónadas de peces machos de *J. multidentata* provenientes de un sitio de referencia y de un sitio contaminado a lo largo de un ciclo anual.
- Evaluar alteraciones en la histología gonadal y los índices somáticos de los peces machos de *J. multidentata* recolectados en un sitio contaminado comparado con un sitio control.



CAPÍTULO 2

**Aislamiento y cuantificación de la
secuencia parcial de ADNc de los genes
cyp19a1a y *cyp19a1b* de la
especie *Jenynsia multidentata***

2.1 INTRODUCCIÓN

La secuencia de la aromatasa fue inicialmente clonada en el ovario de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Tanaka et al., 1992); sin embargo, la existencia de dos genes que codifican para aromatasa en los teleósteos fue reportada por primera vez en el pez dorado *Carassius auratus* (Tchoudakova & Callard, 1998). A partir de estos descubrimientos, la existencia de dos genes codificando para dos formas de aromatasa se han encontrado en muchas especies de peces, entre ellas *Danio rerio* (Kishida & Callard, 2001; Trant et al., 2001), *Oryzias latipes* (Fukada et al., 1996; Kuhl et al., 2005), *Oreochromis niloticus* (Kwon et al., 2001; Chang et al., 2005), *Pimephales promelas* (Halm et al., 2001), *Dicentrarchus labrax* (Dalla Valle et al., 2002; Blázquez & Piferrer, 2004), *Fundulus heteroclitus* (Greytak et al., 2005; Patel et al., 2006), *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al., 2005), *Gambusia holbrooki* (Orlando et al., 2002), *Ictalurus punctatus* (Trant, 1994), y *Mugil cephalus* (Nocillado et al., 2007).

Probablemente estas dos variantes son el resultado de una duplicación del genoma en un pez ancestral, que se mantuvieron gracias a mecanismos de preservación de la duplicación, mediante mutaciones de las secuencias reguladoras (Force et al., 1999). La retención de ambos genes luego del evento de duplicación, seguido de lo que parece ser una partición de las funciones entre la aromatasa cerebral y la gonadal, indica que la presión de conservación se ejerció sobre ambos genes, destacando la importancia respectiva en ambos tejidos (Diotel et al., 2010; Le Page et al., 2010).

Las secuencias poseen una región “hemo” y un sitio de unión a esteroides altamente conservados entre los vertebrados, mostrando una alta homología con la misma variante de otras especies; sin embargo, el porcentaje de identidad de las dos secuencias aromatasa en una misma especie es cercano al 60%, lo que indica que poseen una larga historia como genes independientes (Kishida & Callard, 2001;

Blázquez & Piferrer, 2004). El árbol filogenético basado en las secuencias de aromatasa identificadas en varias especies de peces segrega a la aromatasa en dos agrupamientos, una rama incluye a la variante de cerebro y otra la gonadal (Callard et al., 2001; Kishida & Callard, 2001).

Mediante estudios utilizando las técnicas de Southern blot y PCR de restricción del ADN genómico, se ha establecido que un único locus codifica para la aromatasa cerebral en tanto que uno o dos loci diferentes codifican para la forma de ovario (Tchoudakova & Callard, 1998).

El objetivo de este capítulo fue aislar la secuencia parcial de ADNc de los genes *cyp19a1a* y *cyp19a1b* de *J. multidentata* y ajustar el método para cuantificar la abundancia de transcritos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Recolección de peces

Debido a que la expresión de la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*) es mayor en ovarios que en testículos, con el fin de aislar las secuencias parciales de ADNc de *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, se utilizaron hembras adultas de *J. multidentata* (Fig. 2.1). Los peces fueron colectados en un sitio no contaminado (Río Yuspe, Córdoba, Argentina, 31° 14' 18"; 64° 31' 14") seleccionado por la buena calidad de sus aguas (Wunderlin et al., 2001; Hued & Bistoni, 2005) utilizando un equipo de pesca eléctrico. Posteriormente fueron transportados al laboratorio dentro de tanques de agua de 20 L y fueron aclimatados durante 2 semanas en una habitación con temperatura controlada a 21±1 °C, con un fotoperíodo de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad. Se mantuvieron en peceras de vidrio con agua de clorada (pH 7.6–7.8, alcalinidad 118 mg/L, dureza 75 mg/L, conductividad 325 mScm⁻¹) y fueron alimentados dos veces al día con alimento deshidratado en escamas (TetraMin). La longitud y el peso estándar (media ± DE) de los individuos al final del período de aclimatación fue 45,83 ± 5,76 mm y 1748 ± 500 mg, respectivamente.

Los ejemplares fueron sacrificados por inmersión en sobredosis de triclaína metanolsulfonato (MS222 500 mg/L) e inmediatamente se extrajeron el cerebro y las gónadas, que fueron congelados con nitrógeno líquido y conservados en RNAlater (QIAGEN) a -80 °C hasta el momento de ser procesados.



Figura 2.1 Ejemplar adulto de *J. multidentata*.

2.2.2 Aislamiento del ARN y Transcripción Reversa (TR)

A partir de un pool de 5 cerebros y otro de 5 ovarios obtenidos de hembras de *J. multidentata* se extrajo el ARN total utilizando el método de extracción de guanidina tiocianato- fenol cloroformo, de acuerdo con Chomczynski & Sacchi (1987). El pellet de ARN se resuspendió en 10 μ L de agua libre de nucleasas (Biodynamics S.R.L). La calidad y cantidad de ARN se evaluaron por espectrofotometría (absorbancia a 260 y 280 nm) y corriendo 2 μ L en un gel de agarosa al 1 % en condiciones no desnaturizantes y visualizadas mediante bromuro de etidio. Se realizó una Transcripción Reversa (TR) no específica con 5 μ g de ARN de cada muestra utilizando un método de síntesis de ADN complementario catalizado por la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen) usando cebadores oligo (dT)₁₅ (Biodynamics S.R.L.) (Amé et al., 2009).

2.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADNc resultante fue utilizado como molde para obtener las secuencias parciales de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* usando una estrategia de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron oligonucleótidos degenerados (Tabla 2.1) para lo cual se realizó una búsqueda en GenBank y a partir de secuencias nucleotídicas traducidas de regiones conservadas con alta homología interespecífica de *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, se llevó a cabo un alineado (con 20 especies de peces para *cyp19a1a* y 18 para *cyp19a1b*) utilizando el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). Para eliminar aquellas secuencias más disímiles se tomó como criterio diseñar los oligonucleótidos a partir de las secuencias de especies más cercanas taxonómicamente a *J. multidentata*.

Gen blanco	Denominación	Secuencia de oligonucleótidos	
		Sentido	Antisentido
<i>cyp19a1a</i>	dCYT19a1	5'-TGGATHAAYGGNGARGARAC-3'	5'-RTCNGGNGCNGCDATNACCAT-3'
	dCYT19a2	5'-TTYCAYCCNGTNGTNGAYTTY-3'	5'-YTTTCATCATNACCATNGCDATRTG-3'
<i>cyp19a1b</i>	dCYT19b1	5'-AAYTAYTTYGARACNTGGCA-3'	5'-YTCNACRTCNGGRTTYTYGYTT-3'
	dCYT19b2	5'-CCNGTNGTNGAYTTYACNATG-3'	5'-NCCRCANCCRAANGGYTGAA-3'
	dCYT19b3	5'-AAYTAYTTYGARACNTGGCA-3'	5'-NCCRCANCCRAANGGYTGAA-3'

Tabla 2.1 Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias nucleotídicas traducidas de regiones conservadas con alta homología interespecífica para *cyp19a1a* y *cyp19a1b*.

Estos oligonucleótidos fueron utilizados para realizar la PCR, la cual se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L con las siguientes condiciones: 10 μ M de oligonucleótidos sentido y antisentido, 25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), y 1 unidad de Paq5000 ADN Polimerasa (Stratagene).

Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: 1 x 95 °C, 3 min; 40 x [94 °C, 40 s; T °C (*), 1 min y 72 °C, 2 min]; 1 x 72 °C, 5 min. (*) En la etapa de hibridación se ensayó un gradiente de temperaturas de 35, 45, 55 y 65 °C.

A partir de estos productos de PCR se realizó otra PCR con iguales condiciones y parámetros de ciclado, utilizando 1 μ L de los mismos como muestra. Los oligonucleótidos que permitieron identificar las secuencias con el peso molecular

esperado fueron dCYT19b3 para la aromatasa cerebral y dCYT19a2 para la aromatasa de ovario, en ambos casos a una temperatura de 55 °C.

Una vez identificados los productos de PCR con un tamaño esperado de 660 pb para *cyp19a1b* y de 250 pb para *cyp19a1a*, se introdujeron en el vector plasmídico pCR 2.1 (Invitrogen). Este vector confiere a una bacteria resistencia a ampicilina y kanamicina, lo que permite seleccionar las colonias que incorporaron el vector durante la transformación. Una vez que se introdujeron los productos en el vector, se transformaron células competentes de *Escherichia coli*. El sitio de unión del gen se ubica dentro del gen lac Z que codifica la enzima β -galactosidasa (Fig. 2.2A). La selección de colonias se realiza en presencia del sustrato de la enzima X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido) el cual al hidrolizarse genera un producto azul. Como el inserto inactiva el gen de la β -galactosidasa, las colonias de bacterias recombinantes, es decir aquellas que incorporaron el plásmido con el inserto, se identifican como colonias blancas, en contraste con aquellas que recibieron el plásmido sin inserto que se observan como colonias azules (Fig. 2.2B). Las colonias blancas se seleccionaron de una placa de agar con X-Gal/IPTG y ampicilina y crecidas en medio con LB/ampicilina.

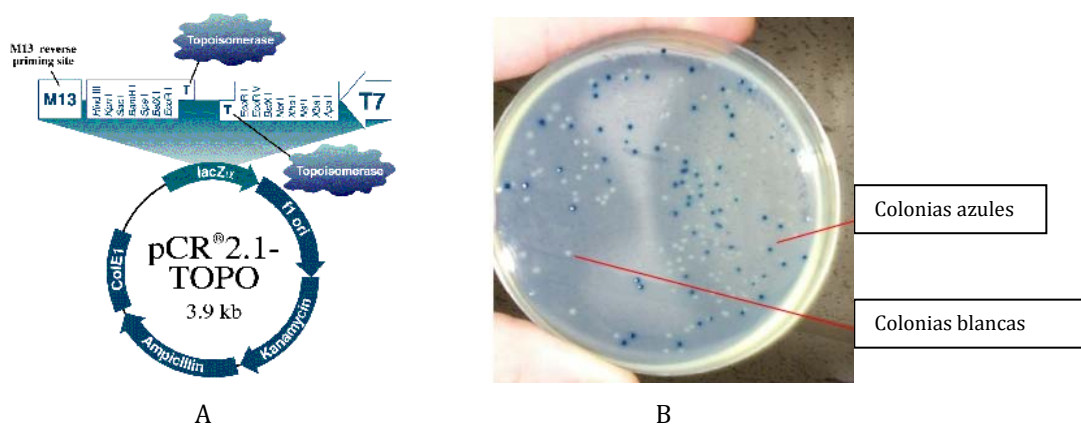


Figura 2.2 **A)** Mapa parcial del vector pCR 2.1- TOPO indicando el sitio de unión del gen; **B)** Selección de colonias de bacterias recombinantes.

Se seleccionaron 6 clones para *cyp19a1a* y *cyp19a1b*, y el ADNc plasmídico fue secuenciado en Macrogen Inc., Korea. Las secuencias obtenidas se registraron en GenBank y se compararon con secuencias reportadas previamente de aromatasa de

cerebro y ovario de otras especies de peces, accesibles en la base de datos de GenBank (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.4 Análisis filogenético

Las secuencias parciales de ADNc de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* de *J. multidentata*, junto con secuencias de 18 especies de peces informadas previamente en GenBank se alinearon utilizando el programa ClustalX (Thompson et al., 1997). El árbol filogenético se construyó a partir de los resultados del alineamiento de secuencias parciales que compartieron más del 80% de similitud con *J. multidentata* usando el programa TreeViewX (Page, 2003). El mismo se construyó sólo a fin de corroborar la segregación de las secuencias de aromatasa de *J. multidentata* en dos ramas diferentes del árbol. La secuencia de la aromatasa de la raya *Dasyatis sabina* se utilizó como grupo externo.

2.2.5 PCR en tiempo real

A partir de las secuencias parciales de ADNc de *J. multidentata* obtenidas se diseñaron nuevos oligonucleótidos específicos y no degenerados para evaluar la expresión de la enzima por TR-PCR en tiempo real (Tabla 2.2) con el software Primer Express (Applied Biosystems) y obtenidos de Sigma-Aldrich.

La PCR cuantitativa se utilizó para amplificar y medir la abundancia de transcriptos de *cyp19a1a* en las gónadas y *cyp19a1b* en cerebros. Fue realizada en el ciclador Bio-Rad iQ cyclor con 1 µL de una dilución 1/10 de ADNc (25 ng ARN total retrotranscrito), Master Mix de PCR de Syber Green (conteniendo buffer Tris.Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, pH 8.7) con adición de fluoresceína 10 nM final (Applied Biosystems) y 7.5 pmol de oligonucleótidos en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 x 95 °C, 15 min; 45 x [94 °C, 15 s, 61,2 °C, 30 s y 72 °C, 30 s]. La temperatura de hibridación se fijó en 61,2 °C luego de comprobar que a esta temperatura se obtenía mayor eficiencia que a otras temperaturas ensayadas (63,1 y 58,7 °C). Las reacciones de PCR en tiempo real se corrieron por triplicado para cada muestra de ADNc. Se llevaron a cabo curvas de disociación para monitorear la

eficiencia de la reacción y la ausencia de dímeros de primers. Con el mismo fin, se corrieron los productos de reacción en un gel de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio estimando el tamaño del amplicón por comparación con un marcador de tamaño (DNA 50 pb ladder, Embiotec, Argentina). Las amplificaciones también se llevaron a cabo con 25 ng de ARN no retrotranscrito como control negativo para chequear la ausencia de contaminantes genómicos. Los productos de amplificación fueron cuantificados utilizando el valor de Ct experimental (threshold cycle — definido como el ciclo de PCR donde ocurre un aumento en la fluorescencia sobre el nivel de fondo). Para estimar la expresión de cada gen y calcular las eficiencias de amplificación se realizó una curva estándar para cada par de oligonucleótidos basadas en cantidades conocidas de ADNc (diluciones decimales seriales correspondientes a ADNc transcripto de 100 a 0,01 ng de ARN total). Como gen de referencia se utilizó el gen de la β -actina de *J. multidentata* (Tabla 2.2) (Amé et al., 2009).

Gen blanco	Secuencia de oligonucleótidos		Amplicón (peso molecular)
	Sentido	Antisentido	
<i>cyp19a1a</i>	5'-CAAAGGGCACAAATATCATCTTGA-3'	5'-CGGGCTGGTGGAAGAACTC-3'	66
<i>cyp19a1b</i>	5'-GAAACATCATTAACAAAACACTGAGAACTG-3'	5'-GAGAGCTCCCATGGTTCTG-3'	88
β -actina	5'-AAAGCCAACAGGGAGAAGATGAC-3'	5'-GCCTGGATGGCAACGTACA-3'	77

Tabla 2.2 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia parcial del gen *cyp19a1a* de *J. multidentata* (número de acceso en GenBank: FJ169945) codificaría un polipéptido de 78 aminoácidos con un peso molecular de 9.2 kDa, y el gen *cyp19a1b* (número de acceso: EU851873) codificaría un polipéptido de 184 aminoácidos con un peso molecular de 21.3 kDa (Fig. 2.3). Tanto el análisis filogenético como las comparaciones con otras secuencias mostraron que *cyp19a1a* presentó mayor similitud con la variante gonadal de *Fundulus heteroclitus* (92%), y *cyp19a1b* compartió el 90% y 88% de homología con la variante de cerebro de

Poecilia reticulata y *F. heteroclitus*, respectivamente (ambos Cyprinodontiformes). Las dos variantes aisladas de *cyp19a1* en *J. multidentata* compartieron el 62 % de identidad, una situación similar a la encontrada en *D. labrax* (Blázquez & Piferrer, 2004), *C. auratus* (Gelinas et al., 1998), *F. heteroclitus* (Greytak et al., 2005), *O. latipes* (Kuhl et al., 2005) y *O. bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al., 2005), donde las variantes *cyp19a1a* y *cyp19a1b* compartieron entre el 60 y el 62% de identidad de la secuencia. El árbol filogenético resultante (Fig. 2.4) está compuesto por dos agrupamientos, uno que incluye la variante de cerebro y el otro la de gónadas, lo cual concuerda con el publicado inicialmente por Callard & Tchoudakova (1997) así como con otros estudios más recientes (Blázquez & Piferrer, 2004; Greytak et al., 2005; Kuhl et al., 2005).

La existencia de genes duplicados que presentan la misma actividad enzimática en el linaje de los teleósteos, como es el caso de la aromatasa, puede representar una ventaja adaptativa que brinda nuevas alternativas en cuanto a la posibilidad de que cada uno pueda efectuar diferentes funciones, expresarse en distintos tejidos y/o presentar distintos mecanismos regulatorios (Zhao et al., 2001; González & Piferrer, 2002).

```

cyp19a1a
5'   GGC TTT TCC ATC CAG TGG TGG ACT TTT CCA TGC GAC GAG CCC
TGT CAG ATG ATG TCA TAG ATG GCT ACA GGG TCC CAA AGG GCA CAA
ATA TCA TCT TGA ACA CAG GCC GCA TGC ACC GGA CAG AGT TCT TCC
ACC AGC CCG ACG AAT TTA GAC TGG AGA ACT TCC AGA AAA ATA CTC
CTC GCC GTT ACT TCC AGC CGT TCG GCT CAG GCC CTC GCT CCT GTG
TTG GCA AGC ACA TCG CCA TGG TCA TGA TGA AAA AGC CGA AT 3'

cyp19a1b
5'   TCG AGA CGT GGC AAA CGG TTC TTA TCC AGC CTG ATA TCT TCT
TCA AGA TTG GAT GGC TTT ACA ACA AAC ATA AGA AAG CAG CTC AAG
ACC TGC AGG ATG CGA TGG AGA GTC TGC TCG AAA TCA AAA GAA ACA
TCA TTA ACA AAA CTG AGA AAC TGG ATG CTG ACC TTG ACT TTG CAA
CAG AGC TCA TCT TTG CAC AGA ACC ATG GGG AGC TCT CTG GTG ATA
ACG TCA GGC AGT GTG TGC TGG AGA TGG TGA TCG CAG CTC CTG ACA
CGC TCT CCA TCA GCC TCT TCT TCA TGC TGA TGC TGC TCA AAC AGA
ATC CAA ATG TGG AGC AGC AGC TTG TGG AAG AGA TGA GCA ACG TTT
TGG GTG AGA CAG CTA TGG ACA ACA TCA ATT ATG AAA GAC TAA AGG
TGA TGG AGA AGT TCA TCA ATG AAT CTA TGA GGT TTC ACC CTG TGG
TTG ACT TCA CTA TGC GAA AAG CTC TGG AGG ACG ATG ACA TCG AAG
GTA CAA AGA TCA GAA AAG GAA CCA ACA TCT TCC TTA ACA TTG GAC
TCA TGC ACA AAA CGG AGT TCT TCC CCA AAC CCA GAG AGT TCA GCC
TGA CAA ACT TTG ACA ACC CAG TG 3'

```

Figura 2.3 Secuencias nucleotídicas parciales de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* de *Jenynsia multidentata*.

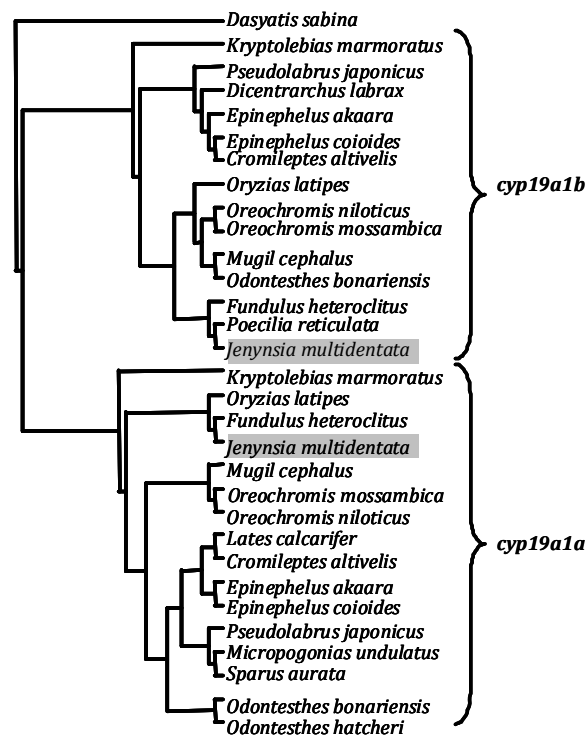


Figura 2.4 Árbol filogenético de las secuencias parciales de ADNc de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* de *Jenynsia multidentata*. Las comparaciones fueron realizadas con las secuencias de (Números de acceso de GenBank entre paréntesis, desde arriba hacia abajo) *Kryptolebias marmoratus* (DQ339106.1), *Pseudolabrus japonicus* (DQ298136.1), *Dicentrarchus labrax* (AY138522.1), *Epinephelus akaara* (AY547353.1), *Epinephelus coioides* (AY510712.1), *Cromileptes altivelis* (AY684258.1), *Oryzias latipes* (AY319970.1), *Oreochromis niloticus* (AF306786.1), *Oreochromis mossambica* (AF135850.1), *Mugil cephalus* (AY859423.1), *Odontesthes bonariensis* (AY380061.2), *Fundulus heteroclitus* (AY494837.1), *Poecilia reticulata* (AY395692.1), *Kryptolebias marmoratus* (DQ339107.1), *Oryzias latipes* (D82968.1), *Fundulus heteroclitus* (AY428665.1), *Mugil cephalus* (AY859425.1), *Oreochromis mossambica* (AF135851.1), *Oreochromis niloticus* (U72071.1), *Lates calcarifer* (AY684256.1), *Cromileptes altivelis* (AY684255.1), *Epinephelus akaara* (AY547354.1), *Epinephelus coioides* (AY510711.1), *Pseudolabrus japonicus* (DQ298135.1), *Micropogonias undulatus* (DQ184486.1), *Sparus aurata* (AF399824.1), *Odontesthes bonariensis* (EF030342.1), *Odontesthes hatcheri* (EF051123.1). La secuencia de *Dasyatis sabina* (AF097513) fue utilizada como grupo externo.

El valor más alto de eficiencia de amplificación para todos los genes ensayados se obtuvo con la temperatura de 61,2 °C. Las eficiencias obtenidas para *cyp19a1a*, *cyp19a1b* y β -actina fueron 2,04; 1,88 y 1,87; respectivamente. Las pendientes utilizadas para calcular las eficiencias de amplificación fueron -3,20; -3,65 y -3,69 para *cyp19a1a*,

cyp19a1b y β -actina. El protocolo de disociación mostró un único pico para cada reacción indicando la especificidad de la amplificación, confirmándose la misma en la corrida electroforética al observarse una única banda, con el peso molecular esperado para cada gen (Fig. 2.5, 2.6 y Tabla 2.2). El uso de β -actina como gen de referencia fue verificado en los experimentos y no se observaron diferencias significativas entre cerebro y gónadas.

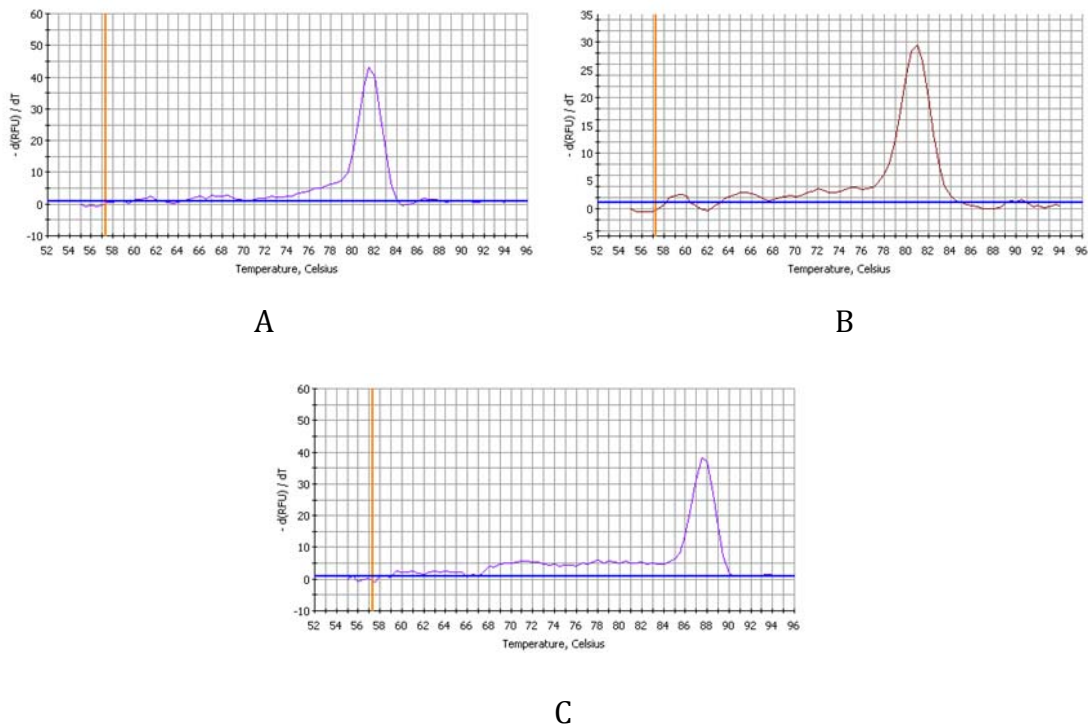


Figura 2.5 Curvas de disociación **A)** Curva de disociación de *cyp19a1b*. **B)** Curva de disociación de *cyp19a1a*. **C)** Curva de disociación de β -actina.

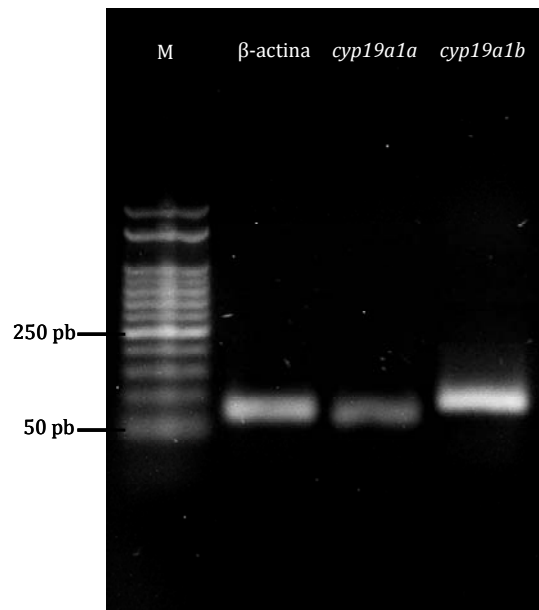


Figura 2.6 Corrida electroforética de productos de PCR en gel de agarosa al 2,5 %. Referencias: M, marcador de peso molecular.



CAPÍTULO 3

**Análisis de biomarcadores en machos
expuestos a tóxicos de diferente
naturaleza química**

3.1 ASPECTOS GENERALES

En los últimos años ha crecido la evidencia que demuestra que las poblaciones silvestres de animales acuáticos están siendo expuestas a compuestos químicos que pueden comportarse como mímicos de hormonas y, por lo tanto, alterar severamente la fisiología reproductiva de los organismos. Como se mencionó en el capítulo 1, una clase de estos disruptores endocrinos son los estrógenos ambientales o xenoestrógenos, que se unen a los RE y pueden inducir respuestas biológicas afectando el desarrollo y la reproducción de los animales. Estos compuestos son frecuentemente detectados en ambientes acuáticos, principalmente en efluentes provenientes de plantas de tratamientos de residuos cloacales municipales, papeleras y sistemas de engorde a corral (Kolpin et al., 2002; Soto et al., 2004; Barber et al., 2007; Sumpter, 2008; Tyler et al., 2009; Vajda et al., 2011). Entre los EDCs que se encuentran en los cursos de agua pueden mencionarse las hormonas (tanto naturales como sintéticas) tales como el 17β -estradiol, estrona, estriol, 17α -etinilestradiol, testosterona y 17α -metiltestosterona, las cuales están presentes en concentraciones bajas, en el rango de ng/L (Desbrow et al., 1998; Snyder et al., 1999; Baronti et al., 2000; Vajda et al., 2011; Joblin & Owen, 2013). La fuente primaria de hormonas estrogénicas en el ambiente son las mujeres debido a la excreción de conjugados inactivos en la orina, al uso de estrógenos en terapias de reemplazo hormonal y de pastillas anticonceptivas, lo cual hace más frecuente la detección de estos compuestos en las descargas de PTE mediante las cuales alcanzan los cursos de agua (Jobling et al., 1998; Sonnenschein & Soto, 1998; Pait & Nelson, 2002; Ying et al., 2002; Gomes et al., 2003; Aguayo et al., 2004; Nakada et al., 2004; Ma et al., 2005; Snyder, 2008). Compuestos que provienen de la biodegradación de alquilpolietoxilados, como el nonilfenol y el octilfenol, también son detectados en

efluentes de PTE pero a concentraciones en el rango de ng/L a µg/L (Lye et al., 1999; Wu et al., 2007; Babay et al., 2008; Vajda et al., 2011). El destino ambiental y el comportamiento de los EDCs puede variar en gran medida con la temperatura y la matriz en la que están presentes y, como resultado, sus tasas de descomposición y la persistencia son diferentes en compartimentos ambientales como el agua, el suelo y el aire. Incluso la tasa de eliminación de los EDCs durante el tratamiento en PTE puede depender de varios factores incluyendo la naturaleza química del compuesto, la tecnología utilizada para el tratamiento y las condiciones climáticas (Cirja et al., 2008; Snyder, 2008; Schaar et al., 2010). De modo tal que las concentraciones detectadas en los cursos de agua pueden variar de un lugar a otro.

En los cuerpos de agua receptores, los EDCs están sujetos a dilución, biodegradación y adsorción. Muchos de ellos son resistentes a la degradación, lipofílicos y pueden acumularse en los lípidos y las membranas de los organismos (Sumpter & Jobling, 1995; Al-Ansari et al., 2010) y resultan en una presencia persistente en el torrente sanguíneo, lo cual puede estimular procesos sensibles a estrógenos (Petit et al., 1999). Entre estos compuestos se encuentran los pesticidas organoclorados, PCBs y alquifenoles (Tyler & Routledge, 1998). Otros EDCs como el bifenol A y el 17β-estradiol, no se bioacumulan (Tyler & Routledge, 1998) pero están constantemente ingresando al ambiente acuático a través de efluentes de las PTE.

A pesar de que en general los niveles de todos estos compuestos en los efluentes son traza, se ha observado que dichas concentraciones pueden ejercer efectos reproductivos adversos en los peces (Guillette & Gunderson, 2001; Jobling & Tyler, 2003; Mills & Chichester, 2005; Scholz & Klüver, 2009; García-Reyero et al., 2011; Harris et al., 2011; Wen et al., 2013) tales como inducción de vitelogenina (Lye et al., 1997; Ankley et al., 2001; Hemmer et al., 2002; Ishibashi et al., 2006; Hinfrey et al., 2010), anomalías gonadales (Harries et al., 1997; Jobling et al., 1998; Miles-Richardson et al., 1999a), hermafroditismo (Sumpter & Jobling, 1995), reversión sexual (Gimeno et al., 1996; Lange et al., 2009) y comportamiento reproductivo alterado (Bayley et al., 1999; Bjerselius et al., 2001; Schoenfuss et al., 2002, 2008; García-Reyero et al., 2011). Se ha informado que el tratamiento con compuestos estrogénicos generalmente causa una regulación positiva del gen *cyp19a1b* (Gelinas et al., 1998; Trant et al., 2001; Halm et al., 2002; Kazeto et al., 2004; Menuet et al., 2005; Kallivretaki et al., 2006; Marlatt et al., 2008; Kortner et al., 2009; Hallgren & Olsen, 2010; Shanthanagouda et al., 2013) lo cual

sugiere que la expresión de la aromatasa es un buen marcador para testear la exposición a estrógenos. Por otra parte, los EDCs con actividad hormonal producen daños histológicos a nivel de las gónadas (Lye et al., 1997; Christiansen et al., 1998; Gimeno et al., 1998b; Miles-Richardson et al., 1999a, 1999b; Kwak et al., 2001; Velasco-Santamaría et al., 2010) y generalmente provocan alteraciones en los índices somáticos tales como una inducción del IHS (Cardinali et al., 2004; Ishibashi et al., 2006; Schoenfuss et al., 2008) y disminución en el IGS (Billard, 1981; Chang et al., 1995; Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000; Toft & Baatrup, 2001; Martyniuk et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2010).

De este modo, el objetivo del presente capítulo fue evaluar cambios en la expresión de los genes *cyp19a1*, los índices somáticos y la histología gonadal en machos de *J. multidentata* frente a la exposición a compuestos estrogénicos tanto naturales como sintéticos (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol y 4*n*-nonilfenol). Se utilizó también la 17 α -metiltestosterona, un andrógeno aromatizable que puede ser detectado en efluentes de PTE y que en determinadas concentraciones puede tener un efecto estrogénico sobre los genes *cyp19a1* (Andersen et al., 2001; Ankley et al., 2001; Zerulla et al., 2002; Hornung et al., 2004).

A fin de poder utilizar la histología del testículo de *J. multidentata* como biomarcador, a continuación se realiza una breve descripción de la misma.

El testículo de esta especie es un órgano bilobulado localizado en la región posterior de la cavidad corporal. La espermatogénesis dentro de los testículos ocurre en el epitelio germinal, el cual se encuentra dividido en lóbulos compuestos de túbulos cerrados o sacos. En *J. multidentata*, la espermatogénesis se restringe a la región terminal de los sacos (modelo lobular restringido), lejos de los ductos eferentes (Grier et al., 1980). En este tipo de modelo, las células espermatogénicas se organizan en cistos periféricos (también denominados espermatocistos) dentro de los túbulos, los cuales subsecuentemente aumentan de tamaño y se extienden a lo largo del lumen del túbulo a medida que la espermatogénesis ocurre. Cada cisto se halla formado por una célula de Sertoli que rodea a un clon de células germinales que se encuentran en un mismo estadio espermático y maduran de manera sincrónica mientras migran simultáneamente hacia el túbulo o conducto central (Fig. 3.1). Cada cisto se halla separado de los restantes por finos cordones de tejido conectivo. Este tejido intersticial contiene células de Leydig (de gran tamaño y aspecto poligonal, con un núcleo

redondeado-ovalado), las cuales producen esteroides cuando son estimuladas por la hormonas gonadotrópicas liberadas por la hipófisis (Nagahama, 1983). También se encuentran en este tejido intersticial células de aspecto mioide, que forman una capa incompleta alrededor de la superficie de los lóbulos, capilares sanguíneos, fibras nerviosas, fibroblastos y macrófagos. Los cistos ubicados hacia la periferia de la gónada se encuentran rodeados por una fina capa de tejido intersticial, y a medida que los mismos se aproximan al túbulo central, el tejido intersticial aumenta de grosor.

El epitelio germinal consiste en la asociación entre la membrana basal, las células germinales (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) y las células de Sertoli (Parenti & Grier, 2004). Las espermatogonias A o primarias se encuentran directamente por debajo de la túnica albugínea. Estas células germinales constituyen una fuente continua de células espermatogénicas, lo que permite la renovación del tejido espermático. Se caracterizan por ser células grandes, con citoplasma eosinófilo y prominente núcleo hipocromático. Se hallan rodeadas individualmente por una célula de Sertoli y comienzan una serie de divisiones mitóticas para producir grupos de espermatogonias B o secundarias encapsuladas dentro de espermatocistos en grupos de dos, cuatro o más células (Pudney, 1995). Las espermatogonias B (de menor tamaño y con núcleo más grande) dan origen a través de otra ronda de mitosis a los espermatocitos primarios (Ecp), de menor tamaño, con escaso citoplasma y núcleo prominente y más basófilo. Los Ecp, sufren la primera división meiótica para producir los espermatocitos secundarios (Ecs), más pequeños aún y con núcleo basófilo más denso, los cuales sufren la segunda meiosis resultando en las espermátidas haploides (Et). Éstas atraviesan eventos de maduración que incluyen cambios en la forma del núcleo, desarrollo de flagelo, pérdida de citoplasma y fagocitosis de remanentes citoplasmáticos, previo a ser liberadas en el lumen del túbulo como espermatozoides (Ez) (Nagahama, 1983; Pudney, 1995). Cuando la espermatogénesis se completa, la membrana que rodea a cada cisto se abre de manera de permitir la liberación del esperma maduro en el lumen tubular (espermiación) (Fig. 3.2).

La supervivencia y desarrollo de las células germinales son críticamente dependientes del contacto con la célula de Sertoli. Ésta es además capaz de fagocitar los cuerpos residuales que son desechados por las Et maduras (Schulz & Miura, 2002) y también células germinales degeneradas y espermatozoides envejecidos que no fueron

liberados. Esta actividad fagocítica usualmente resulta en un citoplasma de las células de Sertoli repleto de lisosomas y vacuolas digestivas (Miles-Richardson et al., 1999b).

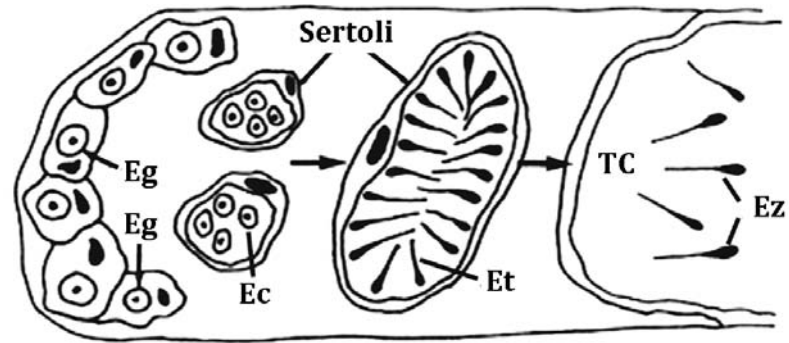


Figura 3.1 Modelo lobular restringido modificada de Pudney (1995). Referencias: Eg indica espermatogonias; Ec: espermatocitos; Et: espermatidas; Ez: espermatozoides; TC: túbulo colector.

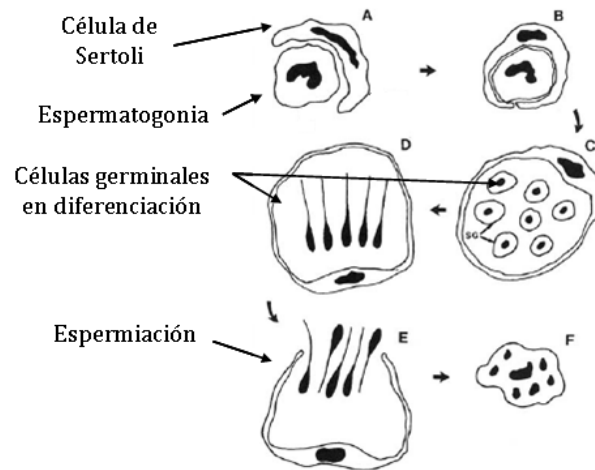


Figura 3.2 Esquema representativo de la formación de un cisto, espermatogénesis y espermiación.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 *Recolección de peces y aclimatación*

Para cada ensayo de exposición se colectaron durante la época reproductiva 80 machos adultos de *J. multidentata* en un sitio no contaminado seleccionado por la buena calidad de sus aguas (Río Yuspe, Córdoba, Argentina, 31° 14' 18"; 64° 31' 14") (Wunderlin et al., 2001; Hued & Bistoni, 2005). Los peces fueron capturados utilizando un equipo de pesca eléctrico, transportados al laboratorio en tanques de 15 L y aclimatados durante 2 semanas en una habitación con temperatura controlada a 21±1 °C, con un fotoperíodo de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad. Se les suministró alimento deshidratado en escamas (TetraMin) dos veces al día.

3.2.2 *Condiciones de exposición*

Los ensayos fueron semi-estáticos y crónicos, de 28 días de duración. Se expusieron 5 peces seleccionados al azar en una pecera de 5 L conteniendo la concentración nominal de cada tóxico (Fig. 3.3). Se preparó una solución madre de cada tóxico disolviendo 1 mg del compuesto en 1 mL de acetona, la cual se guardó a -20 °C y cada semana se preparó una nueva solución hija a partir de ésta. El agua de las peceras fue totalmente renovada durante los experimentos considerando la vida media de los compuestos. Para cada ensayo se contó con un grupo control y se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento. Cabe destacar que las concentraciones utilizadas de cada tóxico fueron seleccionadas en un rango ambientalmente relevante, de acuerdo a los valores mínimos y máximos hallados en cursos de agua de diferentes países y ensayando tres concentraciones de distinto orden de magnitud dentro de ese rango.



Figura 3.3 Imagen de los ensayos de exposición donde pueden observarse las 4 réplicas de cada tratamiento.

3.2.3 Biomarcadores

3.2.3.1 Índices somáticos

Al finalizar cada ensayo los peces fueron sacrificados por inmersión en sobredosis de triclaína metanolsulfonato (MS222 500 mg/L). Se registró la longitud estándar y el peso de cada individuo con el fin de evaluar el estado general del pez mediante el Factor de Condición de Fulton ($FC = [W/L^3] \cdot 100.000$, donde $W = \text{peso corporal}$ y $L = \text{longitud}$) (Anderson & Newman, 1996). El peso de las gónadas se utilizó para calcular el Índice Gonadosomático ($IGS = [W_{\text{testículo}}/W_{\text{peso corporal}}] \cdot 100$). Los hígados también fueron removidos y pesados con el fin de calcular el Índice Hepatosomático ($IHS = [W_{\text{hígado}}/W_{\text{peso corporal}}] \cdot 100$) (Goede & Barton, 1990).

3.2.3.2 Medición de *cyp19a1a* y *cyp19a1b*

Los cerebros y las gónadas fueron extraídos rápidamente, pesados, congelados en nitrógeno líquido y conservados en *RNAlater* (QIAGEN) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se evaluó mediante TR-

PCR en tiempo real el efecto de la exposición a los diversos tóxicos sobre la expresión de la aromatasa cerebral y gonadal utilizando el método de la curva estándar, tal como fue descrito en el capítulo 2. Se utilizó como gen de referencia el gen de la β -actina.

3.2.3.3 Análisis histológico

De cada concentración se fijaron 3 testículos en formaldehído al 10%, los que fueron procesados según técnicas histológicas de rutina y teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). Los cortes fueron examinados con un microscopio óptico (Olympus® CX31) el cual se encuentra acoplado a una cámara fotográfica (MOTICAM2300). De cada preparado se analizaron tres cortes longitudinales de 4-6 μ m de espesor obtenidos de la región central del testículo y se determinó el porcentaje de los diferentes estadios celulares. Debido a la baja proporción de cistos con Eg (< 5%) y a la dificultad para diferenciar mediante microscopía óptica entre Et en estadio avanzado de diferenciación y Ez, se consideraron dos grupos: cistos con estadios primordiales de desarrollo (Eg y Ec) y cistos conteniendo células maduras (Et y Ez). Se registraron además las alteraciones observadas. Cada preparado histológico fue identificado con un código y analizado sin conocimiento previo de la procedencia de la muestra.

3.2.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el Infostat Software Package (Infostat, 2002). La distribución normal de los datos se analizó mediante el test de Shapiro Willks, y se utilizó el test de Levene para probar la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad se realizó un análisis no paramétrico de rangos (Kruskal Wallis) seguido por el test a posteriori de Dunn. La significancia fue aceptada para valores de $p < 0,05$.

3.3 SECCIÓN A- 17 β -estradiol (E₂)

3.3.1 INTRODUCCIÓN

El 17 β -estradiol (Fig. 3.4) es una hormona endógena clave en el desarrollo sexual de las hembras y está involucrada también en numerosos procesos fisiológicos tanto en hembras como en machos. La ruta mediante la cual este compuesto ingresa en los cuerpos de agua es a través de la excreción tanto de los seres humanos, principalmente mujeres, como también de animales de granja. Como resultado, una fuente ambiental importante de esta hormona es vía los efluentes de PTE, que descargan directamente en los cursos de agua (Lange et al., 2001; Young et al., 2004). Estudios que investigan el comportamiento del E₂ durante los tratamientos en las PTE sugieren que es removido por conversión a estrona y posee una vida media de 125 horas bajo condiciones simuladas de luz solar continua (lo cual puede equivaler a 10-12 días en verano) (Williams et al., 2001).

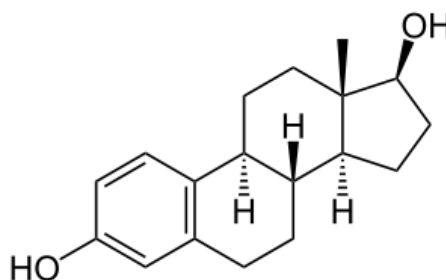


Figura 3.4 Forma estructural del 17 β -Estradiol.

Esta hormona ha sido detectada en ambientes acuáticos de diferentes países en concentraciones de ng/L. Por ejemplo, en el Reino Unido y Alemania se han detectado concentraciones en efluentes que van desde 3,7 a 80 ng/L (Desbrow et al., 1998; Rodgers-Gray et al., 2000). En Estados Unidos se ha detectado 3,2 ng/L (Vajda et al.,

2011), mientras que en Israel las concentraciones van desde 38 a 343 ng/L (Shore et al., 1993) y en Gran Bretaña en el rango de 2,7 a 48,0 ng/L (Desbrow et al., 1998). En Argentina existen muy pocos trabajos en los cuales se han medido concentraciones de hormonas en cursos de agua. En un estudio realizado en la cuenca del Río Suquía, Valdés et al. (2012) detectaron concentraciones de E₂ menores a 6 ng/L.

A pesar de que las concentraciones ambientales se encuentran en el rango de ng/L, existe evidencia de que afectan la fisiología reproductiva de los peces (Halm et al., 2002; Kidd et al., 2007; Jobling & Owen, 2013). Se ha observado que la exposición a E₂ provoca alteraciones en el comportamiento reproductivo, la fertilidad y el desarrollo sexual (Gimeno et al., 1996; Blázquez et al., 1998; Bayley et al., 1999; Bjerselius et al., 2001; Schoenfuss et al., 2002; Toft & Baatrup, 2003; Martinovic et al., 2007). Las gónadas pueden ser consideradas un órgano blanco para la acción de compuestos con actividad estrogénica y, en general, se observa una disminución en el IGS luego de la exposición a E₂ (Condeca & Canario, 1999; Kinnberg et al., 2000; Zaroogian et al., 2001). A nivel histológico, este compuesto produce en los testículos alteraciones en las células de Sertoli (Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000), presencia de agregados necróticos de células germinales (Zaroogian et al., 2001), cesación de la espermatogénesis (Condeca & Canario, 1999; Zaroogian et al., 2001; van der Ven et al., 2003), vacuolización y fibrosis (Gimeno et al., 1998b), e incluso desarrollo de ovocitos (Chang et al., 1995; Kang et al., 2002). En cuanto a los efectos sobre la aromatasa, tratamientos con estrógenos generalmente causan una regulación positiva en la expresión de *cyp19a1b* (Pasmanik & Callard, 1988; Gelinias et al., 1998; Tsai et al., 2000; Melo & Ramsdell, 2001; Halm et al., 2002; Cheshenko et al., 2007).

3.3.2 CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

La longitud estándar promedio y el peso promedio de los peces utilizados en este ensayo fue: 28,80 \pm 2,57 mm y 0,52 \pm 0,15 g, respectivamente. Las concentraciones nominales utilizadas de E₂ (98% de pureza) fueron 50, 100 y 250 ng/L.

Se determinó el contenido de E₂ en el agua de las peceras por inmunoquímica mediante detección con electroquimioluminiscencia utilizando un analizador Cobas 4000 e411 (Roche Diagnostics, USA). Los porcentajes de recuperación fueron evaluados

en muestras de agua de acuario a las que se les adicionó 25 y 100 ng/L de E₂. Los porcentajes de recuperación obtenidos para ambas concentraciones fueron $90 \pm 4,7\%$ y $92 \pm 4,6\%$, respectivamente.

El procedimiento de calibración fue realizado con soluciones estándar de E₂ en un rango de 5 a 4,000 ng/L, alcanzando un límite de cuantificación de 7,5 ng/L. Las muestras fueron colectadas antes y después del recambio de agua en botellas de vidrio y conservadas a 4 °C hasta el momento de la medición.

3.3.3 RESULTADOS

3.3.3.1 Contenido de E₂ en agua

La estabilidad del E₂ en solución fue independiente de la concentración ensayada, mostrando niveles residuales del $44,7 \pm 6,2\%$ después de las 48 horas, de modo tal que el recambio de agua de las peceras se realizó a las 24 horas. Si bien se cuenta con las concentraciones reales de E₂ en la exposición, para mostrar los resultados se utilizarán los valores nominales con el fin de facilitar la lectura.

3.3.3.2 Mortalidad e Índices somáticos

Durante los 28 días de tratamiento sólo 2 de 20 peces murieron en el grupo control. En los peces expuestos a E₂ murieron 2, 3 y 1 pez en las concentraciones de 50, 100 y 250 ng/L, respectivamente.

Luego del período estudiado no se registraron diferencias significativas en el FC, el IGS ni el IHS entre tratamientos ($p > 0,05$; Tabla 3.1).

Índice	Valores	Concentración			
		Control	50 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
FC	Media	2,10	2,12	2,09	2,10
	D.E.	0,19	0,22	0,10	0,12
	Mínimo	1,70	1,81	1,86	1,84
	Máximo	2,50	2,49	2,24	2,30
IHS	Media	1,92	1,69	1,74	2,01
	D.E.	0,65	0,35	0,51	0,60
	Mínimo	0,61	1,07	1,04	1,23
	Máximo	2,92	2,36	2,66	3,32
IGS	Media	2,49	2,99	3,17	2,95
	D.E.	0,90	0,78	0,98	0,67
	Mínimo	0,64	1,51	1,50	1,76
	Máximo	3,91	4,32	5,44	3,77

Tabla 3.1 Media, Desvío Estándar (D.E.) y valores mínimos y máximos de los índices somáticos *Factor de condición* (FC), *Índice Hepatosomático* (IHS) e *Índice Gonadosomático* (IGS) de machos de *J. multidentata* expuestos a distintas concentraciones de E₂ durante 28 días.

3.3.3.3 Efectos del E₂ sobre la expresión de aromatasa *cyp19a1*

La expresión de *cyp19a1b* en cerebro se vio significativamente aumentada luego de la exposición crónica a E₂, incluso a la concentración más baja ensayada (50 ng/L) (Fig. 3.5A). Si bien no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones de E₂ estudiadas, se observó una tendencia al aumento concentración-dependiente en la abundancia de transcritos de *cyp19a1b* en todos los peces expuestos. La expresión de *cyp19a1b* evidenció una inducción de 3; 3,8 y 5 veces con respecto al grupo control en los individuos expuestos a 50, 100 y 250 ng/L de E₂, respectivamente. Por el contrario, no se observaron efectos significativos en la expresión de la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*) (Fig. 3.5B).

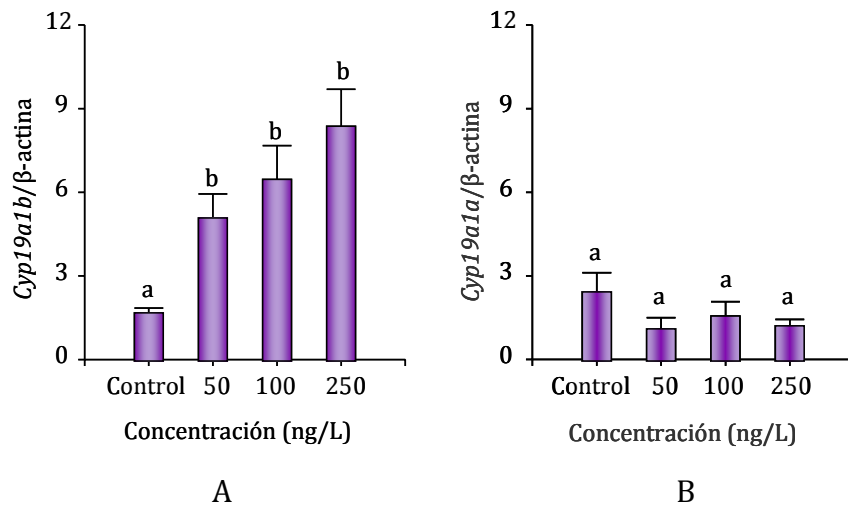


Figura 3.5 Expresión de los genes *cyp19a1* relativa a la β -actina en machos de *J. multidentata* expuestos a diferentes concentraciones de 17 β -estradiol medida por TR-PCR en tiempo real. **A)** Expresión de *cyp19a1b* en cerebro. **B)** Expresión de *cyp19a1a* en testículo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.3.3.4 Análisis histológico

El análisis de los cortes histológicos de los diferentes tratamientos reveló que todos los estadios celulares de la espermatogénesis estuvieron presentes y que las espermatogonias (Eg) siempre representaron un porcentaje muy bajo tanto en los controles como en los organismos expuestos a E₂.

Los individuos controles mostraron en promedio igual proporción de estadios primarios (espermatogonias, Eg y espermatocitos, Ec) y tardíos (espermátidas y espermatozoides, Et y Ez, respectivamente). Los cistos de los diferentes estadios celulares se presentaron bien definidos y sin alteraciones (Fig. 3.6). En los peces expuestos a la concentración de 50 ng/L (Fig. 3.7) se observó un incremento de los estadios primarios (60 %) y una disminución de los cistos de estadios tardíos respecto al grupo control. Las lesiones más comunes incluyeron Eg con características anormales; algunos cistos de Ec alterados; presencia de células vacuolares y desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos con diferentes estadios espermatogénicos).

En la concentración de 100 ng/L (Fig. 3.8) no sólo las Eg se presentaron muy alteradas sino también los Ec. Se observaron alteraciones histológicas similares a las

halladas en la concentración de 50 ng/L y aparecieron otras nuevas como desincronización en el proceso de espermatogénesis (observándose Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo, y presencia de células en distintos estadios dentro del cisto); pérdida de estructura de los cistos; incremento en el número de células vacuolares y presencia de células bi o trinucleadas. Se observó además un notable aumento de los estadios maduros (76%).

En los organismos expuestos a la concentración de 250 ng/L (Fig. 3.9) se observaron alteraciones similares a las encontradas en la concentración de 100 ng/L, pero la frecuencia de aparición fue mayor. En esta concentración aparece además la formación de acúmulos celulares y más cantidad aún de células vacuolares. En cuanto a los porcentajes de cada estadio celular se observó 54% de estadios primarios y 46% de estadios tardíos.

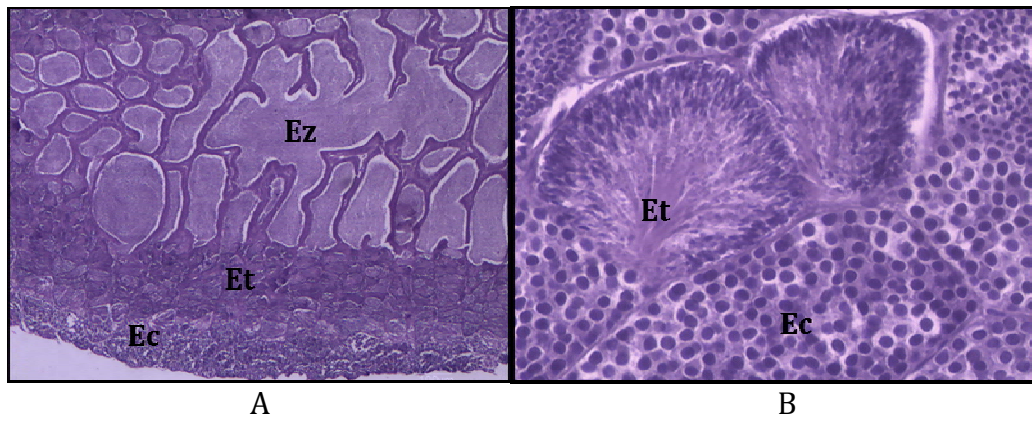


Figura 3.6 Corte histológico de testículo normal (control) de ejemplares adultos de *J. multidentata* donde puede observarse: **A)** la organización de los cistos (magnificación 10x); **B)** Detalle de los diferentes cistos espermatogénicos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; Ez: espermatozoides.

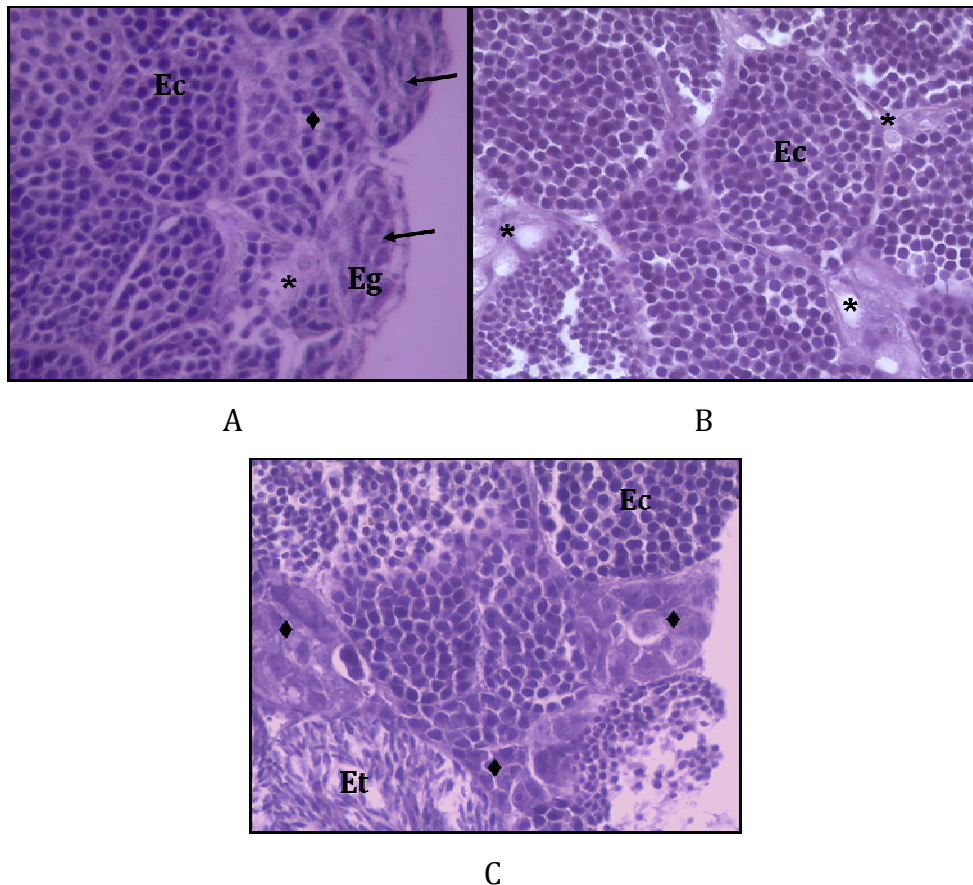


Figura 3.7 Corte histológico de testículo de peces expuestos a 50 ng/L de E₂ donde puede observarse: **A)** Eg y Ec con características anormales y células vacuolares (magnificación 40x); **B)** presencia de células vacuolares (magnificación 40x); **C)** mezcla de cistos en diferentes estadios espermatogénicos y cistos de Ec alterados (magnificación 40x). Referencias: Eg indica espermatogonias; Ec: espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; asterisco: células vacuolares; rombo: Ec alterados.

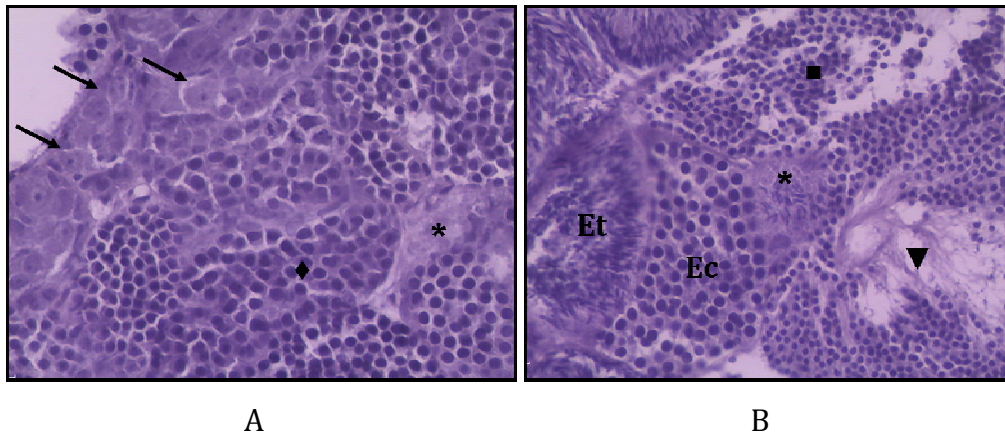


Figura 3.8 Corte histológico de testículo de peces expuestos a 100 ng/L de E₂ donde puede observarse: **A)** Eg y Ec muy alterados y células vacuolares (magnificación 40x); **B)** desincronización en el proceso de espermatogénesis (Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo), desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en diferentes estadios espermatogénicos), células vacuolares y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatoцитos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; asterisco: células vacuolares; rombo: Ec alterados; triángulo: Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo; cuadrado: pérdida de estructura del cisto.

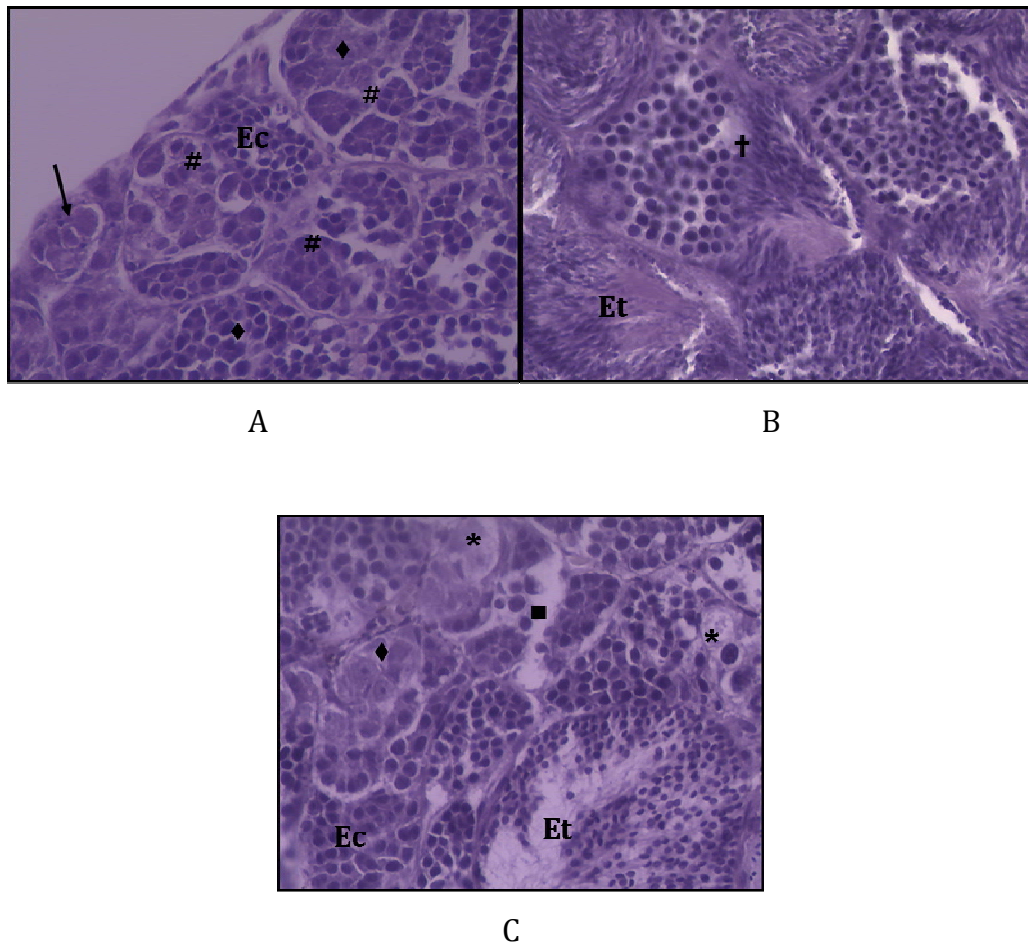


Figura 3.9 Corte histológico de testículo de peces expuestos a 250 ng/L de E₂ donde puede observarse: **A)** Eg y Ec muy alterados y acúmulos de células (magnificación 40x); **B)** desincronización en el proceso de espermatogénesis (presencia de células en distintos estadios espermatogénicos en un cisto) (magnificación 40x); **C)** Ec con características anormales; pérdida de la estructura de los cistos y células vacuolares. Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg alteradas; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares; cuadrado: pérdida de estructura del cisto; numeral: acúmulos de células; cruz: células en distinto estadio espermatogénico dentro del cisto.

3.3.4 DISCUSIÓN

La exposición a E₂ no provocó alteraciones en los índices somáticos (FC, IGS ni IHS). En general, los tratamientos con estrógenos producen una inhibición del crecimiento de las gónadas, como ha sido observada por otros investigadores (Billard, 1981; Christiansen et al., 1998; Panter et al., 1998; Halm et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los de Nielsen & Baatrup (2006) en donde no se registraron diferencias en el IGS entre los peces expuestos a 10 y 50 ng/L de E₂ (por 3,5 meses) y los controles.

La expresión de *cyp19a1b* evidenció un claro incremento luego de la exposición a E₂ en todas las concentraciones ensayadas. Es importante destacar que la variabilidad de los datos para este gen aumentó en los peces expuestos, probablemente involucrando respuestas diferenciales al E₂ entre individuos. Por el contrario, no se observó una influencia del tóxico sobre la abundancia de transcripto de *cyp19a1a* en testículos. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los cuales la exposición a E₂ provocó una regulación positiva de *cyp19a1b* (Kishida & Callard, 2001; Kishida et al., 2001; Trant et al., 2001; Halm et al., 2002; Menuet et al., 2005), pero falló en modular la expresión de *cyp19a1a* (Kishida et al., 2001; Kazeto et al., 2004; Cheshenko et al., 2007). Esta respuesta diferencial de los genes *cyp19a1* a compuestos estrogénicos es consistente con el hecho de que se han identificado elementos de respuesta a estrógenos en la región promotora de *cyp19a1b* en varias especies de peces (Callard et al., 2001; Kazeto et al., 2001), pero no en la de *cyp19a1a*, sugiriendo que los RE están involucrados en la regulación de la transcripción de *cyp19a1b* por estrógenos (Kishida & Callard, 2001).

Numerosos estudios han documentado los efectos adversos de la exposición a químicos exógenos con actividad estrogénica en el comportamiento reproductivo de los peces, mostrando una disminución de la performance reproductiva de los machos y una demasculinización comportamental (Bjerselius et al., 2001; Oshima et al., 2003; Doyle & Lim, 2005; Martinovic et al., 2007, 2008; Lavelle & Sorensen, 2011). Melo & Ramsdell (2001) informaron un dimorfismo sexual en la localización de la actividad de aromatasa cerebral, de acuerdo con el rol sugerido de la aromatasa en la regulación de los comportamientos sexuales específicos de machos y hembras. Estos autores

demonstraron además que los machos de *O. latipes* tratados con E₂ mostraban una feminización en el fenotipo del cerebro, lo cual implicó un aumento en los niveles totales de actividad de aromatasa y una actividad incrementada de esta enzima en las áreas del cerebro en las cuales las hembras generalmente muestran niveles mayores. De este modo, un incremento en la actividad de la aromatasa y un cambio en la distribución de su expresión en el cerebro podría resultar una explicación para la demasculinización del comportamiento de los machos. Los resultados del presente estudio demuestran que los tratamientos con E₂ indujeron fuertemente la expresión de *cyp19a1b* en el cerebro de machos de *J. multidentata*, y aún cuando las diferencias no fueron significativas entre tratamientos se observa una tendencia al aumento concentración dependiente. De acuerdo a lo mostrado por Melo & Ramsdell (2001), este incremento en la expresión de aromatasa en áreas específicas del cerebro, podría traducirse en una disminución del comportamiento sexual. Sin embargo, se ha observado que machos de *J. multidentata* expuestos a 100 y 250 ng/L de E₂ no evidenciaron alteraciones significativas en su performance reproductiva (Roggio et al., 2011).

Los tratamientos con xenoestrógenos producen generalmente una inhibición de la espermatogénesis con predominancia de los estadios celulares tempranos (Jobling et al., 1996; Gimeno et al., 1998a, 1998b; Condeca & Canario, 1999; Zaroogian et al., 2001; Van den Belt et al., 2002; van der Ven et al., 2003; Silva et al., 2012). En concordancia, los machos de *J. multidentata* expuestos a 50 ng/L evidenciaron un incremento en el porcentaje de Ec. Por el contrario, los expuestos a la concentración de 100 ng/L, mostraron un incremento de los estadios maduros. Nielsen & Baatrup (2006) encontraron que los peces expuestos a 10 y 50 ng/L de E₂ (por 3,5 meses) experimentaron una disminución significativa en los estadios primarios (Ec) y un aumento en la producción de esperma. Estos autores postularon que el aumento de los niveles de E₂ causa un “feedback” positivo en la hipófisis resultando en la liberación de más gonadotrofinas (GtH1 y GtH2), responsables de la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis (Groves & Batten, 1986; Devlin & Nagahama, 2002), lo cual resulta en mayor producción de esperma. Sin embargo, se ha observado que esta estimulación de la producción de esperma actúa hasta un cierto límite de exposición, sugiriendo un cambio en la función dependiendo de la concentración. Nielsen & Baatrup (2006) observaron a nivel histológico una gran producción de esperma en peces expuestos a 10 ng/L de EE₂, la cual disminuía notablemente a concentraciones más altas (50 y 200

ng/L). Este tipo de respuesta coincide con la observada por otros autores (Kinnberg & Toft, 2003) y podría ser una explicación aplicable a los resultados observados en el presente estudio, donde se registró un incremento en el porcentaje de Et y Ez a 100 ng/L pero no a 250 ng/L de E₂.

Por otra parte, en los machos de *J. multidentata* expuestos a E₂ se encontraron numerosas alteraciones histológicas en comparación al grupo control. Si bien muchas de estas alteraciones estuvieron presentes en todas las concentraciones estudiadas, a las concentraciones más altas su frecuencia de aparición fue mayor y se observaron alteraciones que no estuvieron presentes a 50 ng/L. Varias de las lesiones que fueron observadas tales como células germinales de características anormales, formación de acúmulos celulares, desorganización del tejido testicular y pérdida de estructura de los cistos, han sido informadas por otros autores como cambios frecuentes que ocurren en los peces frente a la exposición a químicos con actividad hormonal (Gimeno et al., 1998b; Miles-Richardson et al., 1999a, 1999b; Zaroogian et al., 2001). Una de las lesiones más frecuentes hallada en *J. multidentata* fueron las Eg con características anormales. La bibliografía señala que el tratamiento con E₂ afecta las células de Sertoli (Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000). Se cree que la falla en la función de estas células es especialmente crítica durante la espermatogénesis, cuando las células germinales están en desarrollo, ya que la regulación de la espermatogénesis es una de las funciones más importantes que cumplen las células de Sertoli. Por consiguiente, la degeneración de las células germinales observada en machos de *J. multidentata* expuestos a E₂ puede ser el resultado de una función alterada de las células de Sertoli degeneradas. Esta idea es sustentada por los resultados obtenidos por Roggio et al. (2012), donde machos de la misma especie expuestos a E₂ evidenciaron hipertrofia de las células de Sertoli en cistos de estadios primordiales al ser observados con microscopía electrónica.

Wolf et al. (2004) observaron alteraciones en testículo de *P. promelas* expuestos a E₂ y utilizaron terminología descriptiva para un tipo celular cuyo origen no siempre resultó fácil de identificar mediante microscopía óptica. Estas células se denominaron células vacuolares y generalmente se presentaron con gran tamaño y con cantidades variables de vacuolización citoplasmática. Algunas contenían de una a varias vacuolas citoplasmáticas grandes que no desplazaron el núcleo, cuya apariencia sugirió que fueron Eg o Ec vacuolizados que comenzaron procesos degenerativos como

consecuencia de la exposición a E₂. Otras presentaron un citoplasma pálido y muy expandido con un núcleo marginal, condensado y de forma angular, cuyo origen podría ser otro tipo celular como células de Sertoli. Las descripciones realizadas por estos autores coinciden con lo observado en *J. multidentata*, por lo cual se utilizó la misma terminología para este tipo de células alteradas. Por otra parte, en esta especie se observó también la presencia de Ec bi o trinucleados, lo cual es acorde a lo informado por Roggio et al. (2012) al analizar machos expuestos a E₂ utilizando microscopía electrónica.

3.4 SECCIÓN B- 17 α -etinilestradiol (EE₂)

3.4.1 INTRODUCCIÓN

El 17 α -etinilestradiol (Fig. 3.10) es un componente activo de las pastillas anticonceptivas que ha sido seleccionado como modelo de EDC para bioensayos debido a su relevancia ambiental así como por sus efectos confirmados sobre el sistema reproductivo a través de las vías mediadas por receptores de estrógenos (RE) (Ankley et al., 2001; Metcalfe et al., 2001; MacLatchy et al., 2003).

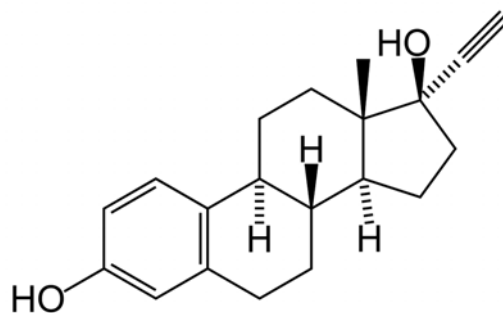


Figura 3.10 Forma estructural del 17 α - etinilestradiol.

Este compuesto posee la peligrosa combinación de ser activo a concentraciones de ng/L (D'Ascenzo et al., 2003) y estar específicamente diseñado para resistir la degradación con el fin de soportar el metabolismo (Kime, 1998). De este modo, luego de ser excretado por los seres humanos, el EE₂ ingresa a las PTE donde permanece relativamente estable durante los procesos de tratamiento de aguas residuales evitando la ruptura y eliminación (Ternes et al., 1999). Esta hormona es más persistente que los esteroides naturales en aguas superficiales y su potencial para adsorberse a los sedimentos es mayor (Bertin et al., 2011). Se encuentra ampliamente distribuido en los cursos de agua, en concentraciones que generalmente van desde los 0,05 a 15 ng/L; sin embargo se han detectado concentraciones excepcionalmente altas de 831 ng/L en Estados Unidos (Desbrow et al., 1998; Ternes et al., 1999; Kolpin et al., 2002; Ying et al.,

2002; Cargouët et al., 2004; Zuo et al., 2006). Un estudio llevado a cabo en la provincia de Buenos Aires (Argentina) reveló que la concentración de EE₂ en el río Girado fue de 43 ng/L y en un rango de 65 a 187 ng/L en efluentes cloacales (Valdés et al., 2010).

En los seres humanos la afinidad de unión del EE₂ a los RE es 1 a 2 veces mayor que la del E₂, y se ha demostrado que puede ser de 2 a 5 veces mayor en algunas especies de peces (Tilton et al., 2005; Shyu et al., 2011; Wise et al., 2011). Esta mayor afinidad por los RE indica que el EE₂ posee más potencia estrogénica comparado con la hormona endógena (Nash et al., 2004). Estudios recientes han demostrado que este compuesto puede ser de 10 a 50 veces más potente en peces que el E₂ en términos de ejercer una respuesta estrogénica (Thorpe et al., 2003; Nash et al., 2004; Zhang et al., 2009). La potencia estrogénica del esteroide, en combinación con su persistencia ambiental y la habilidad para bioconcentrarse en los tejidos de los peces (Lange et al., 2001; Nash et al., 2004; Al-Ansari et al., 2010), sumado a que la vida media (aproximadamente 46 días en aguas superficiales) y la acción toxicológica de este xenoestrógeno es magnificada debido a la recirculación enterohepática (Schultz et al., 2001; Young et al., 2004), convierten al EE₂ en un riesgo potencial para la biota.

Los efectos de este compuesto en los peces, incluso a bajas concentraciones (de 0,02 a 50 ng/L), están bien establecidos en muchas especies, incluyendo efectos sobre la expresión y actividad de la aromatasa (Scholz & Gutzeit, 2000; Kazeto et al., 2004; Lyssimachou et al., 2006; Vosges et al., 2010, 2011), alteraciones en el comportamiento reproductivo (Kristensen et al., 2005; Colman et al., 2009; Saaristo et al., 2009; Salierno & Kane, 2009; Söffker & Tyler, 2012), disminución en la fecundidad y el éxito reproductivo (Balch et al., 2004; Parrott & Blunt, 2005), reversión sexual (Lange et al., 2009; Scholz & Klüver, 2009; Pérez et al., 2012) y colapso de las poblaciones de peces (Kidd et al., 2007). El EE₂ generalmente produce una inhibición en el IGS (Jobling et al., 1996; Schultz et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Kristensen et al., 2005; Martyniuk et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2010) y alteraciones en la histología de las gónadas que incluyen inhibición de la espermatogénesis (Weber et al., 2003; Lin & Janz, 2006; Silva et al., 2012) pérdida de la estructura de los cistos y de la organización tisular (Islinger et al., 2003), presencia de células germinales apoptóticas, formación de acúmulos celulares y de sincitios (Velasco-Santamaría et al., 2010).

3.4.2 CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

La longitud estándar promedio y el peso promedio de los peces utilizados en este ensayo fue: $29,01 \pm 2,33$ mm y $0,49 \pm 0,13$ g, respectivamente. Las concentraciones nominales de 17 α - etinilestradiol (EE₂) (99,1% de pureza) utilizadas fueron: 10, 75 y 150 ng/L.

3.4.3 RESULTADOS

3.4.3.1 Mortalidad e Índices somáticos

Durante los 28 días de exposición no se registró mortalidad de peces en el grupo control. En los peces expuestos a las concentraciones de 10, 75 y 150 ng/L de EE₂ murieron 1, 3 y 2 peces respectivamente.

Al finalizar el ensayo los machos expuestos a 75 y 150 ng/L de EE₂ mostraron una disminución significativa en el IGS respecto a la concentración de 10 ng/L y al grupo control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el FC ni en el IHS entre tratamientos ($p > 0,05$, Tabla 3.2).

Índice	Valores	Concentración			
		Control	10 ng/L	75 ng/L	150 ng/L
FC	Media	1,95	1,98	1,99	1,89
	D.E.	0,14	0,13	0,12	0,17
	Mínimo	1,77	1,68	1,70	1,46
	Máximo	2,23	2,19	2,19	2,18
IHS	Media	2,42	2,66	2,39	2,75
	D.E.	0,63	0,71	0,46	0,80
	Mínimo	1,74	1,84	1,68	1,43
	Máximo	4,00	4,11	3,46	4,54
IGS	Media	2,77	2,66	1,90(*)	1,29(*)
	D.E.	0,78	0,55	0,44	0,65
	Mínimo	0,96	1,98	0,86	0,61
	Máximo	3,74	3,62	2,71	2,58

Tabla 3.2 Media, Desvío Estándar (D.E.) y valores mínimos y máximos de los índices somáticos *Factor de condición* (FC), *Índice Hepatosomático* (IHS) e *Índice Gonadosomático* (IGS) de machos de *J. multidentata* expuestos a distintas concentraciones de EE₂ durante 28 días. Diferencias significativas con respecto al grupo control se indican con asterisco (*) ($p < 0,05$).

3.4.3.2 Efectos del EE₂ sobre la expresión de aromataasa *cyp19a1*

Luego de 28 días, el efecto de la exposición a EE₂ sobre la abundancia de transcripto de *cyp19a1b* en cerebro no fue significativo a la concentración más baja ensayada (10 ng/L). Sin embargo, la exposición a 75 ng/L provocó un aumento significativo de 3,7 veces respecto al control. Dicho incremento no fue tan notorio a la concentración de 150 ng/L, donde se observó un aumento de 1,9 veces en la abundancia de transcripto de *cyp19a1b* respecto al grupo control (Fig. 3.11A). Por el contrario, no se observaron efectos sobre la expresión de *cyp19a1a* en las gónadas (Fig. 3.11B).

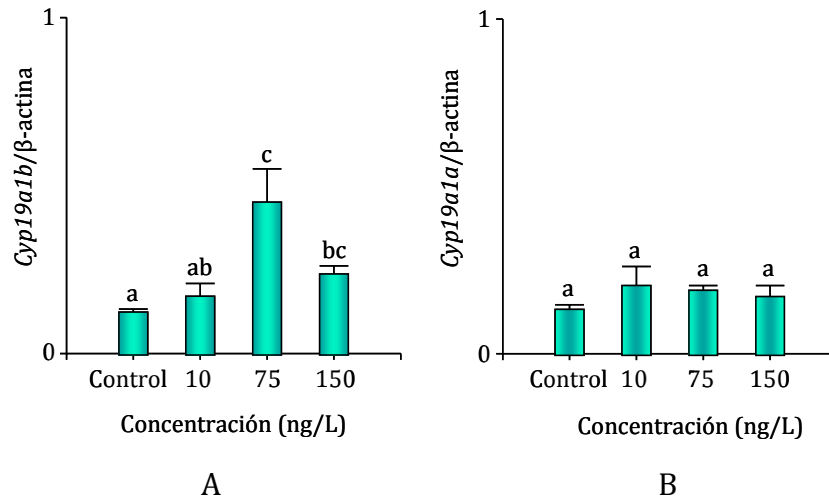


Figura 3.11 Expresión de los genes *cyp19a1* relativa a la β -actina en machos de *J. multidentata* expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -etinilestradiol medida por TR-PCR en tiempo real. **A)** Expresión de *cyp19a1b* en cerebro. **B)** Expresión de *cyp19a1a* en testículo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.4.3.3 Análisis histológico

El análisis histológico reveló que todos los estadios celulares de la espermatogénesis estuvieron presentes tanto en los controles como en los organismos expuestos. Los testículos de los controles presentaron una histología normal y no se observaron alteraciones (Fig. 3.12). El porcentaje promedio de Et y Ez en este grupo fue 85%.

Los individuos expuestos a la concentración de 10 ng/L de EE₂ manifestaron en promedio un 80% de estadios tardíos. Se observaron importantes alteraciones que incluyeron Eg con características anormales; acúmulos de Ec alterados; desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en distintos estadios espermatogénicos); presencia de células vacuolares; desincronización en el proceso de espermatogénesis (observándose Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo) y pérdida de estructura de los cistos (Fig. 3.13).

En los organismos expuestos a la concentración de 75 ng/L (Fig. 3.14) se observaron alteraciones similares a la concentración de 10 ng/L en cuanto a desorganización del tejido y desincronización de la espermatogénesis; pero a nivel de

las Eg se observó además de células vacuolares, necrosis. En cuanto a los porcentajes de cada estadio celular se observó en promedio un 85% de Et y Ez.

En los individuos expuestos a la concentración de 150 ng/L (Fig. 3.15) se observaron todas las alteraciones halladas en las concentraciones inferiores, pero la frecuencia de aparición y la extensión de las lesiones fueron mayores. Se observó además vacuolización de cistos completos. En cuanto a los porcentajes de cada estadio celular se observó en promedio un 87% de Et y Ez.

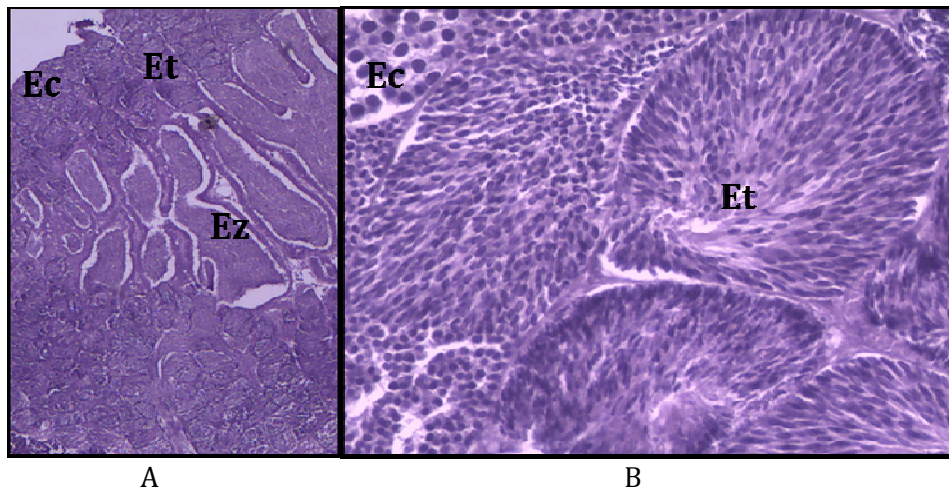


Figura 3.12 Corte histológico de testículo normal (control) de ejemplares adultos de *J. multidentata* donde puede observarse: **A)** la organización de los cistos (magnificación 10x); **B)** detalle de los cistos espermatogénicos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; Ez: espermatozoides.

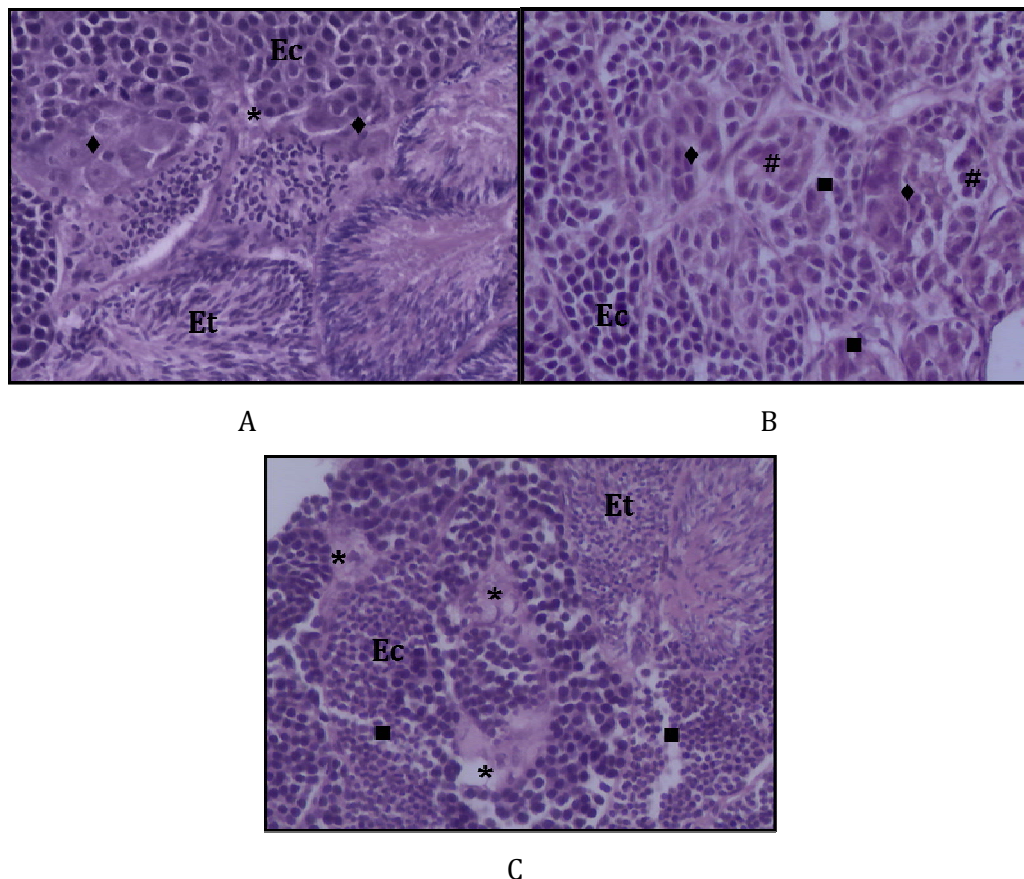


Figura 3.13 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 10 ng/L de EE₂ donde puede observarse: **A)** Ec muy alterados, con apariencia de Eg; células vacuolares y mezcla de cistos en distinto estadio espermatogénico (magnificación 40x); **B)** Ec con características anormales, acúmulos de Ec y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x), **C)** Células vacuolares, pérdida de estructura de los cistos y mezcla de cistos en distinto estadio espermatogénico (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares; cuadrado: pérdida de estructura del cisto; numeral: acúmulos de células.

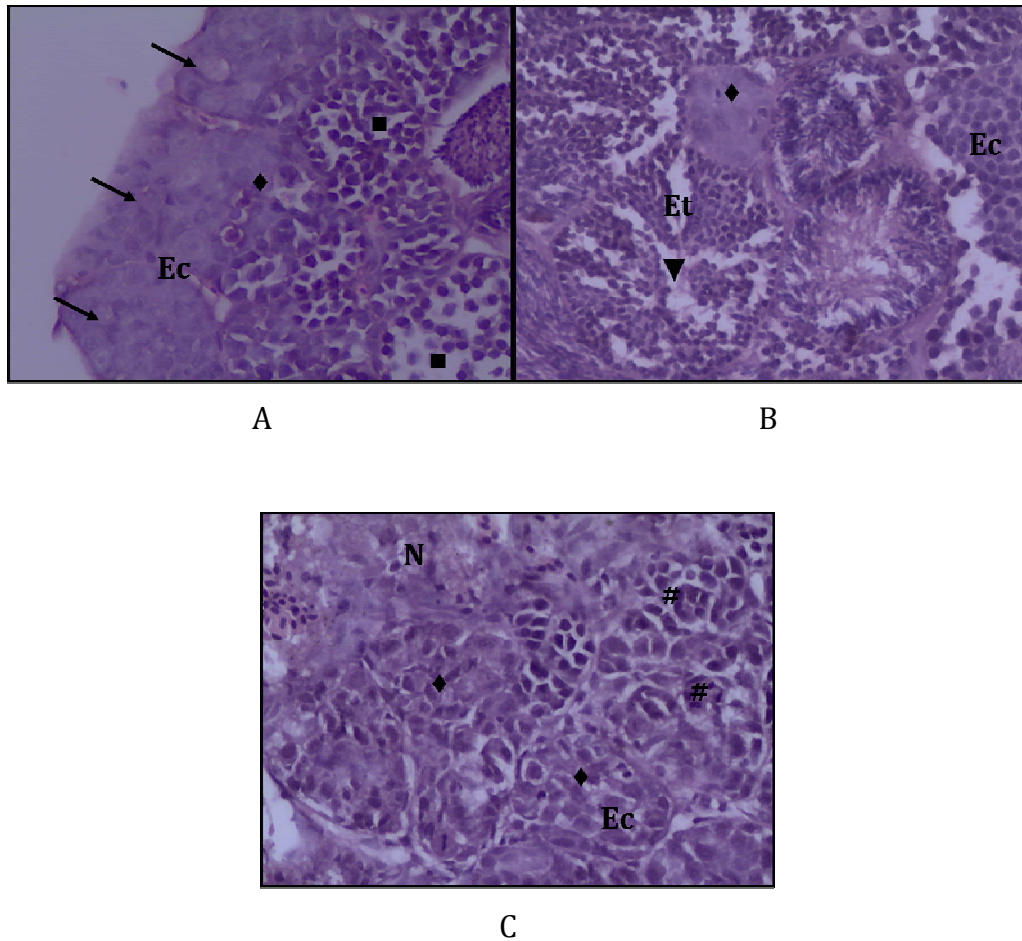


Figura 3.14 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 75 ng/L de EE₂ donde puede observarse: **A)** Eg y Ec con características anormales y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x); **B)** cisto de Ec muy alterados; mezcla de cistos en diferente estadio espermatogénico y desincronización en el proceso de espermatogénesis (observándose Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo) (magnificación 40x); **C)** cistos de Ec muy alterados; acúmulos de células y necrosis (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; rombo: Ec alterados; cuadrado: pérdida de estructura del cisto; triángulo: Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo; numeral: acúmulos celulares; N: necrosis.

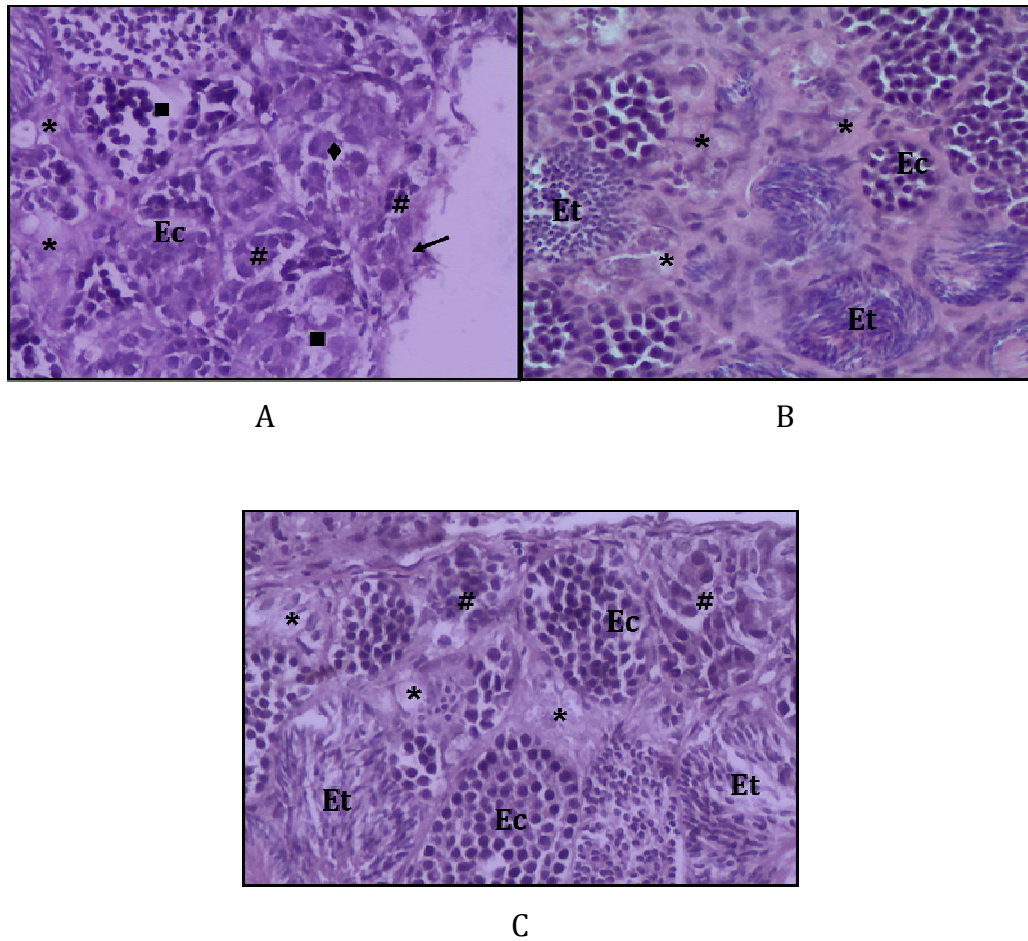


Figura 3.15 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 150 ng/L de EE₂ donde puede observarse: **A)** Eg y Ec con características anormales; acúmulos celulares; pérdida de estructura de los cistos y células vacuolares (magnificación 40x); **B)** células vacuolares; pérdida de la estructura y mezcla de cistos en diferente estadio espermatogénico (magnificación 40x); **C)** Eg y Ec alterados, gran cantidad de células vacuolares, acúmulos celulares y mezcla de cistos en diferente estadio espermatogénico (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; asterisco: células vacuolares; rombo: Ec alterados; cuadrado: pérdida de estructura del cisto; numeral: acúmulos celulares.

3.4.4 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican un impacto negativo del EE₂ en las gónadas de *J. multidentata*, lo cual se evidencia en la disminución del IGS. Este resultado coincide con estudios de laboratorio en los cuales se ha observado una reducción en la masa de los testículos de *O. mykiss* (Jobling et al., 1996; Schultz et al., 2003); *D. rerio* (Van den Belt et al., 2002); *Z. viviparous* (Velasco-Santamaría et al., 2010); *C. auratus* (Martyniuk et al., 2006), *P. reticulata* (Kristensen et al., 2005) y *P. promelas* (Pawlowski et al., 2004) luego de la exposición a este compuesto. Por el contrario, no se observaron efectos sobre el FC ni el IHS, en concordancia con los resultados informados en *D. rerio* expuestos a 1, 10, y 100 ng/L de EE₂ por 14 días (Versonnen & Janssen, 2004).

La exposición a EE₂ en concentraciones ambientalmente relevantes provocó un incremento en la expresión de la aromatasa cerebral en machos de *J. multidentata*. En concordancia, una regulación positiva en la expresión de *cyp19a1b* o actividad de la aromatasa cerebral luego de la exposición a este compuesto ha sido observada también en otras especies como *D. rerio* (Trant et al., 2001; Vosges et al., 2010); *O. latipes* (Contractor et al., 2004; Sun et al., 2011); *Salmo salar* (Lyssimachou et al., 2006); *C. auratus* (Martyniuk et al., 2006); *P. notatus* (Forlano & Bass, 2005); *R. rutilus* (Lange et al., 2008) y *Gobiocypris rarus* (Wang et al., 2010). En el presente estudio se observó un pico en la expresión de *cyp19a1b* a la concentración de 75 ng/L de EE₂, pero a la concentración más alta (150 ng/L) esta expresión disminuyó aunque mantuvo valores superiores al control. Este tipo de relación concentración-respuesta ha sido observada por otros autores. Por ejemplo, Halm et al. (2002) observaron que los niveles de expresión de la aromatasa de cerebro de machos de *P. promelas* expuestos a E₂ aumentaron con las concentraciones más bajas (32 y 100 ng/L) mientras que las concentraciones más altas mostraron un efecto inhibitorio. En la actualidad, es conocido que los EDCs pueden provocar respuestas que no se comportan linealmente ante aumentos en la dosis, y los efectos a bajas dosis no predicen lo que ocurre a altas dosis (Vandenberg et al., 2012). Por otra parte, está creciendo la evidencia que sustenta la idea de que existe un umbral de efecto de EE₂, en el cual bajas dosis pueden inducir funciones reproductivas (por ejemplo la producción de hormonas) mientras que las dosis más altas de estrógenos las inhiben (MacLatchy et al., 2003; Martyniuk et al.,

2006). Aunque aún no se comprende totalmente el rol del proceso de aromatización en la regulación del comportamiento sexual en los peces (Blázquez & Somoza, 2010; Vizziano-Cantonnet et al., 2011), se ha observado que alteraciones en la expresión o actividad de la aromatasa cerebral durante la exposición a EDCs provoca alteraciones en el comportamiento sexual de peces machos (Hallgren et al., 2006; Guyón et al., 2012a). Numerosos estudios han demostrado alteraciones en el comportamiento reproductivo de los machos debido a la exposición a EE₂, observando en general una demasculinización del mismo. Por ejemplo, Bell (2001) notó que los machos de *Gasterosteus aculeatus* expuestos a concentraciones de 10 a 50 ng/L de EE₂ durante un periodo de 8 a 32 días disminuyeron el comportamiento de cortejo y se mostraban menos interesados en las hembras. Un estudio llevado a cabo por Kristensen et al. (2005) evidenció que la exposición a EE₂ desde el nacimiento hasta la madurez de machos de *P. reticulata* provocó una disminución en la frecuencia y la duración de determinados comportamientos y casi la total supresión de la reproducción cuando los peces tuvieron que competir por parejas con machos no expuestos. Al analizar el comportamiento reproductivo de machos de *J. multidentata* expuestos a las mismas concentraciones de EE₂ que las utilizadas en esta tesis, Roggio et al. (2011) observaron una menor actividad sexual y una disminución significativa en todas las variables comportamentales analizadas (como tiempo de persecución, intentos de cópula y cópulas) respecto al grupo control, siendo esta diferencia mayor en las concentraciones más altas. Además, estos autores detectaron que todos los machos del grupo control fueron sexualmente activos mientras que los individuos expuestos evidenciaron menor interés hacia las hembras. A su vez, el efecto más nocivo del EE₂ sobre el comportamiento se observó a 75 ng/L, en coincidencia con el pico de expresión de aromatasa cerebral observado en este estudio. Melo & Ramsdell (2001) demostraron que la exposición a E₂ produce una feminización en el fenotipo del cerebro de los machos que incluye una elevación de los niveles totales de actividad de aromatasa y un incremento de actividad en áreas en las cuales las hembras exhiben niveles mayores. Siguiendo la propuesta de estos autores, los resultados de este estudio en *J. multidentata* muestran que el EE₂ induce fuertemente la expresión de *cyp19a1b* y esos niveles elevados de aromatasa podrían provocar una feminización del cerebro de los machos, lo cual podría ser la explicación para la disminución del comportamiento sexual observada por Roggio et al. (2011).

A diferencia de lo observado con la aromatasa cerebral, no se registraron efectos del EE₂ en la modulación de la expresión de *cyp19a1a* de *J. multidentata*. Un resultado similar fue hallado en *O. latipes* y *F. heteroclitus* luego de la exposición a 20 y 250 ng/L de este compuesto, respectivamente (Sun et al., 2011; Meina et al., 2013). Sin embargo, otras investigaciones han encontrado alteraciones en la expresión de la aromatasa gonadal debido al EE₂, pero los resultados son contradictorios. Por ejemplo, se ha observado una inhibición de *cyp19a1a* luego de la exposición a este compuesto en especies como *D. rerio*, *G. rarus* y *O. latipes* (Kazeto et al., 2004; Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010); mientras que otros autores observaron inducción de esta variante en *S. salar* y *O. bonariensis* (Lyssimachou et al., 2006; Pérez et al., 2012); de modo tal que el rol del EE₂ en la regulación de la expresión de *cyp19a1a* permanece poco clara.

En general, la exposición a EE₂ provoca una inhibición de la espermatogénesis, con un consecuente aumento de los estadios espermatogénicos tempranos junto con una menor cantidad de Et y Ez (Van den Belt et al., 2002; Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Lin & Janz, 2006; Silva et al., 2012). En este estudio no se encontraron diferencias en la composición de cistos de distintos estadios celulares, lo cual coincide con el resultado publicado por Kinnberg & Toft (2003) y Nielsen & Baatrup (2006). Sin embargo, la evaluación histológica demostró notables daños provocados por la exposición a EE₂, incluso en la concentración más baja del tóxico. Una de las alteraciones más frecuentes (presente en todas las concentraciones de exposición) fue la presencia de células germinales de características anormales (tanto Eg como Ec), células vacuolares y la formación de acúmulos celulares. Este resultado también ha sido observado por varios autores luego de la exposición de peces macho adultos a compuestos estrogénicos (Christiansen et al., 1998; Gimeno et al., 1998b; Lange et al., 2001; Weber et al., 2002, 2003; Pawlowski et al., 2004; Velasco-Santamaría et al., 2010). Por otra parte, se observó también la pérdida de estructura de los cistos y de la organización tisular, resultado que concuerda con lo hallado por otros autores luego de la exposición a estrógenos ambientales (Christiansen et al., 1998; Islinger et al., 2003; Rey-Vázquez et al., 2009). Otro daño detectado fue la presencia de necrosis, lo cual ha sido observado también en *Cyprinodon variegatus* (Zillioux et al., 2001), *P. promelas* (Palace et al., 2002), *Zoarcetes viviparus* (Velasco-Santamaría et al., 2010) y *D. rerio* (Silva et al., 2012) luego de la exposición a EE₂. Roggio et al. (2012) revelaron a través de microscopía electrónica de testículos de machos de *J. multidentata* expuestos a las

mismas concentraciones de EE₂ que las utilizadas en este estudio daños histológicos tales como importantes cantidades de células vacuolares, fagocitosis de cistos completos por células de Sertoli y fibrosis en el espacio intersticial, corroborando los resultados hallados en este estudio.

3.5 SECCIÓN C- 4n-nonilfenol (NF)

3.5.1 INTRODUCCIÓN

Los alquilfenoles polietoxilados (APEOs) son una clase importante de surfactantes no iónicos ampliamente utilizados en las formulaciones de detergentes y productos plásticos de uso industrial y doméstico (Giger et al., 1984). Se ha estimado que el 60% de los APEOs finalizan en los ambientes acuáticos (Naylor, 1992), ingresando principalmente a través de PTE. La degradación microbiana de estos compuestos durante los tratamientos de efluentes produce alquilfenoles como el 4 n-nonilfenol (NF) (Fig. 3.16).

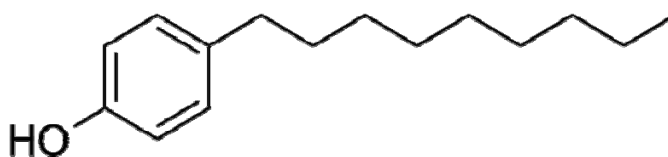


Figura 3.16 Forma estructural del 4n -Nonilfenol.

Este compuesto es utilizado como materia prima para la producción de agentes activos superficiales, estabilizadores de etil-celulosa, fenil-resinas solubles en aceites, ésteres, insecticidas, bactericidas, como así también en la producción de detergentes, barnices aceitosos, caucho, aceleradores de vulcanización, antioxidantes e inhibidores de corrosión para productos de petróleo, entre otros (Vázquez-Duhalt et al., 2005; Soares et al., 2008). Este compuesto es considerado uno de los metabolitos más perjudiciales debido a su toxicidad, difícil biodegradación y a su capacidad para bioacumularse en los organismos acuáticos (Ahel et al., 1994). Se ha demostrado que el NF se incorpora en los peces desde el agua a través de las branquias, superficie del cuerpo, y de la ingestión de alimentos contaminados (Lewis & Lech, 1996; Tsuda et al.,

2000; Van Der Kraak et al., 2001). En comparación con el E₂ o EE₂, el NF exhibe una potencia estrogénica débil (Legler et al., 2002), y los efectos estrogénicos que produce en peces se observan en general en el rango de µg/L (Jobling & Sumpter, 1993; Ackermann et al., 2002).

Este compuesto posee una vida media de 1,2 días en aguas superficiales (Vázquez-Duhalt et al., 2005) y las concentraciones halladas en cursos de agua varían desde 0,2 µg/L hasta concentraciones tan altas como 644 µg/L (Solé et al., 2000). En el Reino Unido se han encontrado valores de 180 µg/L (Blackburn & Waldock, 1995) y en Estados Unidos de 95 µg/L (Dachs et al., 1999). Los efluentes de varias PTE de Suiza contenían niveles de NF desde 0,28 a 2,98 µg/L (Giger et al., 1999), mientras que en Bélgica e Italia las concentraciones halladas fueron 2,2 y 0,53 µg/L, respectivamente (Loos et al., 2007). En ríos de España se detectaron concentraciones de 15 µg/L (Petrovic et al., 2002) y en China de 1,9 a 32,8 µg/L (Wu et al., 2007). En lo que respecta a nuestro país, se han registrado valores de 35 µg/L de NF en efluentes de una PTE ubicada en los alrededores de la capital de la provincia de Buenos Aires, y 27 µg/L en el arroyo Morón, que recibe dichos efluentes (Babay et al., 2008).

En cuanto a las alteraciones que este tóxico produce en los peces, diversos estudios han demostrado sus efectos estrogénicos tanto en machos adultos como en juveniles de distintas especies (White et al., 1994; Jobling et al., 1996; Korsgaard & Pedersen, 1998; Cardinali et al., 2004), y es considerado un modelo de EDC que actúa como un agonista sobre los RE, modificando por lo tanto la expresión de genes dependientes de estrógenos *in vitro* e *in vivo* en numerosos modelos biológicos, incluyendo peces (Ahel et al., 1993; Jobling et al., 1996; Tyler et al., 1998; Tsuda et al., 2001; Soares et al., 2008). Entre estos genes se encuentran los genes *cyp19a1*. Se ha observado que la exposición a NF provoca en general una regulación positiva sobre la aromatasa cerebral (Kazeto et al., 2004; Meucci & Arukwe, 2006a, 2006b; Hinfrey et al., 2008; Vosges et al., 2011), aunque también se ha registrado inhibición sobre esta variante (Shanthanagouda et al., 2013).

Al igual que otros compuestos estrogénicos, el NF generalmente produce disminución en el IGS (Jobling et al., 1996; Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000) y alteraciones en la histología del testículo que incluyen degeneración celular, formación de sincitios en las células germinales, necrosis y pérdida de estructura de los

cistos (Christiansen et al., 1998; Miles-Richardson et al., 1999b; Kwak et al., 2001; Weber et al., 2002).

3.5.2 CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

La longitud estándar promedio y el peso promedio de los peces capturados para este ensayo fue: $26,52 \pm 2,71$ mm y $0,36 \pm 0,13$ g, respectivamente. Las concentraciones nominales de 4n-nonilfenol (NF) (99,9% de pureza) utilizadas fueron: 1 y 10 $\mu\text{g/L}$.

Se determinaron las concentraciones de NF en el agua de las peceras mediante Microextracción en fase sólida- Cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masas (SPME-GC-MS). Se utilizó una fibra compuesta de Divinilbenceno- Carboxeno- Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) en contacto con distintas diluciones de NF por 40 minutos a 60 °C y agitación (250 rpm) usando un muestreador automático (Varian Combi Pal). El NF absorbido en la fibra fue luego desorbido en el inyector del GC durante 3 min a 280 °C; los iones monitoreados fueron 220 m/z y 107 m/z. Este método permitió un límite de detección en la muestra de agua de 0,2 $\mu\text{g/L}$ de NF (Bonansea et al., 2010). Las muestras fueron colectadas antes y después del recambio de agua de las peceras en botellas de vidrio y conservadas a 4 °C hasta el momento de la medición.

3.5.3 RESULTADOS

3.5.3.1 Contenido de NF en agua

Se obtuvieron niveles residuales del 85% y 72% de la concentración nominal a las 24 y 48 horas respectivamente, por lo cual el recambio de agua se realizó cada 48 hs. Si bien se cuenta con las concentraciones reales de NF en la exposición, para mostrar los resultados se utilizarán los valores nominales con el fin de facilitar la lectura.

3.5.3.2 Mortalidad e Índices somáticos

Durante los 28 días de exposición sólo 1 pez murió en el grupo control y no se registró mortalidad en los peces expuestos a NF.

No se registraron diferencias significativas en el FC, el IGS ni el IHS entre tratamientos luego de 28 días ($p > 0,05$; Tabla 3.3).

Índice	Valores	Concentración		
		Control	1 µg/L	10 µg/L
FC	Media	1,73	1,81	1,85
	D.E.	0,26	0,24	0,16
	Mínimo	1,20	1,48	1,66
	Máximo	2,04	2,37	2,10
IHS	Media	2,81	2,94	2,54
	D.E.	1,07	1,01	0,40
	Mínimo	1,16	1,74	1,61
	Máximo	4,29	5,69	3,02
IGS	Media	3,29	3,18	3,41
	D.E.	1,50	0,70	0,86
	Mínimo	0,20	1,90	2,40
	Máximo	5,95	3,99	5,03

Tabla 3.3 Media, Desvío Estándar (D.E.) y valores mínimos y máximos de los índices somáticos *Factor de condición* (FC), *Índice Hepatosomático* (IHS) e *Índice Gonadosomático* (IGS) de machos de *J. multidentata* expuestos a distintas concentraciones de NF durante 28 días.

3.5.3.3 Efectos del NF sobre la expresión de aromatasa *cyp19a1*

La expresión de *cyp19a1b* se vio significativamente aumentada luego de la exposición crónica a NF. A pesar de que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas (Fig. 3.17A), se observó una tendencia al aumento concentración-dependiente en la abundancia de transcripto de *cyp19a1b*. La expresión de *cyp19a1b* evidenció una inducción de 4,9 y 8,5 veces con respecto al grupo control en

los individuos expuestos a 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ de NF, respectivamente. Por el contrario, no se observaron efectos significativos en la expresión de aromatasa *cyp19a1a* (Fig. 3.17B).

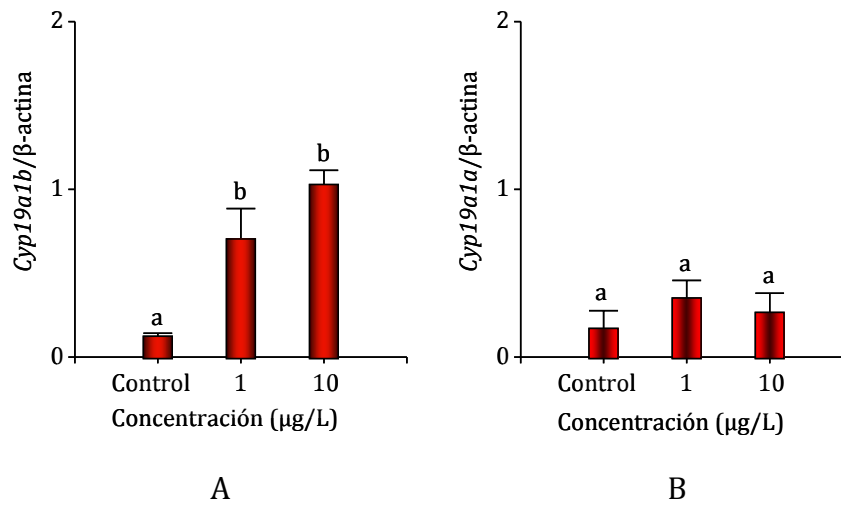


Figura 3.17 Expresión de los genes *cyp19a1* relativa a la β -actina en machos de *J. multidentata* expuestos a diferentes concentraciones de 4n-nonilfenol medida por TR-PCR en tiempo real. **A)** Expresión de *cyp19a1b* en cerebro. **B)** Expresión de *cyp19a1a* en testículo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.5.3.4 Análisis histológico

El análisis de los cortes histológicos reveló que en todos los tratamientos, incluidos los controles, los estadios celulares predominantes fueron las Et y Ez (alrededor del 90%), mientras que las Eg y Ec siempre representaron un porcentaje muy bajo. En los controles las Eg se observaron sin alteraciones así como los cistos que se presentaron bien definidos (Fig. 3.18).

En los peces expuestos a la concentración de 1 $\mu\text{g/L}$ de NF (Fig. 3.19) las lesiones más comunes incluyeron Eg con características anormales y presencia de células vacuolares.

En la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 3.20) no sólo las Eg se presentaron muy alteradas sino también los Ec. Se observó formación de acúmulos celulares de Ec; desincronización del proceso de espermatogénesis (presencia de células en distintos estadios espermatogénicos dentro de un cisto); y pérdida de estructura de los cistos.

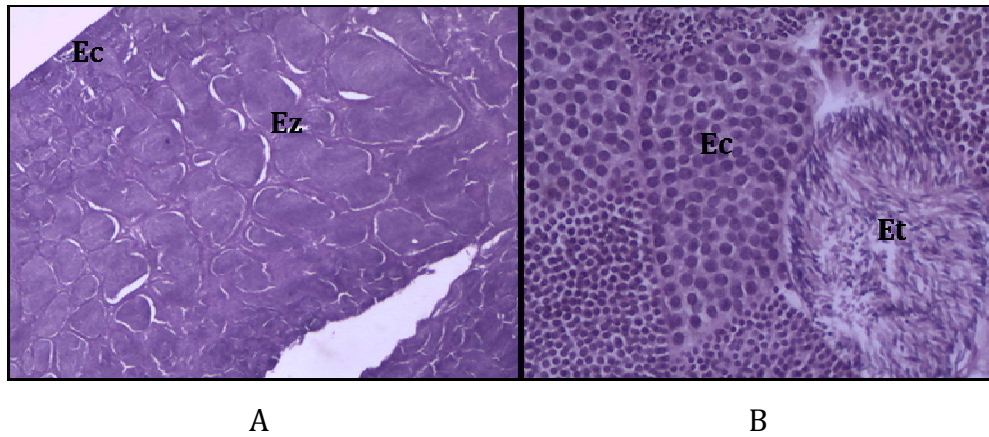


Figura 3.18 Corte histológico de testículo normal (control) de ejemplares adultos de *J. multidentata* donde puede observarse: **A)** la organización de los cistos (magnificación 10x); **B)** detalle de los cistos espermatogénicos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; Ez: espermatozoides.

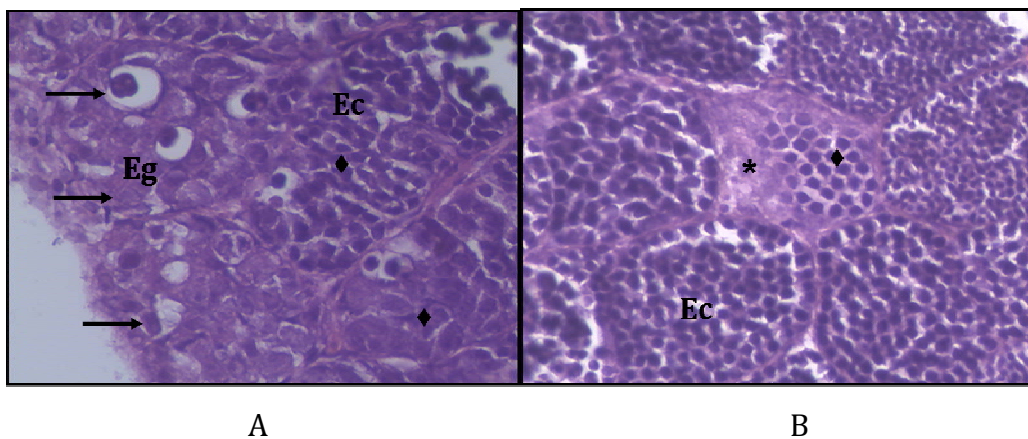


Figura 3.19 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 1 µg/L de NF donde puede observarse: **A)** Eg y Ec con características anormales (magnificación 40x); **B)** Cisto de Ec con células vacuolares (magnificación 40x). Referencias: Eg indica espermatogonias; Ec: espermatocitos; flecha: Eg con características anormales; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares.

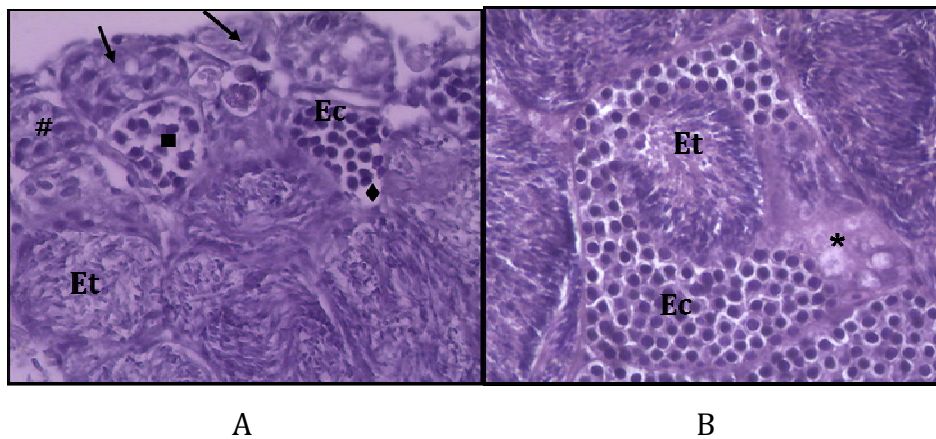


Figura 3.20 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ de NF donde puede observarse: **A)** Eg y Ec muy alterados; acúmulos celulares y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x); **B)** desincronización del proceso de espermatogénesis (células en distinto estadio espermatogénico dentro del mismo cisto) y células vacuolares (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares; cuadrado: pérdida de estructura del cisto; numeral: acúmulos celulares.

3.5.4 DISCUSION

En general la exposición a NF causa una disminución en la masa de los testículos (Jobling et al., 1996; Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000). Sin embargo, en este estudio ni el IHS ni el IGS se vieron afectados por el compuesto. Este resultado es consistente con lo observado por otros autores, en donde concentraciones ambientalmente relevantes de NF (en el rango de 0,1 a 10 µg/L) causaron efectos mínimos en el peso de ambos órganos (Villeneuve et al., 2002; Schoenfuss et al., 2008).

En numerosas especies de peces se ha demostrado una disrupción en la síntesis de esteroides debida a NF (Arukwe & Goksøyr, 1998). Los resultados de este estudio demuestran que el NF produjo un aumento en la expresión de la aromatasa cerebral en *J. multidentata*. En concordancia, se ha observado que exposiciones a este compuesto provocan una regulación positiva en la expresión de esta variante en *D. rerio* (Kazeto et al., 2004; Hinfray et al., 2008; Vosges et al., 2011), *Rivulus marmoratus* (Lee et al., 2006) y *S. salar* (Meucci & Arukwe, 2006a, 2006b); aunque otros autores han registrado inhibición en su expresión en exposiciones agudas a altas concentraciones del compuesto (Shanthanagouda et al., 2013). En cuanto a la forma gonadal, la exposición al tóxico no produjo alteraciones en la abundancia de transcripto de *cyp19a1a* en testículos de *J. multidentata*.

Al analizar el comportamiento reproductivo de machos de *J. multidentata* expuestos a las mismas concentraciones de NF (Roggio et al., 2011) se observó que el compuesto provocó una reducción significativa del mismo que se evidenció en una disminución concentración dependiente en el número de cópulas, en la proporción de persecuciones que comprendieron intentos de cópula y en el porcentaje de intentos que finalizaron en cópulas. Numerosos estudios de laboratorio han informado una disminución en el comportamiento sexual de los machos de diferentes especies luego de la exposición a alquilfenoles. En *P. promelas* la exposición a NF durante 28 días a concentraciones ambientalmente relevantes provocó una disminución en el comportamiento cuando los machos expuestos debieron competir con los controles por el acceso al nido y a las hembras (Schoenfuss et al., 2008). Machos adultos de *P. reticulata* expuestos a 4-*tert*-octilfenol (150 µg/L) durante 4 semanas disminuyeron el número y la intensidad del comportamiento de exhibición comparado con machos

control (Bayley et al., 1999). Por otra parte, la exposición a 4-*tert*-octilfenol afectó negativamente la performance reproductiva de machos de *O. latipes* como resultado de una disminución en la intensidad de cortejo comparado con los controles (Gray et al., 1999). Debido a que los andrógenos son el sustrato de la aromatasa, una inducción de esta enzima puede conducir a una disminución en los niveles de andrógenos y a un aumento en los niveles de estrógeno resultando así en la pérdida de rasgos masculinos (Meucci & Arukwe, 2006b). Tal como se mencionó en la sección A, estudios en machos de *O. latipes* tratados con E₂ mostraron una feminización en el fenotipo del cerebro en cuanto a distribución y niveles de actividad de la aromatasa (Melo & Ramsdell, 2001) y esta feminización puede conducir a una demasculinización del comportamiento. Los resultados en *J. multidentata* demostraron que el NF indujo fuertemente la expresión de *cyp19a1b*, y aún cuando las diferencias no fueron significativas entre tratamientos, se observó una tendencia hacia el aumento concentración dependiente en la expresión de la aromatasa cerebral. Es probable que esta expresión aumentada esté relacionada con la inhibición concentración dependiente del comportamiento reproductivo observada por Roggio et al. (2011).

La exposición a NF provocó alteraciones histológicas en testículos de *J. multidentata*, a diferencia de lo informado en un estudio realizado por Schwaiger et al. (2002), en el cual no hallaron efectos al exponer machos adultos de *O. mykiss* a las mismas concentraciones que las utilizadas en este estudio. En diversas especies tales como *Z. viviparus* (Christiansen et al., 1998), *P. promelas* (Miles-Richardson et al., 1999b) y *Xiphophorus helleri* (Kwak et al., 2001) se han detectado alteraciones en la estructura del testículo debidas a la exposición a NF. Estas alteraciones incluyen degeneración de las células germinales y necrosis de los diferentes estadios celulares; lo cual concuerda con lo hallado en *J. multidentata*. Otras alteraciones tales como la formación de acúmulos celulares en los estadios de Ec también han sido observadas por otros autores luego de la exposición de peces machos adultos a compuestos químicos con actividad estrogénica (Christiansen et al., 1998; Gimeno et al., 1998a; Miles-Richardson et al. 1999b; Kwak et al., 2001; Weber et al., 2002). A la concentración más alta de NF estudiada, los límites de muchos cistos no se encontraron bien definidos, se observaron cistos dilatados e incluso pérdida de la estructura de los mismos. La pérdida de la estructura lobular fue también observada en *Z. viviparus* y *Cichlasoma dimerus* luego de la exposición a NF (Christiansen et al., 1998; Rey-Vázquez et al., 2009). Si bien

las alteraciones observadas en las diferentes concentraciones estudiadas en este trabajo no difirieron profundamente, sí se observó un aumento en la cantidad y extensión de las lesiones a la concentración más alta (10 µg/L). Este resultado coincide con el de Miles-Richardson et al. (1999b) y Kinnberg et al. (2000), en donde los efectos del NF en la histología del testículo de *P. promelas* y *Xiphophorus maculatus* respectivamente, aumentaban de modo concentración dependiente.

3.6 SECCIÓN D- 17 α -Metiltestosterona (MT)

3.6.1 INTRODUCCIÓN

Un amplio número de andrógenos naturales y sintéticos se utilizan en terapias humanas y veterinarias o como promotores del crecimiento, y pueden ser liberados en el ambiente acuático a través de los efluentes de las PTE (Chang et al., 2008). La 17 α -metiltestosterona (MT) (Fig. 3.21), es un andrógeno sintético comúnmente utilizado en acuicultura para obtener poblaciones monosexo macho (Blázquez et al., 1995; Arslan & Phelps, 2004; El-Greisy & El-Gamal, 2012) y ha sido utilizado también como modelo de andrógeno para investigar los efectos de xenoandrógenos (Ankley et al., 2001; Hornung et al., 2004; Pawlowski et al., 2004; Seki et al., 2004).

Una de las técnicas más comunes para obtener poblaciones monosexo es la inducción de inversión sexual mediante esteroides (Hunter & Donaldson, 1983). Un problema hallado al utilizar este método para inducir la masculinización es una feminización paradójica, la cual consiste en una producción involuntaria de poblaciones feminizadas. Se cree que este fenómeno se produce por la aromatización del andrógeno a estrógenos (Piferrer & Donaldson, 1993). La MT es el agente masculinizante más comúnmente utilizado en acuicultura (Pandian & Sheela, 1995), pero es susceptible a la aromatización y se ha demostrado que este compuesto produce tanto efectos androgénicos como estrogénicos en peces dependiendo de su concentración (Andersen et al., 2001; Ankley et al., 2001; Parrott & Wood, 2002; Zerulla et al., 2002; Örn et al., 2003; Halhbeck, 2004; Hornung et al., 2004). Por ejemplo, Andersen et al. (2001) expusieron embriones de *D. rerio* desde el momento de la fertilización hasta la maduración sexual y obtuvieron masculinización en los peces expuestos a 1 $\mu\text{g/L}$ de MT y feminización a 10 $\mu\text{g/L}$; un resultado similar fue obtenido por Örn et al. (2003) en juveniles de la misma especie. Piferrer et al. (1993) expusieron embriones genéticamente hembras de *Oncorhynchus tshawytscha* a un rango de concentraciones de 3,2 a 10000 $\mu\text{g/L}$ de MT y observaron una completa masculinización a 400 $\mu\text{g/L}$, mientras que a concentraciones más altas el porcentaje de machos disminuyó

aumentando la cantidad de hembras y de intersexos. La producción simultánea de efectos androgénicos y estrogénicos posiblemente se deba a que la MT puede ser convertida al potente estrógeno 17 α -metilestradiol (ME₂) debido a la acción de la aromatasa (Simpson et al., 1994). Experimentos de unión competitivos con RE en *P. promelas* indicaron que el ME₂ posee una afinidad de unión por el RE sólo un poco menor que la hormona endógena E₂. Contrariamente, la MT presenta muy poca afinidad por el RE y sólo a altas concentraciones. Esto sugiere que los efectos estrogénicos pueden deberse a la aromatización de la MT a ME₂ (Hornung et al., 2004; Pawlowski et al., 2004).

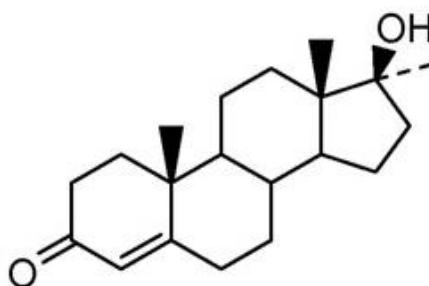


Figura 3.21 Forma estructural de la 17 α -metiltestosterona.

En general, exposiciones a MT en el rango de $\mu\text{g/L}$ provocaron una inhibición de la aromatasa cerebral (Melo et al., 1999; Kitano et al., 2000; Hornung et al., 2004); aunque se ha observado también inducción en la expresión de esta variante en peces expuestos al mismo rango de concentraciones y en tiempos de exposición similares (Trant et al., 2001; Fenske & Segner, 2004). Sin embargo, concentraciones ambientalmente relevantes del compuesto no causaron efectos en esta enzima (Andersen et al., 2003, 2006). A nivel histológico, la principal alteración que ha sido observada luego de la exposición al tóxico es la presencia de intersexo, es decir, folículos ováricos en testículos de diversas especies tales como *D. labrax* (Blázquez et al., 2001), *D. rerio* (Andersen et al., 2001; Örn et al., 2003) *O. latipes* (Seki et al., 2004; Kang et al., 2008) y *G. aculeatus* (Halhbeck, 2004).

La mayoría de los experimentos realizados con el fin de estudiar los efectos de la MT han sido llevados a cabo utilizando concentraciones relativamente altas del

andrógeno, en el rango de los $\mu\text{g/L}$ (Ankley et al., 2001; Hornung et al., 2004; Pawlowski et al., 2004), a pesar de que el compuesto está presente en el ambiente en el rango de los ng/L . Por ejemplo, en efluentes de una industria química en los Países Bajos se detectaron 1,3 ng/L de MT (Blankvoort et al., 2005) y de 4,1 a 7 ng/L en efluentes de una PTE y de una piscifactoría de China (Sun et al., 2010). En la cuenca del Río Suquia, Valdés et al. (2012) detectaron valores $<0,1 \text{ ng/L}$ de este compuesto.

3.6.2 CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

La longitud estándar promedio y el peso promedio de los peces utilizados en este ensayo fue: $28,56 \pm 3,31 \text{ mm}$ y $0,48 \pm 0,17 \text{ g}$, respectivamente. Las concentraciones nominales de 17 α -metiltestosterona (MT) utilizadas fueron: 5, 50 y 100 ng/L .

Se determinó el contenido de MT en el agua de las peceras mediante una extracción en fase sólida y posterior análisis con un cromatógrafo líquido de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HPLC-QTOF cuadrupolo-tiempo de vuelo, Agilent Technologies-Bruker) con interfase electrospray (ESI) en modo positivo. La cuantificación se llevó a cabo por el método de estándar externo, utilizando el tiempo de retención y la masa del ión molecular para la identificación del compuesto (Valdés et al., 2012). Las muestras fueron colectadas antes y después del recambio de agua de las peceras en botellas de vidrio y conservadas a 4 °C hasta el momento de la medición.

3.6.3 RESULTADOS

3.6.3.1 Contenido de MT en agua

Se obtuvieron niveles residuales del 78% y 22% del compuesto adicionado a las 24 y 48 horas respectivamente, por lo cual el recambio de agua se realizó cada 24 hs. Si bien se cuenta con las concentraciones reales de MT en la exposición, para mostrar los resultados se utilizarán los valores nominales con el fin de facilitar la lectura.

3.6.3.2 Mortalidad e Índices somáticos

Durante los 28 días de exposición no se registró mortalidad de peces en ninguno de los tratamientos.

Al finalizar el ensayo no se registraron diferencias significativas en el FC, el IGS ni el IHS entre los tratamientos ($p > 0,05$; Tabla 3.4).

Índice	Valores	Concentración			
		Control	5 ng/L	50 ng/L	100 ng/L
FC	Media	1,95	1,97	1,95	1,95
	D.E.	0,11	0,12	0,13	0,12
	Mínimo	1,80	1,78	1,73	1,68
	Máximo	2,09	2,22	2,15	2,13
IHS	Media	2,77	2,15	2,21	2,14
	D.E.	2,11	0,81	0,81	0,58
	Mínimo	1,17	1,54	0,95	1,26
	Máximo	6,47	4,39	4,10	3,50
IGS	Media	3,38	3,25	3,30	3,20
	D.E.	1,05	0,63	0,73	0,86
	Mínimo	2,08	2,45	2,02	1,84
	Máximo	4,47	4,94	4,25	4,84

Tabla 3.4 Media, Desvío Estándar (D.E.) y valores mínimos y máximos de los índices somáticos *Factor de condición* (FC), *Índice Hepatosomático* (IHS) e *Índice Gonadosomático* (IGS) de machos de *J. multidentata* expuestos a distintas concentraciones de MT durante 28 días.

3.6.3.3 Efectos de la MT sobre la expresión de aromatasa *cyp19a1*

No se observaron efectos significativos de la exposición a MT sobre la abundancia de transcritos de *cyp19a1b* en cerebro (Fig. 3.22A) ni *cyp19a1a* en las gónadas de *J. multidentata* (Fig. 3.22B).

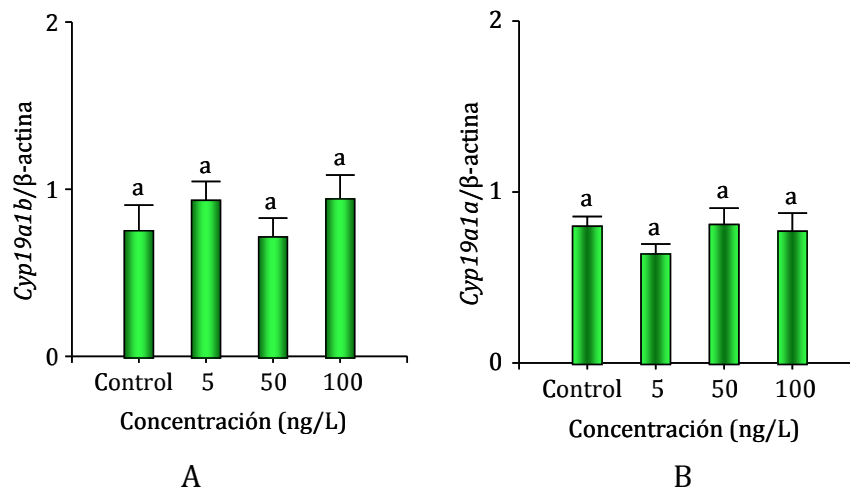


Figura 3.22 Expresión de los genes *cyp19a1* relativa a la β -actina en machos de *J. multidentata* expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -metiltestosterona medida por TR-PCR en tiempo real. **A)** Expresión de *cyp19a1b* en cerebro. **B)** Expresión de *cyp19a1a* en testículo. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.6.3.4 Análisis histológico

En el análisis de los cortes histológicos de los diferentes tratamientos se observó que todos los estadios celulares de la espermatogénesis estuvieron presentes y que las espermatogonias (Eg) siempre representaron un porcentaje muy bajo tanto en los controles como en los organismos expuestos a MT. Los individuos controles presentaron un 80% de Et y Ez y no se observaron alteraciones histológicas (Fig. 3.23).

Los peces expuestos a la concentración de 5 ng/L de MT evidenciaron en promedio un 76% de Et y Ez. Se observaron Eg con características anormales; presencia de células vacuolares; formación de acúmulos celulares; desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en distintos estadios espermatogénicos) y pérdida de estructura de los cistos (Fig. 3.24).

Los organismos expuestos a la concentración de 50 ng/L evidenciaron un 74% de estadios maduros. Se observaron alteraciones similares a la concentración de 5 ng/L y se observó además congestión y necrosis (Fig. 3.25).

En la concentración de 100 ng/L se observaron alteraciones similares a las halladas en las concentraciones inferiores pero con mayor frecuencia y extensión. La desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en distintos estadios

espermatogénicos) se observó en todos los preparados ocupando la mayor parte del tejido. Se observó también una desincronización del proceso de espermatogénesis (Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo) y pérdida de estructura de los cistos (Fig 3.26). En cuanto a los porcentajes de cada estadio celular evidenció un 80% de Et y Ez.

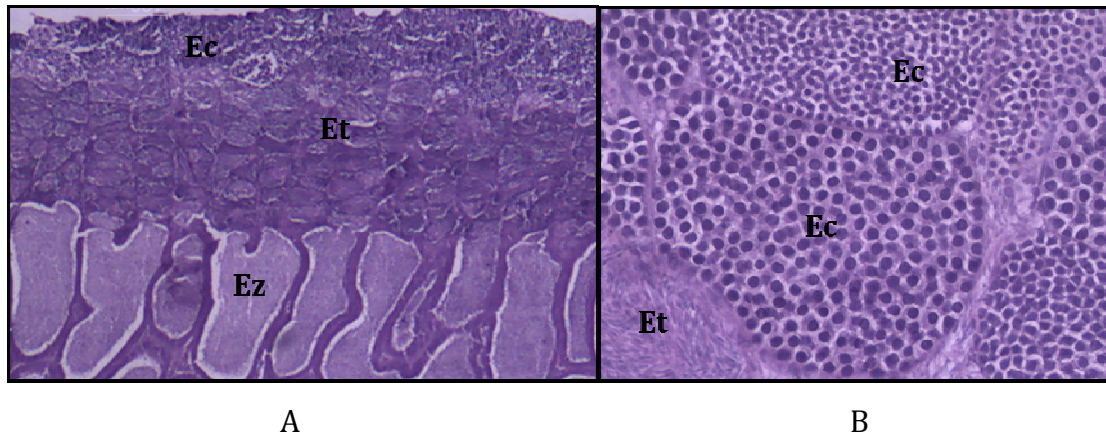


Figura 3.23 Corte histológico de testículo normal (control) de ejemplares adultos de *J. multidentata* donde puede observarse: **A)** la organización de los cistos (magnificación 10x); **B)** detalle de los cistos espermatogénicos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; Ez: espermatozoides.

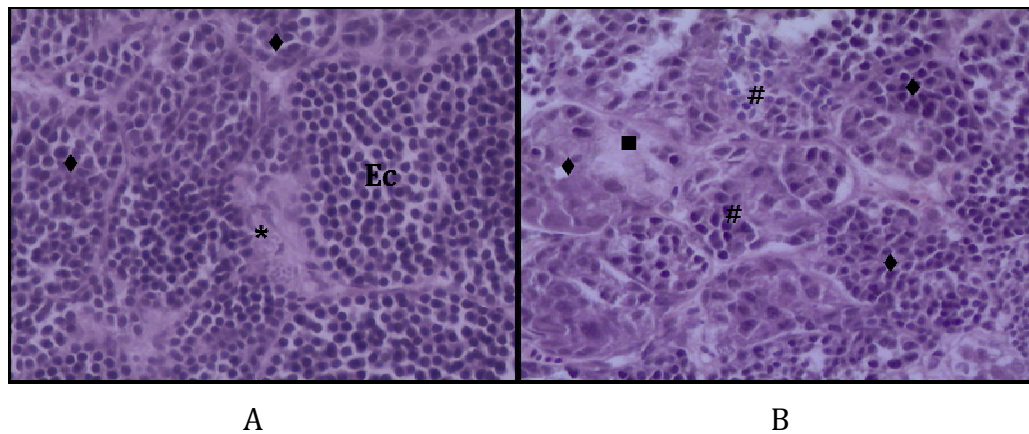


Figura 3.24 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 5 ng/L de MT donde puede observarse: **A)** Cistos de Ec con características anormales y células vacuolares (magnificación 40x); **B)** Ec alterados; formación de acúmulos celulares y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatocitos; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares; numeral: acúmulos celulares; cuadrado: pérdida de estructura de los cistos.

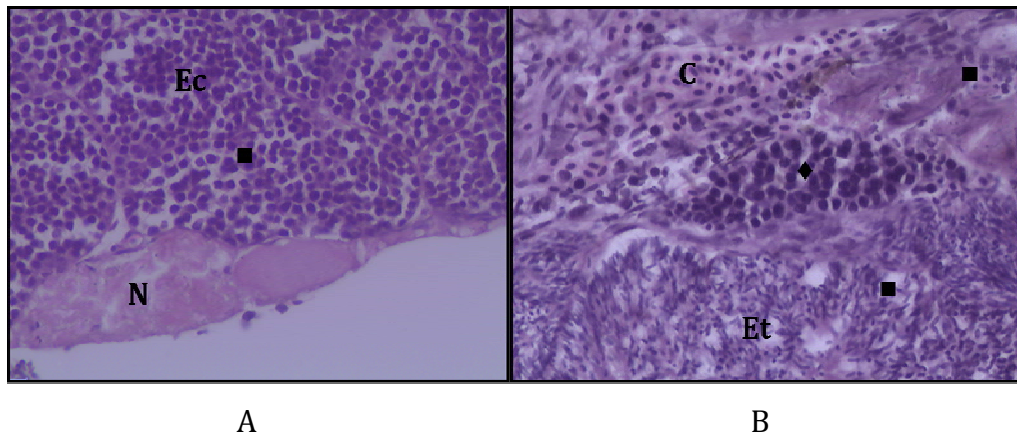


Figura 3.25 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 50 ng/L de MT donde puede observarse: **A)** Necrosis y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x); **B)** Pérdida de estructura de los cistos; Ec alterados y congestión (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatoцитos; Et: espermátidas; rombo: Ec alterados; cuadrado: pérdida de estructura de los cistos; N: necrosis; C: congestión.

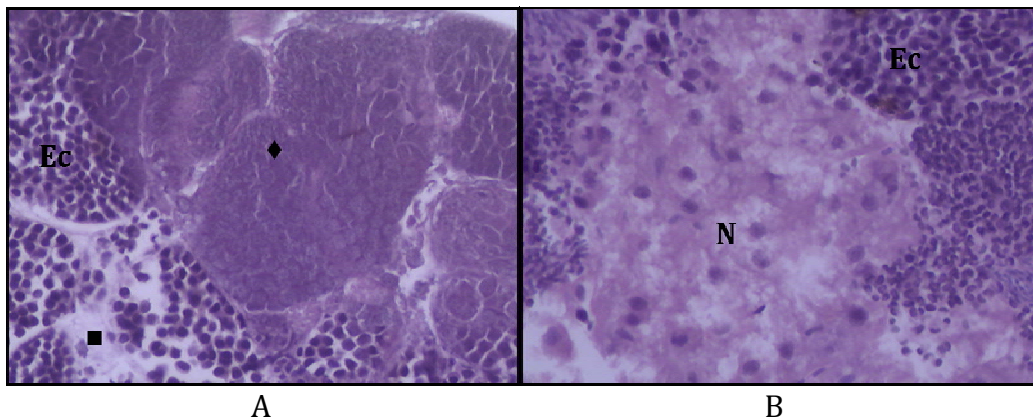


Figura 3.26 Corte histológico de testículo de peces expuestos a la concentración de 100 ng/L de MT donde puede observarse: **A)** Alteración severa en Eg y Ec; pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x); **B)** Necrosis y pérdida de estructura de los cistos (magnificación 40x). Referencias: Ec indica espermatoцитos; rombo: Ec alterados; cuadrado: pérdida de estructura de los cistos; N: necrosis.

3.6.4 DISCUSIÓN

Existe evidencia de la presencia de compuestos que imitan andrógenos en efluentes de papeleras, piscifactorías y sistemas de engorde a corral, y se han observado efectos adversos en peces que incluyen una disminución en el tamaño del testículo, características sexuales secundarias alteradas, disminución en la síntesis de T en machos, cambio en la proporción de sexos con incremento de los machos y alteraciones en el comportamiento (Larsson et al., 2000; Larsson & Förlin, 2002; Orlando et al., 2004; Toft et al., 2004; Orlando & Guillette, 2007). Además de los efectos masculinizantes de la MT, se ha observado que exposiciones a este compuesto provocaron diversas alteraciones tales como disminución del potencial reproductivo de *O. latipes* (Seki et al., 2004; Kang et al., 2008) y *P. promelas* (Ankley et al., 2001); intersexo en *D. labrax* (Blázquez et al., 2001), *D. rerio* (Andersen et al., 2001; Örn et al., 2003), *G. aculeatus* (Halhbeck, 2004), *O. latipes* (Seki et al., 2004) y *Gadus morhua* (Haugen et al., 2011); y producción de vitelogenina en los machos de *P. promelas* (Ankley et al., 2001; Zerulla et al., 2002; Hornung et al., 2004), las que estarían relacionadas con efectos estrogénicos.

En *J. multidentata* los índices somáticos no evidenciaron diferencias significativas entre los individuos expuestos a MT y los controles. Este resultado concuerda con lo informado en estudios previos (Seki et al., 2004; Andersen et al., 2006; Kang et al., 2008).

En cuanto a los efectos sobre la aromatasa, los resultados informados en la bibliografía parecieran estar relacionados con la sensibilidad de la especie y el momento en el cual el tóxico es aplicado. Se ha observado disminución en la actividad de la aromatasa cerebral en machos de *O. latipes* y *P. promelas* expuestos a un rango de concentraciones entre 20 a 250 $\mu\text{g/L}$ por un lapso de 10 días (Melo et al., 1999; Hornung et al., 2004), y en *Paralichthys olivaceus* expuestos a 10 $\mu\text{g/g}$ de alimento en el momento de la diferenciación sexual (Kitano et al., 2000). Sin embargo, otros autores informaron una regulación positiva de *cyp19a1b* en juveniles de *D. rerio* expuestos a 51 $\mu\text{g/L}$ de MT por 6 días (Trant et al., 2001) y 10 $\mu\text{g/L}$ en el momento de la diferenciación sexual (Fenske & Segner, 2004). En *J. multidentata*, las bajas concentraciones de MT utilizadas no provocaron alteraciones en la expresión de los genes *cyp19a1*, lo cual concuerda con lo informado por Andersen et al. (2003, 2006), donde al investigar el

efecto de este compuesto a concentraciones ambientalmente relevantes en *D. rerio*, no encontraron cambios en la actividad de la aromatasa cerebral ni en la expresión de los genes *cyp19a1a* y *cyp19a1b*. En concordancia, cuando se evaluaron los efectos de la MT sobre el comportamiento reproductivo de *J. multidentata* no se observaron alteraciones en el mismo (Roggio com. personal).

Luego de la exposición a MT, las alteraciones histológicas principales detectadas en testículos de *J. multidentata* se observaron a nivel de las Eg. Estas células evidenciaron procesos degenerativos y necrosis, resultado que concuerda con lo informado por otros autores (Yamazaki, 1972; Ankley et al., 2001). También se observó congestión en zonas próximas a áreas alteradas, lo que indicaría un proceso inflamatorio. En concordancia, Roggio et al. (2012) observaron mediante microscopía electrónica una gran cantidad de células inflamatorias en testículos de esta misma especie expuestos a las mismas concentraciones del tóxico que las utilizadas en esta tesis. Estos autores informaron además un incremento en el número y en la actividad secretoria de las células de Leydig, lo cual coincide con lo informado por otros autores (Borg et al., 1986; Hulak et al., 2008).



CAPÍTULO 4

Análisis de biomarcadores en machos de *Jenynsia multidentata* provenientes de sitios con diferente calidad de agua

4.1 INTRODUCCIÓN

Los recursos hídricos tienen un rol vital para la subsistencia de los seres humanos, no sólo porque constituyen la principal fuente de agua dulce, sino también porque históricamente han sido utilizados para diversos propósitos como la producción de energía, transporte y recreación. Las características fisicoquímicas y biológicas de los ríos dependen de varios factores como la localización, tipo de efluentes que recibe y el tamaño y actividades de la población humana asociada (Mohan & Hosetti, 1999). En la mayor parte del mundo las actividades antropogénicas han causado cambios múltiples y complejos en la composición química del agua. Los avances tecnológicos han sido acompañados por la producción de gran cantidad de compuestos químicos que ingresan en los cursos de agua a través de diversas fuentes como las industrias, efluentes urbanos y escorrentía de campos aledaños. Debido a que las acciones del hombre en las áreas urbanas incrementan el ingreso de nutrientes, metales, compuestos orgánicos, hormonas y otros contaminantes potenciales, los ríos que atraviesan ciudades normalmente presentan una mayor y más variable concentración de contaminantes comparados con ríos de montaña (Pasquini et al., 2012).

La cuenca del Río Suquía se localiza en la región semi-árida de la provincia de Córdoba (Argentina), y está formada por los ríos Icho Cruz-San Antonio, Yuspe-Cosquín; y los arroyos Las Mojarras y Los Chorrillos, que confluyen en el lago San Roque. El Río Suquía nace en ese mismo lago y corre principalmente de oeste a este atravesando la ciudad de Córdoba, localizada a 35 km aguas abajo, hasta desembocar en la laguna Mar Chiquita ubicada a 150 km de distancia. Como se mencionara previamente, este río representa la principal fuente de agua potable de la ciudad y tiene importancia también para actividades recreativas. En los últimos años esta cuenca ha sido intensamente

estudiada y los índices de calidad de agua revelan, lamentablemente, que el recurso se deteriora con el paso del tiempo, principalmente en sitios ubicados después de la descarga de la planta de tratamiento de efluentes de Bajo Grande (PTE) (Bistoni et al., 1999; Pesce & Wunderlin, 2000; Wunderlin et al., 2001; Amé et al., 2003; Contardo-Jara et al., 2009; Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011, Guyón et al., 2012b; Hued et al., 2012). Esto se debe, en gran medida, a vertidos de líquidos cloacales de la Ciudad de Córdoba y volcamientos industriales y clandestinos con escaso o nulo tratamiento previo (Comisión Municipal Honoraria, 1998; Cossavella et al., 2007). Por otra parte, recibe agroquímicos arrojados por vía aérea o terrestre que son utilizados para la fertilización o control de plagas de cultivos aledaños. Este problema se ha magnificado durante los últimos años como consecuencia del gran aumento poblacional y de la expansión de la frontera agrícola (Monferrán et al., 2011; Hoyos et al., 2012). Entre los pesticidas hallados en el río pueden mencionarse la atrazina, endosulfán-sulfato, acetoclor, clorpirifos y cipermetrina. Estos dos últimos compuestos han sido detectados en concentraciones que superan los límites para la protección de la biota establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (Bonansea et al., 2013a) y todos ellos poseen actividad como EDC (Singh & Singh, 2008; Li et al., 2009; Hayes et al., 2011; Da Cuña et al., 2013; Juberg et al., 2013). De este modo, la contaminación responsable de la degradación ambiental no sólo incluye la descarga de efluentes sino también desechos industriales y pesticidas. Estudios recientes han informado la presencia en el río de fármacos y de hormonas naturales y sintéticas tales como estrógeno, estrona, testosterona, androstenediona, metiltestosterona y dihidrotestosterona (Valdés et al., 2012). También se ha detectado en Río Primero la presencia de metales y algunos de ellos como cobre, plomo y cromo se encuentran en concentraciones que exceden los niveles permitidos para la protección de la biota acuática establecidos por la Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Maggioni et al., 2012).

Debido a la contaminación antrópica mencionada previamente en la cuenca del Río Suquía, se propone evaluar el impacto que la misma ejerce sobre la expresión de la aromatasas. Para ello, se realizó una caracterización anual de los niveles de expresión de los genes *cyp19a1* en individuos machos de *J. multidentata* provenientes de un sitio quasi prístino y otro marcadamente alterado. Se evaluó también la respuesta de los índices somáticos y la histología de las gónadas en ambos sitios de muestreo.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Área de estudio

La cuenca del Río Suquía es un sistema endorreico que fluye de oeste a este en concordancia con el gradiente altitudinal a través de la región semiárida de la provincia de Córdoba, donde el promedio anual de lluvias oscila entre los 700 a 900 mm. La estación húmeda abarca los meses de Noviembre a Abril, registrándose la mayoría de las precipitaciones en los meses de Enero y Febrero (Vázquez et al., 1979). El sistema hidrológico de este río comprende tres áreas de drenaje: a) la cuenca alta, en un área montañosa con cabeceras de cuencas y ríos torrentosos que fluyen hacia el lago San Roque, b) la cuenca media, con áreas de drenaje que pertenecen a la ladera este de las Sierras Chicas, junto con el área de drenaje de la ciudad de Córdoba, y c) la cuenca baja, desde la ciudad de Córdoba hasta la laguna Mar Chiquita, donde el río exhibe meandros y un flujo escaso.

4.2.2 Sitios de estudio

Los sitios fueron seleccionados de acuerdo a estudios previos de calidad de agua y ensambles de peces (Pesce & Wunderlin, 2000; Hued & Bistoni, 2005) (Fig. 4.1). El sitio control, en el Río Yuspe ($31^{\circ} 14' 18''$; $64^{\circ} 31' 14''$), se encuentra ubicado a 70 km de la ciudad de Córdoba y es un afluente del río Cosquín, el cual desemboca en el lago San Roque (Fig. 4.2A). El sitio con elevado impacto antropogénico se encuentra ubicado en la localidad Río Primero ($31^{\circ} 20' 17''$; $63^{\circ} 36' 35''$), a 70 km aguas abajo de la PTE de Bajo Grande (Fig. 4.2B). Cabe destacar que no fue posible seleccionar un sitio de estudio más próximo a la PTE debido a que en muestreos previos no se encontraron peces en estos lugares.

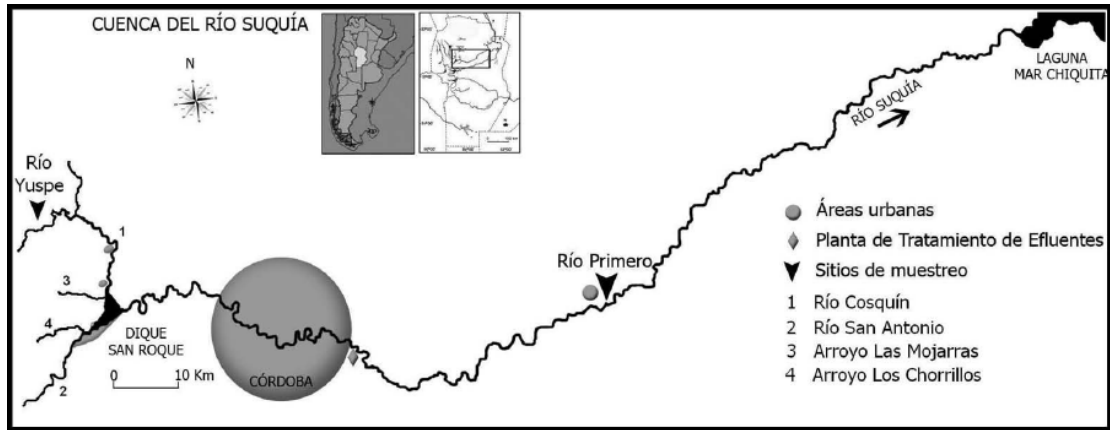


Figura 4.1 Mapa de los sitios de estudio seleccionados.



A



B

Figura 4.2 Imágenes de los sitios de estudio **A)** Río Yuspe, **B)** Río Primero.

4.2.3 Parámetros de calidad de agua

Con frecuencia bimensual se colectaron muestras de agua de cada sitio y se determinaron los parámetros de calidad de agua para establecer las condiciones ambientales del área de muestreo. Se monitorearon *in situ* el oxígeno disuelto, conductividad, pH y temperatura, mientras que las muestras de agua fueron analizadas posteriormente en el laboratorio para calcular la demanda biológica de oxígeno a los 5 días (DBO-5), nitrógeno de amonio, nitrógeno de nitrito, nitrógeno de nitrato, fósforo de ortofosfato, cloruros, sulfatos, dureza, calcio, magnesio, sólidos totales y coliformes totales. Las determinaciones se realizaron de acuerdo a APHA (2005) y AOAC (1995). Estos parámetros fisicoquímicos fueron integrados en un Índice de Calidad de Agua (ICA, Pesce & Wunderlin, 2000). La construcción del ICA requiere la normalización de cada parámetro en una escala de 0-100, y asigna factores de peso diferentes según la importancia del parámetro como indicador de la calidad del agua. El ICA proporciona un número adimensional que puede ser asociado con un porcentaje de calidad, y varía de 0 a 100 desde la menor a una óptima calidad de agua. Valores de ICA menores a 50 se considera que dificultan seriamente la vida acuática (Hued et al., 2010).

4.2.4 Recolección y procesamiento de las muestras

Los muestreos se realizaron mensualmente durante el año 2010. Los peces fueron capturados utilizando un equipo de pesca eléctrico, y transportados al laboratorio con agua obtenida de cada sitio en bidones de 20 L. Cuando fue posible se capturaron 15 ejemplares en cada sitio de muestreo. Se registró la longitud estándar y el peso de cada pez. Los ejemplares fueron sacrificados por inmersión en sobredosis de triclaína metanolsulfonato (MS222 500 mg/L) e inmediatamente se extrajo el cerebro y las gónadas, que fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados en RNA $later$ (QIAGEN) a -80 °C. Se evaluó mediante TR-PCR en tiempo real la expresión de los genes *cyp19a1* utilizando el método de la curva estándar. Se utilizó como gen de referencia el gen de la β -actina.

Los índices somáticos fueron calculados tal como se detalla en el capítulo 3. De cada sitio de muestreo se recolectaron las gónadas de tres individuos por mes, las cuales fueron fijadas en formaldehído al 10%, procesadas según técnicas histológicas de rutina y teñidas con H&E. Los cortes fueron examinados con microscopio óptico para evaluar posibles alteraciones en la organización tisular.

4.2.5 Análisis estadístico

Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el Infostat Software Package (Infostat, 2002). La distribución normal de los datos se analizó mediante el test de Shapiro Willks, y se utilizó el test de Levene para probar la homogeneidad de varianzas.

Con el objetivo de detectar diferencias significativas entre sitios, entre meses y observar si el patrón de respuesta es el mismo al comparar entre los sitios a lo largo de los meses, se realizó un análisis de la varianza a dos factores con las variables transformadas a rangos. Diferencias significativas por sitios o mes se evaluaron mediante un análisis no paramétrico (Kruskal Wallis) seguido por el test a posteriori de Dunn. La significancia fue aceptada para valores de $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Parámetros de calidad de agua

En la tabla 4.1 se expresan los parámetros físico-químicos medidos en el agua. Como puede observarse, la calidad de la misma se vio fuertemente alterada aguas abajo de la PTE. El oxígeno disuelto disminuyó significativamente en Río Primero y parámetros como la conductividad, los sólidos totales, dureza, calcio, magnesio, cloruro y sulfato sufrieron un gran incremento respecto al sitio de referencia en todos los meses de muestreo. Sin embargo, la concentración de nitrógeno inorgánico total (nitritos, nitratos y amonio) y las bacterias coliformes totales fueron los parámetros más alterados, siendo los principales responsables de la mala calidad del agua.

Parámetros	Enero		Marzo		Mayo		Agosto		Octubre	
	Río Yuspe	Río Primero	Río Yuspe	Río Primero	Río Yuspe	Río Primero	Río Yuspe	Río Primero	Río Yuspe	Río Primero
Nitrógeno-amonio	0,39±0,54 ^a	5,00±0,22 ^b	1,65±0,67 ^a	1,52±0,52 ^a	0,18±0,03 ^a	1,31±0,22 ^b	0,087±0,003 ^a	11,69±0,99 ^b	0,87±0,64 ^a	0,86±0,32 ^a
Demanda Biológica de Oxígeno luego de 5 días (DBO-5)	1,35±0,07 ^a	4,50±0,14 ^b	0,30±0,14 ^a	4,11±0,14 ^b	1,00±0,14 ^a	1,58±0,01 ^b	1,35±0,01 ^a	1,22±0,01 ^b	4,71±0,14 ^a	0,33±0,01 ^b
Cloruro	3,91±0,02 ^a	89,33±0,69 ^b	3,91±0,03 ^a	77,61±0,69 ^b	3,91±0,01 ^a	80,54±0,69 ^b	3,91±0,04 ^a	112,76±0,69 ^b	3,91±0,02 ^a	79,08±1,38 ^b
Conductividad [$\mu\text{S cm}^{-1}$]*	72,00±1,41 ^a	980,00±7,07 ^b	49,00±1,41 ^a	978,00±2,83 ^b	82,00±1,41 ^a	967,00±1,56 ^b	148,00±1,71 ^a	1351,00±1,72 ^b	131,01±2,83 ^a	1335,00±1,78 ^b
Oxígeno Disuelto*	10,95±0,07 ^a	7,56±0,03 ^b	10,17±0,03 ^a	7,36±0,01 ^b	10,70±0,14 ^a	6,88±0,01 ^b	10,03±0,01 ^a	4,84±0,01 ^b	9,02±0,03 ^a	5,57±0,03 ^b
Nitrógeno-nitrato	0,88±0,09 ^a	31,07±2,20 ^b	0,25±0,03 ^a	7,24±2,45 ^b	0,51±0,12 ^a	9,11±1,47 ^b	0,30±0,01 ^a	2,65±1,48 ^b	0,36±0,08 ^a	7,50±0,06 ^b
Nitrógeno-nitrito	0,09±0,04E-8 ^a	0,28±0,01 ^b	0,09±0,01 ^a	0,18±0,09E-2 ^b	0,01±0,01E-8 ^a	1,75±0,02 ^b	0,011±0,003 ^a	0,79±0,04 ^b	0,076±0,001 ^a	0,177±0,002 ^b
Fósforo-ortofosfato	<LD	0,74±0,16	<LD	0,28±0,04	<LD	0,25±0,03	<LD	1,37±0,02	<LD	0,07±0,04
pH*	8,75±0,35 ^a	8,22±0,03 ^a	7,92±0,03 ^a	8,58±0,02 ^b	8,15±0,03 ^a	7,44±0,01 ^b	8,94±0,03 ^a	7,53±0,01 ^b	8,80±0,14 ^a	7,85±0,14 ^b
Sólidos Totales	76,40±0,14 ^a	1008,40±0,14 ^b	56,80±0,28 ^a	701,60±0,28 ^b	40,00±1,41 ^a	400,00±1,41 ^b	96,40±0,14 ^a	891,60±0,14 ^b	58,40±0,28 ^a	676,00±2,83 ^b
Sulfato	0,29±0,33 ^a	132,90±1,61 ^b	0,37±0,03 ^a	132,27±0,89 ^b	0,35±0,06 ^a	67,14±8,02 ^b	0,25±0,04 ^a	121,99±1,34 ^b	0,35±0,06 ^a	67,14±8,02 ^b
Temperatura* [°C]	30,50±0,28 ^a	24,40±0,24 ^b	16,71±0,49 ^a	22,60±0,57 ^b	12,30±0,28 ^a	11,70±0,49 ^a	18,20±0,57 ^a	15,00±0,57 ^b	18,01±0,35 ^a	17,30±0,42 ^a
Coliformes Totales	1,50E+04±7,07 ^a	8,80E+05±7,07 ^b	2,00E+02±2,83 ^a	1,20E+05±2,83 ^b	5,00E+02±1,41 ^a	2,40E+05±1,41 ^b	2,20E+03±1,41 ^a	1,50E+05±1,41 ^b	5,00E+02±2,83 ^a	5,00E+03±2,83 ^b
Dureza	29,33±7,32 ^a	337,53±15,45 ^b	20,70±0,07 ^a	317,41±6,51 ^b	28,75±1,63 ^a	281,75±4,88 ^b	57,5±3,3 ^a	292,68±0,81 ^b	50,6±0,1 ^a	289,23±0,81 ^b
Calcio	7,14±1,63 ^a	98,41±6,84 ^b	6,45±1,30 ^a	92,18±3,42 ^b	8,76±0,65 ^a	88,96±0,65 ^b	14,75±3,63 ^a	100,02±1,96 ^b	8,30±1,30 ^a	87,81±0,33 ^b
Magnesio	2,79±2,77 ^a	22,36±7,90 ^b	1,12±0,79 ^a	21,24±1,58 ^b	1,68±0,79 ^a	14,53±1,58 ^b	5,03±0,79 ^a	10,48±0,99 ^b	7,27±0,79 ^a	17,05±0,88 ^b

Tabla 4.1 Parámetros de calidad de agua del Río Yuspe y Río Primero. Los valores se expresan en mg L⁻¹ si no se indica directamente, las coliformes totales corresponden a valores exponenciales E+3 (ej. 2.3=2300), y se expresan como NMP 100 mL (número más probable por 100 mL). Límite de detección (LD) para fósforo de ortofosfato = 0,01 mg/L.* Medición *in situ* durante el biomonitorio.

La Fig. 4.3 muestra el resultado al integrar los parámetros físico-químicos en el ICA. Como puede observarse, en el sitio de referencia (Río Yuspe) los valores de ICA variaron entre 74 y 88,7 durante los meses de muestreo. Por el contrario, los valores obtenidos en Río Primero oscilaron entre 51,7 a 62,7, evidenciando un gran deterioro del recurso.

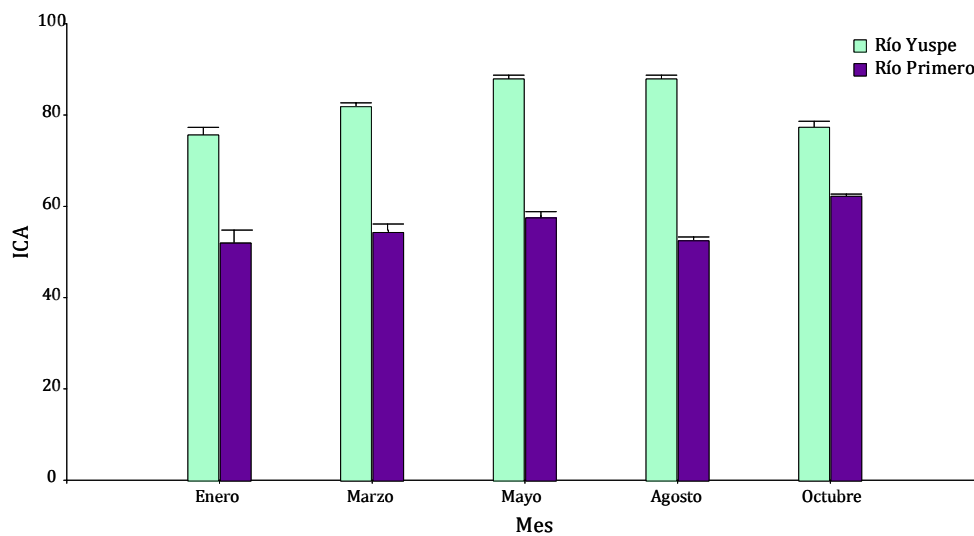


Figura 4.3 Índice de Calidad de Agua medido en el Río Yuspe y Río Primero durante el año 2010.

4.3.2 Biomarcadores

4.3.2.1 Índices somáticos

En la Fig. 4.4 puede observarse la variación en el FC a lo largo de un año en los dos sitios de muestreo. No se observaron diferencias significativas al comparar entre sitios en el período completo de estudio ($F= 0,27$; $p= 0,607$), siendo el valor del Río Yuspe 1,84 y el de Río Primero 1,83. Por el contrario, se presentaron diferencias entre meses a lo largo del año al considerar los dos sitios en conjunto ($F= 5,73$; $p<0,001$) indicando cambios en la relación entre el peso y talla de los organismos a lo largo del año. No se observó interacción entre meses y sitios ($F= 0,50$; $p= 0,901$), lo que indica que los patrones de cambio para este índice son similares en ambos sitios.

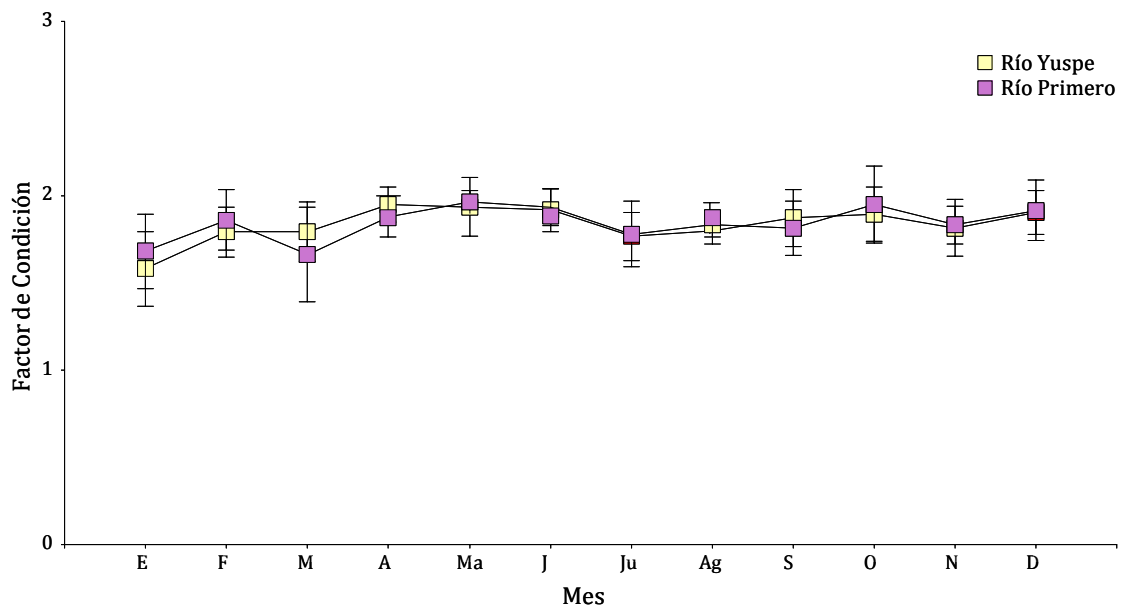


Figura 4.4 Factor de Condición medido durante un ciclo anual en dos sitios con diferente calidad de agua.

En cuanto al IGS, se observaron diferencias entre sitios de muestreo ($F= 19,31$; $p<0,001$), siendo significativamente mayor el valor en el Río Yuspe (5,06) con respecto a Río Primero (4,42). Se presentaron también diferencias entre meses a lo largo del año al considerar los dos sitios en conjunto ($F= 31,28$; $p<0,001$). En ambos sitios se identificaron dos períodos con un aumento en el IGS durante la época reproductiva de esta especie (de septiembre a abril) (Fig. 4.5); sin embargo se observó interacción entre meses y sitios ($F=5,01$; $p<0,001$), indicando que el patrón de variación entre los sitios es diferente a lo largo del año. En el Río Yuspe el incremento en el IGS se observó a partir del mes de julio con el pico máximo en octubre y luego otro incremento en el mes de marzo con pico máximo en abril; mientras que en Río Primero, el incremento en el IGS se observó desde el mes de agosto con pico máximo en noviembre y otro incremento en el mes de mayo. Se registraron diferencias significativas en los meses de marzo, abril, julio y septiembre entre ambos sitios.

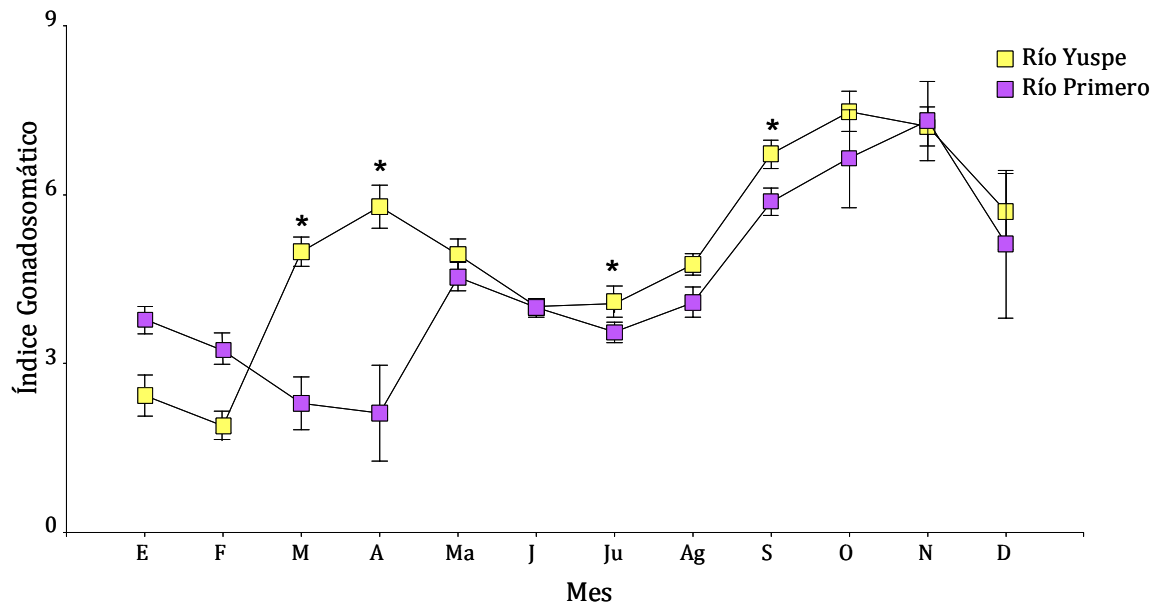


Figura 4.5 Índice Gonadosomático medido durante un ciclo anual en dos sitios con diferente calidad de agua. Diferencias significativas entre sitios de muestreo se indican con asterisco.

El análisis del IHS reveló diferencias significativas entre ambos sitios de muestreo en el período completo de estudio ($F= 76,31$; $p<0,001$), encontrándose los niveles más elevados en Río Primero (Río Yuspe 1,48; Río Primero 2,04) (Fig. 4.6). Se presentaron diferencias significativas entre meses al considerar los dos sitios en conjunto ($F= 6,86$; $p<0,001$) y se observó interacción entre meses y sitios ($F= 3.40$; $p<0.001$), indicando diferencias en los patrones de cambios entre sitios a lo largo del año. Las diferencias entre los dos sitios fueron significativas para la mayoría de los meses estudiados.

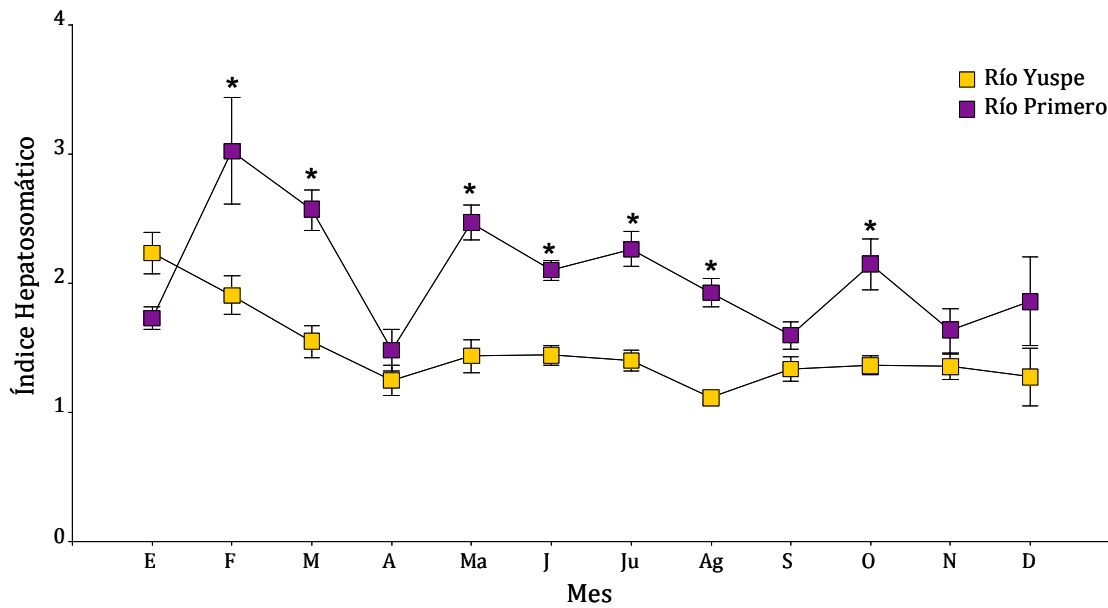


Figura 4.6 Índice Hepatosomático medido durante un ciclo anual en dos sitios con diferente calidad de agua. Diferencias significativas entre sitios de muestreo se indican con asterisco.

4.3.2.2 Expresión de los genes *cyp19a1*

Como puede observarse en la Fig. 4.7, se encontró una variación importante en la expresión de *cyp19a1b* en el cerebro de los machos a lo largo del año en ambos sitios de muestreo. Al comparar los valores medios anuales de la abundancia del gen entre ambos sitios no se observaron diferencias significativas ($F= 3,11$; $p=0,0801$), siendo este valor 1,41 en el Río Yuspe y 1,21 en Río Primero. Se presentaron diferencias significativas entre meses a lo largo del año al considerar los dos sitios en conjunto ($F= 20,29$; $p<0,001$). En el sitio de referencia se observó un incremento en la abundancia de transcripto al comienzo de la época reproductiva, en el mes de agosto, y otro incremento en el mes de enero. Si bien durante la época no reproductiva la expresión del gen fue menor, se observó un pico de expresión en el mes de junio. Este patrón de variación anual fue significativamente diferente en Río Primero ($F= 5,18$; $p<0,001$); en donde puede observarse un desfase en el incremento de la aromatasa cerebral, el cual comienza con un mes de retraso respecto al sitio de referencia (en el mes de septiembre). Al igual que en el Río Yuspe, se observó un incremento en la abundancia de transcripto en el mes de enero y un pico de expresión en el mes de junio. Al comparar

mes a mes, la abundancia de transcripto fue significativamente inferior en el sitio contaminado en los meses de mayo, agosto y septiembre.

En cuanto a la expresión de *cyp19a1a*, se observaron diferencias significativas entre sitios al considerar todo el período estudiado ($F= 5,89$; $p=0,017$), siendo 1,37 el valor del Río Yuspe y 1,65 el de Río Primero. Sin embargo, al comparar mes a mes no se observaron diferencias significativas entre sitios de estudio. Se presentaron diferencias entre meses a lo largo del año ($F= 2,28$; $p= 0,016$); y no se observó interacción entre meses y sitios ($F= 0,63$; $p<0,786$), indicando que el patrón de cambio anual es similar en ambos sitios (Fig. 4.8).

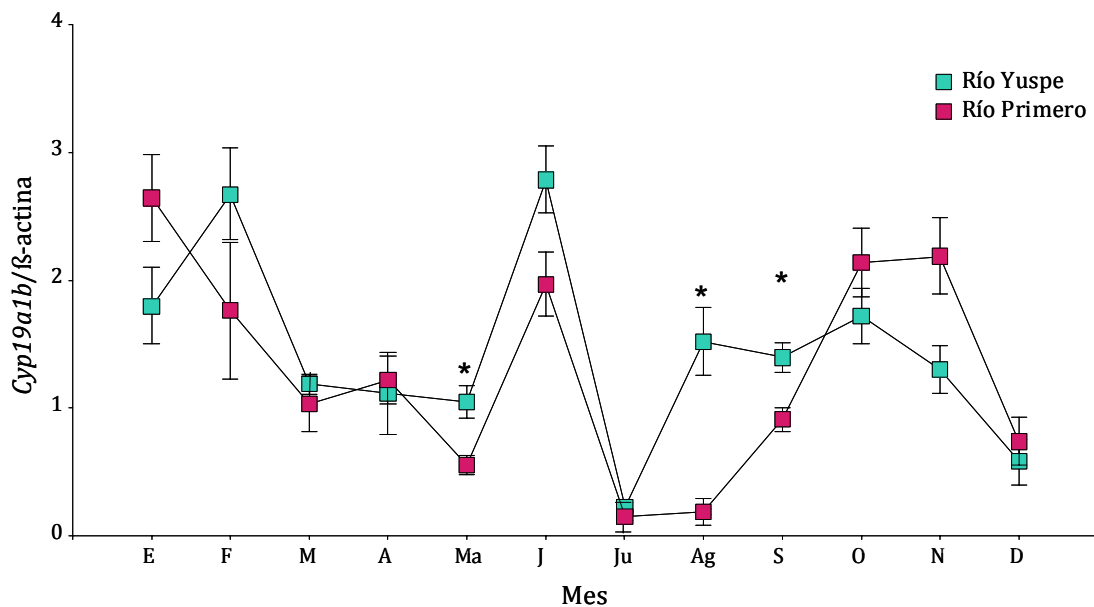


Figura 4.7 Niveles de expresión de *cyp19a1b* relativos a la β -actina en cerebros de machos colectados en dos sitios con diferente calidad de agua durante un ciclo anual. Diferencias significativas entre sitios de muestreo se indican con asterisco.

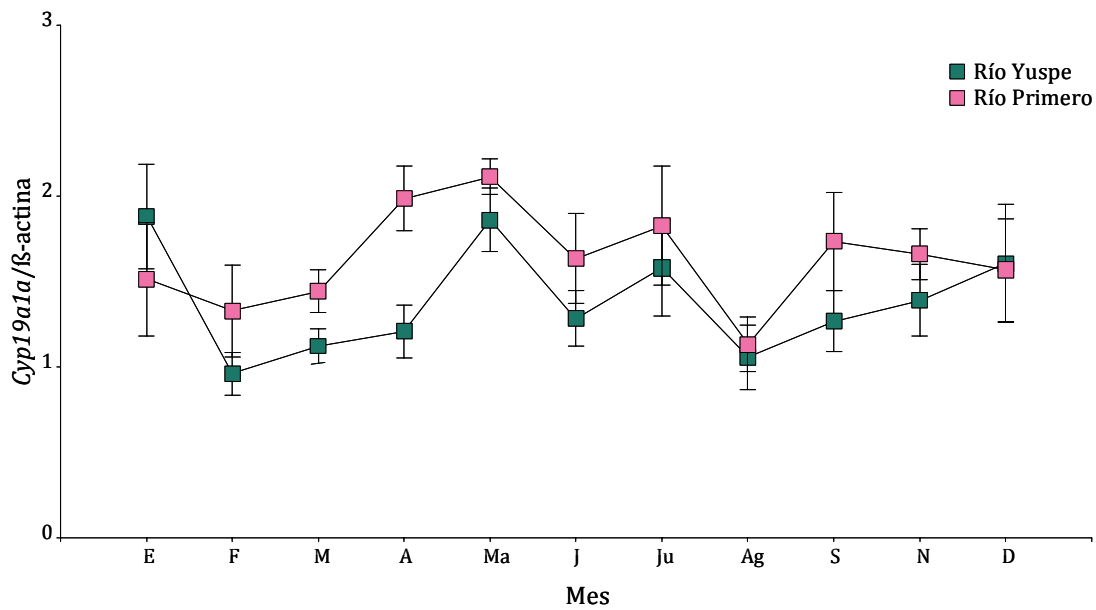


Figura 4.8 Niveles de expresión de *cyp19a1a* relativos a la β -actina en gónadas de machos colectados en dos sitios con diferente calidad de agua durante un ciclo anual. Nótese que se ha omitido del análisis el mes de octubre debido a que no se obtuvieron muestras de aromatasa gonadal en Río Primero.

4.3.2.3 Análisis histológico

El análisis histológico de las gónadas reveló que para el Río Yuspe (Fig. 4.9) los estadios espermatogénicos tardíos (Et y Ez) representaron el mayor porcentaje a lo largo de todo el año, con valores que superaron siempre el 70%, con un promedio anual de 83%. En Río Primero, el mayor porcentaje de estadios espermatogénicos también estuvo representado por los estadios tardíos a lo largo de todo el año; sin embargo se encontraron valores cercanos al 50% con un promedio anual de 71%. Esta diferencia entre ambos sitios fue estadísticamente significativa durante la estación reproductiva (en los meses de octubre a abril), donde en algunos casos los valores hallados en Río Primero fueron la mitad que los encontrados en el Río Yuspe (Tabla 4.2).

Sitio	Estación	Espermáticas y Espermatozoides (%)
Río Yuspe	Reproductiva	85,13 ± 3,4 (a)
	No reproductiva	83,21 ± 3,5 (a)
Río Primero	Reproductiva	59,18 ± 7,6 (b)
	No reproductiva	85,35 ± 2,3 (a)

Tabla 4.2 Porcentaje de espermáticas y espermatozoides en peces colectados en el Río Yuspe y Río Primero durante un año. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cuatro condiciones ($p < 0,001$).

Entre los principales daños a nivel tisular que fueron detectados en Río Primero pueden citarse alteraciones en las Eg y Ec, presencia de células vacuolares, formación de acúmulos celulares, desorganización de la estructura del testículo (mezcla de cistos en diferentes estadios celulares), desincronización en el proceso de espermatogénesis (observándose Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo, y mezcla de células en diferente estadio dentro de un cisto), pérdida de estructura de los cistos, congestión y necrosis (Fig. 4.10). Cabe destacar que estas alteraciones histológicas fueron detectadas también en el Río Yuspe, pero su frecuencia de aparición fue significativamente inferior (Fig. 4.11). En ambos sitios estas alteraciones estuvieron concentradas principalmente durante la época no reproductiva.

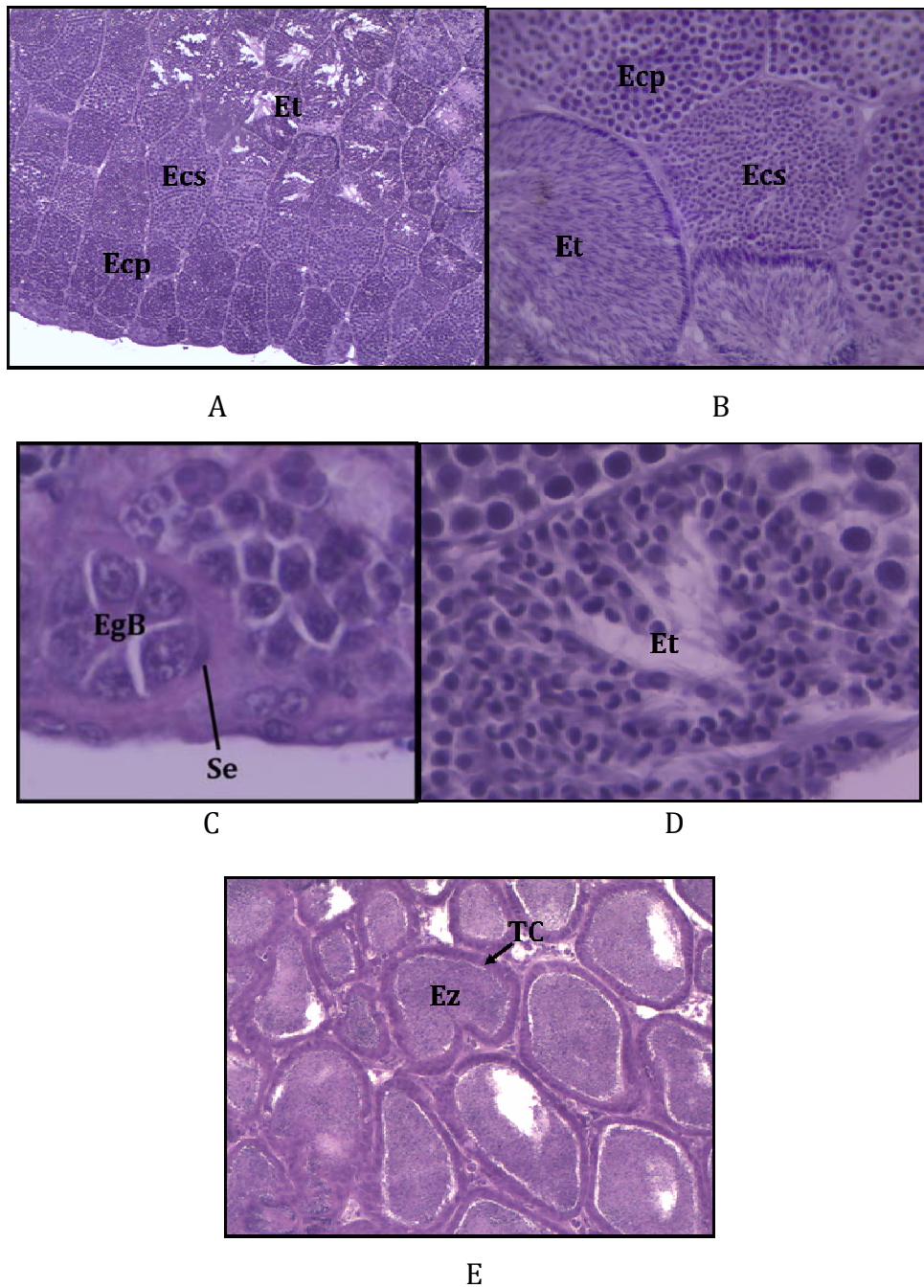


Figura 4.9 Corte histológico de testículo normal de machos de *J. multidentata* colectados en el Río Yuspe donde puede observarse: **A)** estructura general del testículo (magnificación 4x); **B)** cistos de Ecp, Ecs y Et con estructura definida (magnificación 40x); **C)** grupo de EgB rodeadas por una célula de Sertoli (magnificación 100x); **D)** arriñonamiento de los núcleos en las Et (magnificación 100x); **E)** Túbulos colectores con espermatozoides. Referencias: Ecp indica espermatoцитos primarios; Ecs: espermatoцитos secundarios; Et: espermátidas; Ez: espermatozoides; Se: célula de Sertoli; EgB: grupo de espermatogonias B; TC: túbulo colector.

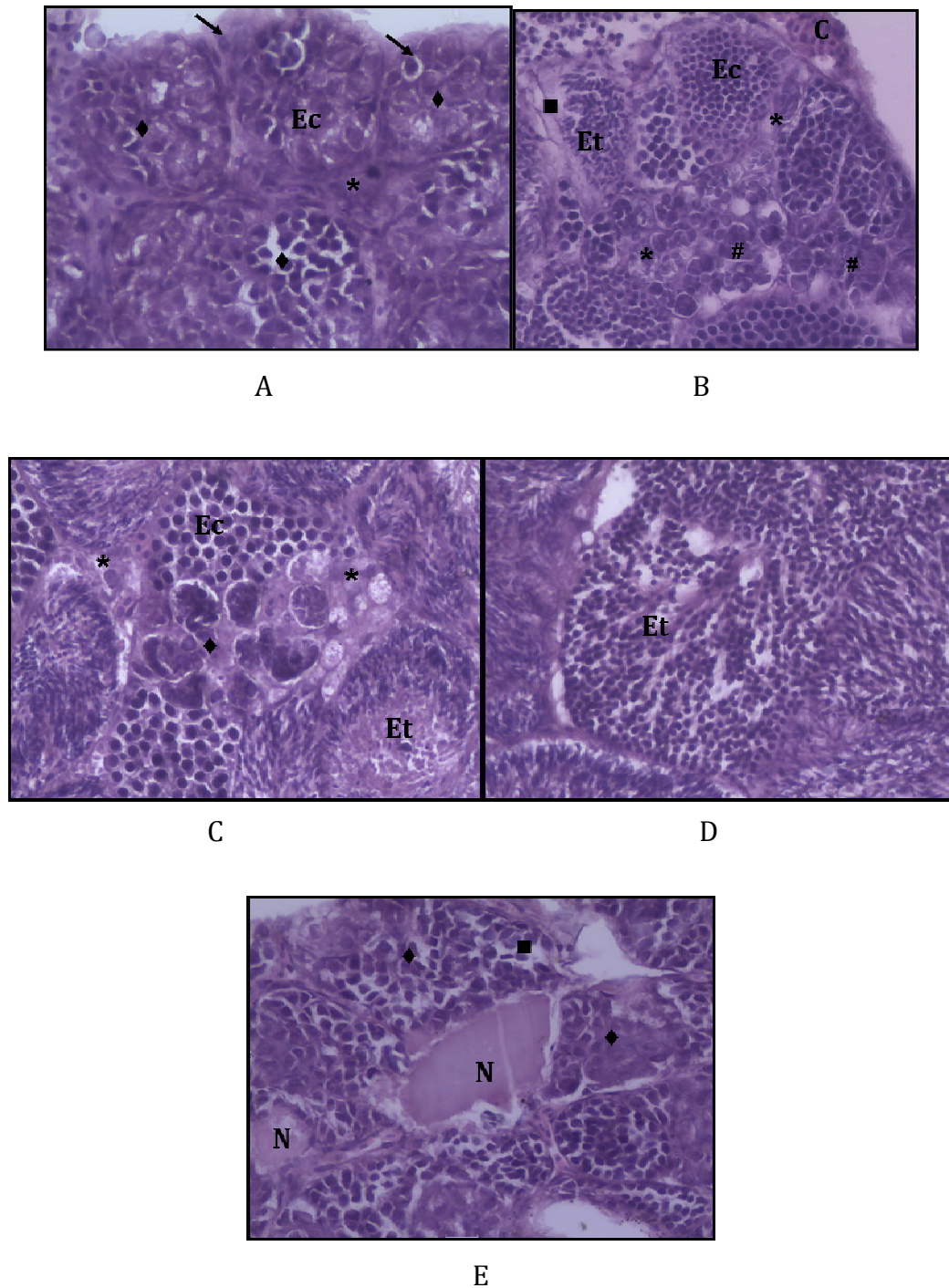


Figura 4.10 Corte histológico de testículo de *J. multidentata* colectados en Río Primero donde puede observarse: **A)** Eg y Ec con características anormales y células vacuolares (magnificación 40x); **B)** células vacuolares, pérdida de estructura de los cistos, acúmulos celulares y congestión (magnificación 40x); **C)** desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos de diferentes estadios espermatogénicos), cistos de Ec alterados y células vacuolares (magnificación 40x); **D)** Et con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo (magnificación 40x); **E)** cistos de Ec alterados, pérdida de estructura del cisto y necrosis. Referencias: Ec indica espermatocitos; Et: espermátidas; flecha: Eg con características anormales; rombo: Ec alterados; asterisco: células vacuolares; cuadrado: pérdida de estructura de los cistos; numeral: acúmulos celulares; C: congestión; N: necrosis.

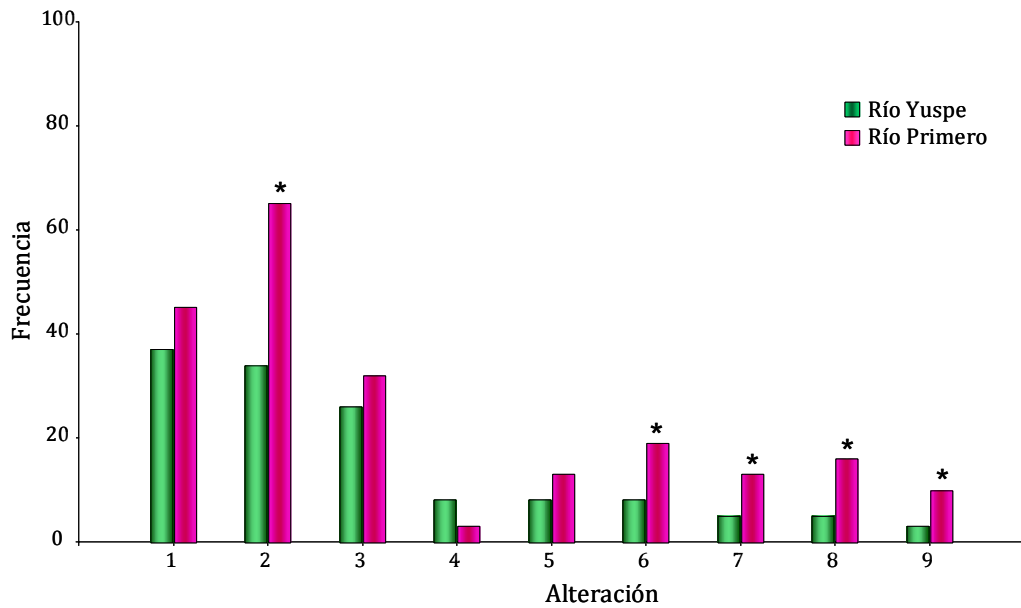


Figura 4.11 Frecuencia de aparición de las principales alteraciones histológicas en testículos de *J. multidentata* provenientes de dos sitios con diferente calidad de agua. Referencias: 1) Presencia de células vacuolares; 2) Alteraciones en las espermatogonias; 3) Alteraciones en los espermatocitos; 4) Desincronización en el proceso de espermatogénesis (mezcla de células en diferente estadio dentro de un cisto); 5) Pérdida de estructura de los cistos; 6) Desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en diferentes estadios celulares); 7) Espermátidas con formación del aparato flagelar sin el consiguiente arriñonamiento del núcleo; 8) Congestión; 9) Necrosis. Diferencias significativas entre sitios se indican con asterisco.

4.4 DISCUSIÓN

En la actualidad es ampliamente aceptado que las actividades humanas afectan no sólo los procesos físicos, químicos y biológicos de los cursos de agua, sino que afectan también la biota residente y las poblaciones humanas asociadas. El Río Suquía no es una excepción, al igual que la mayoría de los ríos que atraviesan grandes ciudades, recibe contaminantes de composición compleja de diversas fuentes (Wunderlin et al., 2001; Nimptsch et al., 2005; Contardo-Jara et al., 2009; Monferrán et al., 2011; Pasquini et al., 2012). Este río es particularmente vulnerable a la contaminación debido a su flujo escaso y marcadas variaciones estacionales, a su corta longitud y a que es una cuenca endorreica (Wunderlin et al., 2001; Contardo-Jara et al., 2009), lo cual implica la acumulación de xenobióticos en la cuenca (Gaiero et al., 1997). Estudios previos han informado un deterioro importante en la calidad del agua del Río Suquía, el cual estuvo directamente relacionado tanto con las descargas de efluentes pobremente tratados de la PTE de Bajo Grande, la principal fuente de contaminación, como con escorrentía urbana, agroquímicos y desechos industriales (Bistoni et al., 1999; Pesce & Wunderlin, 2000; Wunderlin et al., 2001; Contardo-Jara et al., 2009; Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Maggioni et al., 2012; Pasquini et al., 2012). Los valores de ICA registrados en este estudio para el Río Yuspe variaron entre 74 y 88,7 durante los meses de muestreo, indicando una buena calidad de agua; por el contrario los valores obtenidos en Río Primero (de 51,7 a 62,7) evidencian un gran deterioro del recurso y ponen de manifiesto el riesgo al cual se hallan continuamente expuestos los organismos, ya que se encuentran próximos a los valores de ICA que dificultan la vida acuática (Hued et al., 2010). Estos valores son aún más bajos que los informados en la bibliografía, evidenciando el deterioro progresivo de este sistema acuático con el paso de los años. El oxígeno disuelto es un factor clave para la vida acuática y determina la distribución de la biota. Sólo unas pocas especies de peces pueden tolerar niveles de oxígeno disuelto tan bajos como los registrados en Río Primero, donde las concentraciones fueron significativamente inferiores comparadas con el sitio de referencia. Especies como *J. multidentata*, pueden tolerar estas bajas concentraciones debido a que presentan adaptaciones morfológicas para respirar en la superficie del agua tales como la boca desplazada hacia arriba. Además, su distribución en la columna de agua se restringe a

los primeros centímetros, donde las concentraciones de oxígeno disuelto son mayores (Bistoni et al., 1999). Aún con estas adaptaciones, la obtención del número de ejemplares de *J. multidentata* necesarios para la medición de los biomarcadores implicó un mayor esfuerzo de muestreo en Río Primero respecto al Río Yuspe. Si bien en ambos sitios se registró la presencia de bacterias coliformes totales, el alto contenido observado aguas abajo de la PTE indica la falta de un tratamiento adecuado de los efluentes. Cabe destacar que en el año en el cual se realizaron los muestreos la PTE se encontraba fuera de funcionamiento debido a reformas de infraestructura, motivo por el cual los efluentes eran vertidos al lecho del río sin tratamiento previo. Esto se ve reflejado en la disminución drástica del oxígeno disuelto, el incremento en la cantidad de bacterias coliformes totales y en la elevada concentración de especies nitrogenadas (nitratos, nitritos y amonio) que fueron observados en este sitio durante todo el año. Estos parámetros fueron los principales responsables de la mala calidad del agua y están asociados con contaminación proveniente del efluente cloacal (Wunderlin et al., 2001), indicando el impacto negativo de la PTE de Bajo Grande en la calidad del agua del río. Por otra parte, parámetros como la conductividad, sólidos totales, dureza, calcio, magnesio, cloruro y sulfato mostraron un incremento significativo respecto al sitio de referencia en todos los meses analizados. Se ha observado que estos parámetros aumentan cuando los ríos reciben aportes provenientes de escorrentía urbana una vez que atraviesan ciudades (Wunderlin et al., 2001), así como desechos industriales y agrícolas (Pasquini et al., 2012).

Numerosos estudios han informado desórdenes reproductivos y disrupción endocrina en peces silvestres expuestos a poluentes ambientales. Se han detectado, por ejemplo, alteraciones de la actividad de la aromatasa en peces que habitan sitios contaminados. Orlando et al. (2002) señalaron que la actividad de la aromatasa cerebral fue mayor en las hembras de *Gambusia affinis* que viven en aguas abajo de papeleras, que en aquellas de sitios de referencia. Greytak et al. (2005) reportaron mayores niveles de *cyp19a1b* en cerebros de *F. heteroclitus* provenientes de sitios altamente poluidos por PCBs y metales pesados entre otros contaminantes, que en sitios no contaminados. Por el contrario, Noaksson et al. (2003) encontraron niveles inferiores de actividad de la aromatasa cerebral en hembras de *Perca fluviatilis* provenientes de un lago contaminado por escorrentía de un vertedero de residuos y Hinfrey et al. (2010) detectaron inhibición de esta misma variante en machos de *Leuciscus cephalus*

obtenidos de un río contaminado por efluentes de PTE de Francia. En *J. multidentata*, la expresión de la aromatasa cerebral mostró fluctuaciones siendo más elevada durante la estación reproductiva. Este resultado coincide con lo hallado en otras especies como *D. labrax* (González & Piferrer, 2003), *C. auratus* (Gelinas et al., 1998), *A. schlegelii* (Lee et al., 2000), *I. punctatus* (Kazeto et al., 2003) y *R. rutilus* (Geraudie et al., 2011), sugiriendo su implicancia en el control del ciclo reproductivo. Si bien es llamativo el valor elevado de expresión de *cyp19a1b* observado en el mes de junio en ambos sitios, otros autores han detectado un pico similar en la estación no reproductiva de *D. labrax* y postularon una posible conexión con la reorganización de los tejidos gonadales que ocurre luego de la estación reproductiva (González & Piferrer, 2003). Por otra parte, los niveles de aromatasa cerebral comienzan a aumentar un mes después en el sitio contaminado con respecto al sitio control, lo cual podría estar relacionado con un desfase en el comienzo del ciclo reproductivo debido a la contaminación. Este desfase también se pone de manifiesto en las variaciones que experimenta el IGS, donde el tamaño de los testículos se incrementa con un mes de retraso en el sitio contaminado. Un resultado similar fue obtenido por Bianco (2011) al analizar el desarrollo de ovarios de hembras de *J. multidentata* en el mismo año y sitios de muestreo. Este autor determinó que el ciclo reproductivo de las hembras presenta dos cohortes, coincidente con lo hallado para los machos en el presente estudio, y observó que el aumento en el IGS en Río Primero ocurre un mes después que en el sitio control. Encontró, además, que la presencia de embriones en el lumen ovárico en el sitio contaminado también se observa con un mes de retraso respecto al sitio de referencia. La gran cantidad de compuestos químicos que se hallan en los ambientes contaminados y que pueden producir disrupción endocrina y alteraciones reproductivas (Van der Kraak et al., 1998; Kime & Nash, 1999; Jobling et al., 2002a, 2002b), posiblemente puedan actuar modificando el comienzo y duración del ciclo reproductivo.

Existe una importante cantidad de evidencia que sustenta la hipótesis de que muchas de las alteraciones observadas en peces machos colectados en sitios que reciben efluentes de PTE están asociadas a la presencia de sustancias estrogénicas. Entre las principales alteraciones detectadas puede mencionarse la inducción de vitelogenina (Rodgers-Gray et al., 2000; Jobling et al., 2002a; Tilton et al., 2002; Diniz et al., 2005; Barber et al., 2007; Vajda et al., 2011; Wen et al., 2013), alteraciones histológicas gonadales (Jobling et al., 2002a; Lavado et al., 2004; Diniz et al., 2005),

presencia de intersexo (Jobling et al., 1998, 2002b; Diniz et al., 2005) y demasculinización de características sexuales (Vajda et al., 2011; Hued et al., 2012). En cuanto a la influencia sobre los niveles de aromatasa cerebral, Geraudie et al. (2011) encontraron niveles elevados en un sitio caracterizado por una contaminación compleja pero que recibe la descarga directa de efluentes no tratados, sugiriendo la presencia de sustancias estrogénicas. De acuerdo a ello, y considerando la presencia de compuestos estrogénicos que han sido detectados aguas abajo de la PTE de Bajo Grande (como estradiol y estrona), esperábamos encontrar un aumento en la expresión de la aromatasa cerebral en los peces colectados en Río Primero, como respuesta a la exposición a xenoestrógenos. Sin embargo, los niveles de *cyp19a1b* presentaron diferencias significativas sólo en algunos meses, siendo menor en el sitio más contaminado. Este sitio se encuentra ubicado a 70 km de la descarga de efluentes de la PTE, y estudios de parámetros biológicos en la biota del Río Suquía revelaron que la magnitud de las respuestas disminuía al aumentar la distancia a la PTE (Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Guyón et al., 2012b, Maggioni et al., 2012). Informes previos de calidad de agua han descripto que en la localidad de Río Primero el río muestra una tendencia a la recuperación en los valores del ICA aproximándose a los sitios de referencia (Merlo et al., 2011; Monferrán et al., 2011; Guyón et al., 2012b; Maggioni et al., 2012), probablemente debido a un efecto de dilución de los contaminantes. Esta “mejoría” en la calidad del agua podría ser una explicación para la ausencia de un efecto estrogénico en la expresión de la aromatasa cerebral, ya que la concentración de los contaminantes puede no ser lo suficientemente elevada para provocar una respuesta. Por otra parte, se ha detectado en Río Primero la presencia de contaminantes de diversa naturaleza, tales como andrógenos, metales y pesticidas. En estudios realizados en laboratorio, se ha observado que el pesticida clorpirifos y su mezcla comercial con cipermetrina (ambos compuestos detectados en el Río Suquía en concentraciones que superan los límites internacionales de calidad de agua para pesticidas) inhiben la expresión de *cyp19a1b* en *J. multidentata* (Bonansea et al., 2013b). Además, en un estudio realizado en hembras de *J. multidentata*, se observó inhibición en la expresión de aromatasa cerebral en sitios próximos a la descarga de efluentes de la PTE de Bajo Grande, en tanto que en Río Primero los valores fueron similares a los del sitio de referencia (Guyón et al., 2012b). De este modo, los peces se encuentran

expuestos a una mezcla de compuestos cuyo efecto individual sobre el organismo puede ser potenciado o antagonizando por la presencia de otro compuesto.

Los efectos de la exposición a efluentes de PTE sobre la aromatasa gonadal informados en la bibliografía no son concluyentes. Por ejemplo, Lavado et al. (2004) detectaron menor actividad en machos de *Cyprinus carpio* colectados aguas abajo de la descarga de efluentes de una PTE, mientras que Douxils et al. (2007) no encontraron diferencias en esta variante en machos de *Gobio gobio* y *Barbatula barbatula* colectados antes y después de una PTE. Los niveles de expresión de *cyp19a1a* en *J. multidentata* fueron significativamente más elevados en el sitio contaminado respecto al sitio de referencia. Considerando que en condiciones de laboratorio la aromatasa gonadal de esta especie no evidenció respuesta ante compuestos estrogénicos, este resultado sugiere la presencia en el río de contaminantes capaces de ejercer efectos sobre esta variable.

Valores anormales de los índices órgano-somáticos (tanto en el IHS como el IGS) pueden ser asociados con la exposición a contaminantes capaces de modificar el peso del hígado y las gónadas como consecuencia de un aumento de actividad de las enzimas metabólicas o de la interferencia con la regulación hormonal de los órganos reproductivos (Sloof et al., 1983; Kime, 1998). En el presente estudio se observaron valores de IHS significativamente superiores en el sitio contaminado en la mayoría de los meses estudiados, en concordancia con lo observado en otras especies ante la exposición a efluentes de PTE (Lye et al., 1997; Angus et al., 2002; Barber et al., 2007; Vajda et al., 2011). Este incremento en el peso del hígado puede ser una respuesta no específica a los tóxicos, inducida por un aumento en la demanda de actividad de las enzimas. En concordancia, Maggioni et al. (2012) detectaron niveles aumentados de enzimas antioxidantes en hígados de hembras de *J. multidentata* colectados en el mismo sitio de estudio. Estos autores informaron además daños histológicos en este órgano tales como hipertrofia, degeneración hidrópica, necrosis y fibrosis, los cuales han sido asociados con exposiciones a pesticidas y aguas residuales (Uguz et al., 2003; Bernet et al., 2004; Ballesteros et al., 2007; Hued et al., 2012), confirmando las principales fuentes de contaminantes que afectan la calidad del agua del Río Suquía. Por otra parte, se ha observado en cultivos celulares de hepatocitos de mamíferos que la hipoxia y la acidosis asociada estimula la acumulación de sodio en las células del hígado provocando un aumento en su tamaño (Carini et al., 1999). Edwards et al. (2006) detectaron una

relación inversa entre las concentraciones de oxígeno disuelto y el peso del hígado en hembras de *Gambusia holbrooki*. De este modo, además de los contaminantes, las bajas concentraciones de oxígeno detectadas en Río Primero podrían afectar el peso de este órgano. Con respecto al índice gonadal (IGS), en el presente estudio se observaron valores inferiores en peces provenientes del sitio contaminado respecto al de referencia, si bien las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo en algunos meses. Este resultado concuerda con lo informado para varias especies de peces tales como *C. carpio* (Lavado et al., 2004), *Carassius carassius* (Diniz et al., 2005), *O. latipes* (Ma et al., 2005), *L. cephalus* (Hinfray et al., 2010) y *P. promelas* (Vajda et al., 2011) en donde se ha observado una disminución en este índice en peces machos expuestos a efluentes de PTE. En general no se han observado alteraciones en el FC en peces provenientes de sitios contaminados (Rodgers-Gray et al., 2000; Noaksson et al., 2003; Toft et al., 2003; Aravindakshan et al., 2004; Orlando & Guillette, 2007; Hinfray et al., 2010), lo cual coincide con lo hallado en este estudio en *J. multidentata*.

El efecto de la exposición a contaminantes ambientales se evidenció en la histología de las gónadas. Si bien en el sitio de referencia se encontraron alteraciones similares a las observadas en el sitio contaminado, la frecuencia y extensión de las mismas fue siempre mucho menor que las detectadas en éste. Las lesiones más comunes registradas en Río Primero incluyeron la desorganización del tejido testicular, alteraciones severas en las Eg y Ec, presencia de células vacuolares, formación de acúmulos celulares y necrosis. Estas alteraciones fueron corroboradas al observar las gónadas utilizando microscopía electrónica (Roggio, com pers). Alteraciones similares fueron detectadas en machos de *C. carpio* (Lavado et al., 2004) y *C. carassius* (Diniz et al., 2005) colectados aguas abajo de una PTE. La presencia de Et y Ez a lo largo de todo el año en ambos sitios se debe a que *J. multidentata* presenta espermatogénesis continua (Martínez & Monasterio de Gonzo, 2002). Sin embargo, durante la estación reproductiva se detectó una cantidad significativamente inferior de estos tipos celulares en el sitio contaminado. Aún cuando en este trabajo no se realizaron análisis de conteo de esperma, se ha encontrado una disminución en la proporción de peces capaces de liberar esperma y un menor volumen de esperma en peces colectados en sitios que reciben efluentes de PTE (Jobling et al., 2002a; Vajda et al., 2011). Si esto estuviera ocurriendo en *J. multidentata* podría representar severas consecuencias para la fertilidad y la reproducción de la especie. A pesar de las alteraciones detectadas en los

machos de esta especie, la población mantiene la capacidad de reproducirse en este sitio aún en condiciones adversas. Diversos autores han informado que poblaciones silvestres que habitan sitios altamente contaminados continúan sobreviviendo y reproduciéndose en el lugar (Orlando et al., 2002; Greytak et al., 2005; Martinovic et al., 2007). Es posible que los cambios fisiológicos que experimentan los animales a medida que su ambiente se modifica permitan una cierta estabilidad de la población a lo largo del tiempo (Crews et al., 2000). Posiblemente, las condiciones ambientales del Río Suquía hayan permitido una cierta adaptación de *J. multidentata* al medio lo cual determina su estabilidad en el lugar, considerando que este río presenta niveles elevados de contaminación desde hace más de 15 años (Bistoni et al., 1999).



CAPÍTULO 5

Consideraciones Finales

CONSIDERACIONES FINALES

- Los índices somáticos (tanto el FC, IHS e IGS) no mostraron marcados cambios frente a la exposición a compuestos estrogénicos en condiciones de laboratorio. Si bien estos índices se utilizan como un complemento para evaluar la salud general de los peces, pueden ser afectados por una gran cantidad de factores tales como el estado nutricional, la estación del año, la edad, condición reproductiva, entre otros. Sólo el IGS mostró una reducción en el tamaño de los testículos de peces expuestos a EE₂, acorde a lo descrito para otras especies (Jobling et al., 1996; Schultz et al., 2003; Velasco-Santamaría et al., 2010), posiblemente debido a la potencia estrogénica de este compuesto.

Al analizar la respuesta de los índices somáticos a campo, el IGS mostró fluctuaciones durante la época reproductiva evidenciando dos períodos reproductivos en ambos sitios de muestreo, en concordancia con lo que ha sido observado en hembras de la misma especie (Bianco, 2011). Al comparar los dos sitios de muestreo, se observa que el índice se incrementa con un mes de retraso en el sitio contaminado respecto al de referencia, lo cual podría estar relacionado con desfases en el ciclo reproductivo. El IHS fue significativamente mayor en el sitio contaminado, lo cual concuerda con lo observado en otras especies ante la exposición a efluentes de PTE (Lye et al., 1997; Barber et al., 2007; Vajda et al., 2011). Este aumento en el peso del hígado puede deberse a hiperplasia (aumento en el número de células) o hipertrofia (aumento en el tamaño de las células) como una respuesta adaptativa para aumentar la capacidad del hígado para detoxificar compuestos extraños vía el sistema de oxidasa de función múltiple (Addison, 1984; Heath, 1987). El FC, por el contrario, no mostró diferencias entre ambos sitios.

- Las secuencias parciales de ADNc de los genes *cyp19a1* de la especie *J. multidentata* mostraron una segregación en dos ramas diferentes del árbol filogenético, uno que incluye las formas cerebrales y otros las gonadales de aromatasa. *Cyp19a1a* presentó mayor similitud con la variante gonadal de *Fundulus heteroclitus* (92%), y *cyp19a1b* compartió el 90% y 88% de homología con la variante de cerebro de *Poecilia reticulata* y *F. heteroclitus*, respectivamente (ambos Cyprinodontiformes). El porcentaje de identidad de ambas secuencias fue del 62%.

La aromatasa cerebral respondió como un biomarcador sensible en condiciones de laboratorio frente a la exposición a químicos que presentan actividad estrogénica (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol y 4*n*-nonilfenol). Esta respuesta se hizo evidente incluso ante la concentración más baja de estos compuestos. Es importante destacar que la variabilidad de los datos para este gen aumentó en los peces expuestos, probablemente involucrando respuestas diferenciales a los químicos entre individuos. Por el contrario, la exposición a 17 α -metiltestosterona no provocó alteraciones en la expresión de *cyp19a1b*. La falta de cambios de este biomarcador puede deberse a que las bajas concentraciones analizadas en este estudio no ejercieron efecto estrogénico sobre esta variable. En general, las concentraciones utilizadas por otros autores en donde se destacan dichos efectos son más elevadas (en el rango de los $\mu\text{g/L}$). En investigaciones realizadas con concentraciones en el rango de ng/L no se observaron cambios significativos sobre la expresión de este gen (Andersen et al., 2003, 2006). Por otra parte, ninguno de los compuestos analizados causó efectos en la expresión de *cyp19a1a* en testículos, lo cual es acorde con lo explicitado en la bibliografía sobre la falta de EREs en la secuencia promotora de este gen en diversas especies estudiadas. Esta clara diferencia entre la sensibilidad de expresión de la aromatasa cerebral y la gonadal es indicativa de que el fenómeno de disrupción endocrina está ocurriendo a nivel cerebral. Considerando el concepto más abarcativo de disrupción neuroendocrina desarrollado por Waye & Trudeau (2011), los compuestos analizados podrían estar afectando circuitos neuroendocrinos que controlan diversos procesos

fisiológicos importantes tanto para el desarrollo como para la reproducción de los organismos.

A campo, la expresión de la aromatasa cerebral evidenció fluctuaciones a lo largo del año, siendo máxima durante la estación reproductiva en ambos sitios de estudio. Este resultado concuerda con lo publicado para otras especies (Gelinas et al., 1998; Lee et al., 2000; Gonzalez & Piferrer, 2003; Kazeto et al., 2003; Geraudie et al., 2011), sugiriendo su implicancia en el control del ciclo reproductivo. Al realizar una comparación entre sitios se observó un desfase en el incremento de la expresión del gen, el cual comienza con un mes de retraso en el sitio contaminado respecto al de referencia. Si bien esperábamos encontrar en Río Primero un aumento en la expresión de la aromatasa cerebral debido a la presencia de hormonas estrogénicas en el agua, es posible que esta respuesta no se observe debido al efecto de dilución de los contaminantes considerando la distancia de este sitio a la PTE. También es importante considerar que la variedad de compuestos presentes en el río (hormonas, fármacos, metales pesados, pesticidas) pueden representar una mezcla compleja de sustancias que antagonicen o neutralicen el efecto estrogénico que ha sido detectado en sitios próximos a descargas de efluentes de PTE en otras especies (Geraudie et al., 2011).

Los niveles de expresión de la aromatasa gonadal fueron significativamente más elevados en el sitio contaminado respecto al sitio de referencia, evidenciando la presencia en el río de contaminantes capaces de ejercer efectos sobre esta variable.

- El análisis histológico de los testículos reveló un gran impacto de la exposición a 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, $4n$ -nonilfenol y 17α -metiltestosterona en condiciones de laboratorio. Frente a todos los tóxicos los peces expuestos evidenciaron alteraciones que estaban ausentes en los controles, y la extensión y frecuencia de las mismas aumentó ante incrementos en la concentración del compuesto. Estos cambios abarcaron todos los estadios celulares afectando el proceso espermatogénico, observándose efectos adversos a nivel de mitosis, meiosis y diferenciación celular. Se registraron además alteraciones en la estructura del testículo y daños irreversibles como necrosis. Sin embargo, la

respuesta de este biomarcador es inespecífica, y las alteraciones detectadas en *J. multidentata* han sido descritas como alteraciones que ocurren en machos luego de la exposición a diversos compuestos (Christiansen et al., 1998; Gimeno et al., 1998b; Lange et al., 2001; Weber et al., 2002, 2003; Pawlowski et al., 2004; Velasco-Santamaría et al., 2010). Estas alteraciones han sido corroboradas mediante el uso de microscopía electrónica (Roggio et al., 2012).

La histología de los testículos a campo también se vio afectada por la exposición a contaminantes ambientales. Si bien en el sitio de referencia (Río Yuspe) se encontraron alteraciones, la frecuencia y magnitud de las mismas fue significativamente menor que las detectadas en el sitio contaminado (Río Primero). Aún cuando los daños observados en este órgano podrían representar severas consecuencias en la fertilidad de los machos, la especie conserva la capacidad de reproducirse en este lugar. Es posible que las condiciones ambientales de Río Primero hayan permitido una cierta adaptación de *J. multidentata* al medio por lo cual la especie sobrevive en este sitio, al igual que lo observado por otros autores en situaciones similares (Orlando et al., 2002; Greytak et al., 2005; Martinovic et al., 2007). Sin embargo, en este estudio se observó a nivel histológico una disminución significativa en el porcentaje de espermatidas y espermatozoides durante la época reproductiva en el sitio contaminado, lo cual podría traducirse en efectos adversos para la reproducción de la especie. Es importante destacar que el esfuerzo realizado para la captura de los ejemplares en este sitio fue notoriamente superior que en el Río Yuspe, lo que indica una abundancia menor de esta especie a la altura de la localidad de Río Primero.

- Los resultados obtenidos en esta tesis resaltan la necesidad de utilizar una batería de biomarcadores cuando se quiere evaluar el efecto de compuestos estrogénicos y tóxicos en general. La expresión de aromatasa cerebral resulta un buen biomarcador en condiciones de laboratorio si se quiere comprobar el efecto estrogénico de un tóxico. A campo la situación es más compleja dada la mezcla de compuestos que existen en los ambientes contaminados, donde pueden observarse efectos sinérgicos o antagónicos entre ellos.

- Las concentraciones de tóxicos utilizadas en los ensayos de exposición (y que provocaron efectos adversos tanto a nivel molecular como histológico) se encuentran dentro del rango detectado en aguas superficiales de Argentina, demostrando que los peces están expuestos a estos niveles de contaminantes en el ambiente. Los beneficios que proporcionan muchos de los compuestos que poseen actividad como EDCs en la industria, la agricultura y la medicina aseguran que seguirán siendo utilizados y por lo tanto, si no se llevan a cabo medidas de control, continuarán representando una amenaza para los organismos. Emerge como desafío el desarrollo e implementación de tecnologías y compuestos alternativos que protejan la salud de los ecosistemas, incluyendo a los seres humanos, de los efectos deletéreos de los EDCs.



CAPÍTULO 6

Bibliografía

A

- Ackermann, G.E.; Schwaiger, J.; Negele, R.D.; Fent, K. 2002. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol* 60: 203-221.
- Addison, R. 1984. Hepatic mixed function oxidase (MFO) induction in fish as a possible biological monitoring system. In Cairns, V.W.; Hodgson, P.V.; Nriagu, J.O. (eds.). *Confaminant effects on Fisheries*, Wiley, Toronto, pp 51-60.
- Aguayo, S.; Muñoz, M.J.; de la Torre, A.; Roset, J.; de la Pena, E.; Carballo, M. 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci Total Environ* 328: 69-81.
- Ahel, M.; McEvoy, J.; Giger, W. 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ Pollut* 79: 243-248.
- Ahel, M.; Giger, W.; Koch, M. 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment *Water Res* 28: 1131-1142.
- Al-Ansari, A.M.; Saleem, A.; Kimpe, L.E.; Sherry, J.P.; McMaster, M.E.; Trudeau, V.L.; Blais, J.M. 2010. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17alpha-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environ Pollut* 158: 2566-2571.
- Amé, M.V.; del Pilar Díaz, M.; Wunderlin, D.A. 2003. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): a field and chemometric study. *Environ Toxicol* 18: 192-201.
- Amé, M.V.; Baroni, M.V.; Galanti, L.N.; Bocco, J.L.; Wunderlin, D.A. 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenyntia multidentata*. *Chemosphere* 74: 1179-1186.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF). 2005. In: Eaton, A. D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.H. (eds.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Baltimore, Maryland, 21th ed.

- Andersen, L.; Petersen, G.I.; Gessbo, A.; Örn, S.; Holbech, H.; Bjerregaard, P.; Norrgren, L. 2001. Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus rutilus*: two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals? *Aquat Ecosyst Health Manage* 4: 275-282.
- Andersen, L.; Holbech, H.; Gessbo, A.; Norrgren, L.; Petersen, G.I. 2003. Effects of exposure to 17alpha-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134: 365-374.
- Andersen, L.; Goto-Kazeto, R.; Trant, J.M.; Nash, J.P.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P. 2006. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 76: 343-352.
- Anderson, R.O.; Newman, R.M. 1996. Length, weight and associated structural indices. In: Murphy, B.R.; Willis, D.W. (eds.). Fisheries techniques. American Fisheries Society Bethesda, Maryland, pp 447-482.
- Angus, R.A.; Weaver, S.A.; Grizzle, J.M.; Watson, R.D. 2002. Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis*) inhabiting a small southeastern U.S. river receiving treated domestic sewage effluent. *Environ Toxicol Chem* 21: 1404-1409.
- Ankley, G.T.; Jensen, K.M.; Kahl, M.D.; Korte, J.J.; Makynen, E.A. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20: 1276-1290.
- Anstead, G.M.; Carlson, K.E.; Katzenellenbogen, J.A. 1997. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62: 268-303.
- Aravindakshan, J.; Paquet, V.; Gregory, M.; Dufresne, J.; Fournier, M.; Marcogliese, D.J.; Cyr, D.G. 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol Sci* 78: 156-165.
- Arslan, T.; Phelps, R.P. 2004. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion *Aquaculture* 234: 561-573.
- Arukwe, A.; Goksøyr, A. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia* 83: 225-241.
- Association Official Analytical Chemists [AOAC]. 1995. AOAC official methods of analysis, 16th ed. (March 1999 revision), AOAC International, Gaithersburg, MD.

B

- Baatrup, E.; Junge, M. 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ Health Perspect* 109: 1063-1070.
- Babay, P.A.; Romero Ale, E.E.; Itria, R.F.; Becquart, E.T.; Thiele, B.; Batistoni, D.A. 2008. Simplified determination of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates: method

- development and application in aqueous samples from Buenos Aires, Argentina. *J Environ Monit* 10: 443-452.
- Bakker, J.; Honda, S.; Harada, N.; Balthazart, J. 2002. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav* 42: 158-171.
- Balch, G.C.; Mackenzie, C.A.; Metcalfe, C.D. 2004. Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17alpha-ethinyloestradiol. *Environ Toxicol Chem* 23: 782-791.
- Balthazart, J.; Ball, G.F. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 21: 243-249.
- Ballesteros, M.L.; Bianchi, G.E.; Carranza, M.; Bistoni, M.A. 2007. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J Environ Sci Health B* 42: 351-357.
- Ballesteros, M.L.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2009a. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotox Environ Safe* 72: 199-205.
- Ballesteros, M.L.; Durando, P.E.; Nores, M.L.; Diaz, M.P.; Bistoni, M.A.; Wunderlin, D.A. 2009b. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ Pollut* 157: 1573-1580.
- Barber, L.B.; Lee, K.E.; Swackhamer, D.L.; Schoenfuss, H.L. 2007. Reproductive responses of male fathead minnows exposed to wastewater treatment plant effluent, effluent treated with XAD8 resin, and an environmentally relevant mixture of alkylphenol compounds. *Aquat Toxicol* 82: 36-46.
- Baronti, C.; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Samperi, R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ Sci Technol* 34: 5059-5066.
- Bayley, M.; Nielsen, J.R.; Baatrup, E. 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol Environ Saf* 43: 68-73.
- Bayley, M.; Junge, M.; Baatrup, E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquat Toxicol* 56: 227-239.
- Bell, A.M. 2001. Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Anim Behav* 62: 775-780.
- Bernet, D.; Schmidt-Posthaus, H.; Wahli, T.; Burkhardt-Holm, P. 2004. Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiologia* 524:53-66.
- Bertin, A.; Inostroza, P.A.; Quinones, R.A. 2011. Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. *Mar Pollut Bull* 62: 1530-1537.
- Bianco, R. 2011. Impacto de la contaminación antrópica sobre la histología del ovario y el ciclo reproductivo de las hembras de *Jenynsia multidentata* en la cuenca del Río Suquia,

- Córdoba, Argentina. Tesina de grado para optar al título de biólogo. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Pp 31.
- Billard, R. 1981. Effects of washing gametes on their fertilization in rainbow trout. *Rev Can Biol* 40: 317-321.
- Bistoni, M.A.; Hued, A.C.; Videla, M.; Sagretti, L. 1999. Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región central de Argentina. *Rev Chil Hist Nat* 72: 325-335.
- Bjerselius, R.; Lundstedt-Enkel, K.; Olsen, H.; Mayer, I.; Dimberg, K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17beta-estradiol. *Aquat Toxicol* 53: 139-152.
- Blackburn, M.A.; Waldock, M.J. 1995. Concentration of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res* 29: 1623-1629.
- Blankvoort, B.M.; Rodenburg, R.J.; Murk, A.J.; Koeman, J.H.; Schilt, R.; Aarts, J.M. 2005. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 263-272.
- Blázquez, M.; Piferrer, F.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Donaldson, E.M. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* 135: 329-342.
- Blázquez, M.; Bosma, P.T.; Fraser, E.J.; Van Look, K.J.; Trudeau, V.L. 1998. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119: 345-364.
- Blázquez, M.; Felip, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Piferrer, F. 2001. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *J Fish Biol* 58: 342-358.
- Blázquez, M.; Piferrer, F. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol Cell Endocrinol* 219: 83-94.
- Blázquez, M.; Gonzalez, A.; Papadaki, M.; Mylonas, C.; Piferrer, F. 2008. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 158: 95-101.
- Blázquez, M.; Somoza, G.M. 2010. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 166: 470-477.
- Bonanse, R.I.; Amé, M.V.; Wunderlin, D.A. 2010. Comparación de métodos para la determinación de nonilfenol en muestras ambientales. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Santa Fe, Argentina, pp 54.
- Bonanse, R.I.; Amé, M.V.; Wunderlin, D.A. 2013a. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90: 1860-1869.
- Bonanse, R.I.; Wunderlin, D.A.; Amé, M.V. 2013b. Optimization of pesticides analysis in water samples on the combination of solid phase extraction and solid phase microextraction

coupled to gas chromatography mass detection. 6th SETAC World Congress, SETAC Europe 22nd Annual Meeting. Berlin.

Borg, B.; Paulson, G.; Peute, J. 1986. Stimulatory effects of methyltestosterone on pituitary gonadotropic cells and testes leydig cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., in winter. *Gen Comp Endocrinol* 62: 54-61.

Borg, B.; Timmers, R.J.; Lambert, J.G. 1987. Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. *Exp Biol* 47: 63-68.

C

Callard, G.V.; Petro, Z.; Ryan, K.J. 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology* 103: 2283-2290.

Callard, G.V.; Drygas, M.; Gelinis, D. 1993. Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *J Steroid Biochem* 44: 541-547.

Callard, G.V.; Tchoudakova, A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61: 387-392.

Callard, G.V.; Tchoudakova, A.V.; Kishida, M.; Wood, E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem* 79: 305-314.

Cardinali, M.; Maradonna, F.; Olivotto, I.; Bortoluzzi, G.; Mosconi, G.; Polzonetti-Magni, A.M.; Carnevali, O. 2004. Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reprod Toxicol* 18: 597-604.

Cargouët, M.; Perdiz, D.; Mouatassim-Souali, A.; Tamisier-Karolak, S.; Levi, Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324: 55-66.

Carini, R.; Autelli, R.; Bellomo, G.; Albano, E. 1999. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 248: 280-293.

Cazenave, J.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A.; Amé, M.V.; Krause, E.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquat Toxicol* 75: 178-190.

Cazenave, J.; Nores, M.L.; Miceli, M.; Diaz, M.P.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res* 42: 1299-1307.

- Cirja, M.; Ivashechkin, P.; Schäffer, A.; Corvini, P.F.X. 2008. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Rev Environ Sci Biotechnol* 7: 61-78.
- Clotfelter, E.D.; Rodríguez, A.C. 2006. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environ Pollut* 144: 833-839.
- Colborn, T.; Myers, J.P.; Dubanowski, D. 1996. Our Stolen Future. New York: Penguin Books USA Inc, pp 306.
- Colman, J.R.; Baldwin, D.; Johnson, L.L.; Scholz, N.L. 2009. Effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 91: 346-354.
- Comisión Municipal Honoraria. 1998. Niveles de Emisión e Inmisión permitido para las aguas del Río Suquía. Municipalidad de Córdoba, Córdoba, pp 102.
- Condeca, J.B.; Canario, A.V. 1999. The effect of estrogen on the gonads and on in vitro conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17beta in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *Gen Comp Endocrinol* 116: 59-72.
- Conley, A.; Hinshelwood, M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction* 121: 685-695.
- Contardo-Jara, V.; Wiegand, C. 2008. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. *Environ Pollut* 155: 182-189.
- Contardo-Jara, V.; Galanti, L.N.; Amé, M.V.; Monferrán, M.V.; Wunderlin, D.A.; Wiegand, C. 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in watercourses of Cordoba, Argentina. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1871-1880.
- Contractor, R.G.; Foran, C.M.; Li, S.; Willett, K.L. 2004. Evidence of gender-and tissue-specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol-induced changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes. *J Toxicol Environ Health A* 67: 1-22.
- Cooper, R.L.; Kavlock, R.J. 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *J Endocrinol* 152: 159-166.
- Cosavella, A.; Zabala, S.O.; Hunziker, M.L.; Roque, M.; Negretti, C.; Andrada, H.; Pacetti, A.; Britos, R. 2007. Relevamiento y Control de vertido de efluentes industriales y domésticos. Primer Encuentro Interdisciplinario de Investigadores en Problemas Ambientales (EIDIPA), Instituto Superior de Estudios Ambientales (ISEA). Córdoba, Argentina, p19.
- Crews, D.; Willingham, E.; Skipper, J.K. 2000. Endocrine disruptors: present issues, future directions. *Q Rev Biol* 75: 243-260.
- Curtis, C.; Skaar, T. 2002. Ubiquitous and dangerous. *Our Planet*: 24-26.

Ch

- Chang, C.-F.; Lau, E.-L.; Lin, B.-Y. 1995. Stimulation of Spermatogenesis or of Sex Reversal According to the Dose of Exogenous Estradiol-17[beta] in Juvenile Males of Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Gen Comp Endocrinol* 100: 355-367.
- Chang, X.; Kobayashi, T.; Senthilkumaran, B.; Kobayashi-Kajura, H.; Sudhakumari, C.C.; Nagahama, Y. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 141: 101-115.
- Chang, H.; Wu, S.; Hu, J.; Asami, M.; Kunikane, S. 2008. Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1195: 44-51.
- Cheshenko, K.; Brion, F.; Le Page, Y.; Hinfrey, N.; Pakdel, F.; Kah, O.; Segner, H.; Eggen, R.I. 2007. Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 96: 255-267.
- Cheshenko, K.; Pakdel, F.; Segner, H.; Kah, O.; Eggen, R.I. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 155: 31-62.
- Chiang, E.F.; Yan, Y.L.; Tong, S.K.; Hsiao, P.H.; Guiguen, Y.; Postlethwait, J.; Chung, B.C. 2001. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J Exp Zool* 290: 709-714.
- Choi, J.Y.; Park, J.G.; Jeong, H.B.; Lee, Y.D.; Takemura, A.; Kim, S.J. 2005. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141: 49-59.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Christiansen, T.; Korsgaard, B.; Jespersen, A. 1998. Effects of nonylphenol and 17 beta-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *J Exp Biol* 201: 179-192.

D

- D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Mancini, R.; Mastropasqua, R.; Nazzari, M.; Samperi, R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ* 302: 199-209.
- Da Cuña, R.H.; Pandolfi, M.; Genovese, G.; Piazza, Y.; Ansaldo, M.; Lo Nostro, F.L. 2013. Endocrine disruptive potential of endosulfan on the reproductive axis of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol* 126: 299-305.

- Dachs, J.; Van Ry, D.A.; Eisenreich, S.J. 1999. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of lower Hudson River estuary. *Environ Sci Technol* 33: 2676-2679.
- Dalla Valle, L.; Lunardi, L.; Colombo, L.; Belvedere, P. 2002. European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 25-34.
- de Bournonville, C.; Dickens, M.J.; Ball, G.F.; Balthazart, J.; Cornil, C.A. 2012. Dynamic changes in brain aromatase activity following sexual interactions in males: where, when and why? *Psychoneuroendocrinology* 38: 789-799.
- Denslow, N.; Sepúlveda, M. 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. Babin, P.J.; et al. (eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer: pp 255-322.
- Desbrow, C.; Routledge, E.J.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Waldock, M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. Chemical Fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32: 1549-1558.
- Devlin, R.H.; Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Diniz, M.S.; Peres, I.; Magalhaes-Antoine, I.; Falla, J.; Pihan, J.C. 2005. Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 62: 427-435.
- Diotel, N.; Le Page, Y.; Mouriec, K.; Tong, S.K.; Pellegrini, E.; Vaillant, C.; Anglade, I.; Brion, F.; Pakdel, F.; Chung, B.C.; Kah, O. 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 31: 172-192.
- Douxflis, J.; Mandiki, R.; Silvestre, F.; Bertrand, A.; Leroy, D.; Thome, J.P.; Kestemont, P. 2007. Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? *Sci Total Environ* 372: 497-514.
- Doyle, C.J.; Lim, R.P. 2005. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17[beta]-estradiol. *Ecotox Environ Safe* 61: 392-397.

E

- Edwards, T.M.; Miller, H.D.; Guillette, L.J., Jr. 2006. Water quality influences reproduction in female mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from eight Florida springs. *Environ Health Perspect* 114 (1): 69-75.
- Eggen, R.I.; Segner, H. 2003. The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Anal Bioanal Chem* 377: 386-396.
- Ekstrom, P.; Johnsson, C.M.; Ohlin, L.M. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol* 436: 92-110.

El-Greisy, Z.A.; El-Gamal, A.E. 2012. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *Egypt J Aquat Res* 38: 59-66.

F

Fenske, M.; Segner, H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67: 105-126.

Force, A.; Lynch, M.; Pickett, F.B.; Amores, A.; Yan, Y.L.; Postlethwait, J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531-1545.

Forlano, P.M.; Deitcher, D.L.; Myers, D.A.; Bass, A.H. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21: 8943-8955.

Forlano, P.M.; Bass, A.H. 2005. Steroid regulation of brain aromatase expression in glia: female preoptic and vocal motor nuclei. *J Neurobiol* 65: 50-58.

Fox, G.A. 2001. Effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife in Canada: past, present, future. *Water Qual Res J Can* 36: 233-251.

Fukada, S.; Tanaka, M.; Matsuyama, M.; Kobayashi, D.; Nagahama, Y. 1996. Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol Reprod Dev* 45: 285-290.

Fulton, T. 1904. The rate of growth of fish. *Fish Board Scot Ann Report*. 1: 1-12.

G

Gaiero, D.M.; Ross, G.R.; Depetris, P.J.; Kempe, S. 1997. Spatial and temporal variability of total non-residual heavy metals content in stream sediments from the Suquía River System, Córdoba, Argentina. *Water Air Soil Pollut* 93: 303-319.

García-Reyero, N.; Lavelle, C.M.; Escalon, B.L.; Martinovic, D.; Kroll, K.J.; Sorensen, P.W.; Denslow, N.D. 2011. Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquat Toxicol* 101: 38-48.

García-Segura, L.M.; Veiga, S.; Sierra, A.; Melcangi, R.C.; Azcoitia, I. 2003. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71: 31-41.

Gelinas, D.; Pitoc, G.A.; Callard, G.V. 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol Cell Endocrinol* 138: 81-93.

- Geraudie, P.; Hinfray, N.; Gerbron, M.; Porcher, J.M.; Brion, F.; Minier, C. 2011. Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. *Aquat Toxicol* 105: 378-384.
- Giger, W.; Brunner, P.H.; Schaffner, C. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225: 623-625.
- Giger, W.; Molnar, E.; Ibric, S.; Ruprecht, C.; Ahel, M.; Schaffner, C.; Stoll, J.M. 1999. Chemikalien aus Waschung und Reinigungsmitteln in Schweizer Flüssen. *EAWAG News* 46D.
- Gillesby, B.E.; Zacharewski, T.R. 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ Toxicol Chem* 17: 3-14.
- Gimeno, S.; Gerritsen, A.; Bowmer, T.; Komen, H. 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384: 221-222.
- Gimeno, S.; Komen, H.; Gerritsen, A.; Bowmer, T. 1998a. Feminization of young male carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat Toxicol* 43: 77-92.
- Gimeno, S.; Komen, H.; Jobling, S.; Sumpter, J.; Bowmer, T. 1998b. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat Toxicol* 43: 93-109.
- Goede, R.R.; Barton, B.A. 1990. Organismic indices and an autopsy-bases assessment as indicators of health and condition of fish. *Am Fish S S* 8: 93-108.
- Goksøyr, A. 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *J Toxicol Environ Health A* 69: 175-184.
- Gomes, R.L.; Scrimshaw, M.D.; Lester, J.N. 2003. Determination of endocrine disruptors in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal Chem* 10: 697-707.
- González, A.; Piferrer, F. 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J Exp Zool* 293: 500-510.
- González, A.; Piferrer, F. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 132: 223-230.
- Goto-Kazeto, R.; Kight, K.E.; Zohar, Y.; Place, A.R.; Trant, J.M. 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 139: 72-84.
- Gray, M.A.; Metcalfe, C.D. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem* 16: 1082-1086.
- Gray, M.A.; Niimi, A.J.; Metcalfe, C.D. 1999. Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. *Environ Toxicol Chem* 18: 1835-1842.
- Greytak, S.R.; Champlin, D.; Callard, G.V. 2005. Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquat Toxicol* 71: 371-389.

- Grier, H.J.; Linton, J.R.; Leatherland, J.F.; De Vlaming, V.L. 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am J Anat* 159: 331-345.
- Groves, D.J.; Batten, T.F. 1986. Direct control of the gonadotroph in a teleost, *Poecilia latipinna*: gonadal steroids. *Gen Comp Endocrinol* 61: 402-416.
- Guiguen, Y.; Fostier, A.; Piferrer, F.; Chang, C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165: 352-366.
- Guillette, L.J., Jr.; Gunderson, M.P. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* 122: 857-864.
- Guillette, L.J., Jr.; Edwards, T.M. 2008. Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife? *Fertil Steril* 89: 21-24.
- Guyón, N.F.; Roggio, M.A.; Amé, M.V.; Hued, A.C.; Valdes, M.E.; Giojalas, L.C.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2012a. Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17beta-estradiol. *Environ Toxicol Chem* 31: 935-940.
- Guyón, N.F.; Bistoni, M.A.; Wunderlin, D.A.; Amé, M.V. 2012b. Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality. *J Braz Soc Ecotoxicol* 7: 97-104.
- Guzmán, M.C.; Bistoni, M.A.; Tamagnini, L.M.; González, R.D. 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Res* 38: 2367-2373.

H

- Hahlbeck, E. 2004. The juvenile three-spined stickleback, model organism for the study of estrogenic and androgenic endocrine disruption in laboratory and field. Doctoral thesis. Department of Systems Ecology, Institute of Applied Environmental Research (ITM). Stockholm University, Sweden, pp 43.
- Halm, S.; Rand-Weaver, M.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2001. Cloning and molecular characterization of an ovarian-derived (brain-like) P450 aromatase cDNA and development of a competitive RT-PCR assay to quantify its expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Fish Physiol Biochem* 24: 49-62.
- Halm, S.; Pounds, N.; Maddix, S.; Rand-Weaver, M.; Sumpter, J.P.; Hutchinson, T.H.; Tyler, C.R. 2002. Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 60: 285-299.
- Hall, J.M.; McDonnell, D.P.; Korach, K.S. 2002. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 16: 469-486.

- Hallgren, S.L.; Linderoth, M.; Olsen, K.H. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *Gen Comp Endocrinol* 147: 323-328.
- Hallgren, S.; Olsen, K.H. 2010. Effects on guppy brain aromatase activity following short-term steroid and 4-nonylphenol exposures. *Environ Toxicol* 25: 261-271.
- Hansen, H.P. 2003. Biomarkers. In: Markert, B.A.; Breure, A.M.; Zechmeister, H.G. (eds.). *Bioindicators & Biomonitoring. Principles, concepts and applications*. Elsevier: pp 203-220.
- Harada, N.; Utsumi, T.; Takagi, Y. 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11312-11316.
- Haro, J.G.; Bistoni, M.A. 1996. Ictiofauna de la Provincia de Córdoba. En: Di Tada, I.E.; Bucher, E.H. (eds.). *Biodiversidad de la Provincia de Córdoba*. Córdoba editora, Córdoba, pp169-190.
- Harries, J.E.; Sheahan, D.A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Neall, P.; Sumpter, J.P.; Tylor, T.; Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ Toxicol Chem* 16: 534-542.
- Harris, C.A.; Hamilton, P.B.; Runnalls, T.J.; Vinciotti, V.; Henshaw, A.; Hodgson, D.; Coe, T.S.; Jobling, S.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. 2011. The consequences of feminization in breeding groups of wild fish. *Environ Health Perspect* 119: 306-311.
- Haugen, T.; Andersson, E.; Norberg, B.; Taranger, G.L. 2011. The production of hermaphrodites of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by masculinization with orally administered 17- α -methyltestosterone, and subsequent production of all-female cod populations. *Aquaculture* 311: 248-254.
- Hayes, T.B.; Anderson, L.L.; Beasley, V.R.; de Solla, S.R.; Iguchi, T.; Ingraham, H.; Kestemont, P.; Kniewald, J.; Kniewald, Z.; Langlois, V.S.; Luque, E.H.; McCoy, K.A.; Munoz-de-Toro, M.; Oka, T.; Oliveira, C.A.; Orton, F.; Ruby, S.; Suzawa, M.; Tavera-Mendoza, L.E.; Trudeau, V.L.; Victor-Costa, A.B.; Willingham, E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: 64-73.
- Heath, A.G. 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hemmer, M.J.; Bowman, C.J.; Hemmer, B.L.; Friedman, S.D.; Marcovich, D.; Kroll, K.J.; Denslow, N.D. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat Toxicol* 58: 99-112.
- Hinfray, N.; Palluel, O.; Turies, C.; Cousin, C.; Porcher, J.M.; Brion, F. 2006a. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 21: 332-337.
- Hinfray, N.; Porcher, J.M.; Brion, F. 2006b. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144: 252-262.

- Hinfray, N.; Cheshenko, K.; Ait-Aissa, S.; Palluel, O.; Porcher, J.M.; Pakdel, F.; et al. 2008. Brain and gonadal aromatases as molecular and biochemical targets of endocrine disrupters in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Cybiurn* 32: 34-36.
- Hinfray, N.; Palluel, O.; Piccini, B.; Sanchez, W.; Ait-Aissa, S.; Noury, P.; Gomez, E.; Geraudie, P.; Minier, C.; Brion, F.; Porcher, J.M. 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Sci Total Environ* 408: 2146-2154.
- Hornung, M.W.; Jensen, K.M.; Korte, J.J.; Kahl, M.D.; Durhan, E.J.; Denny, J.S.; Henry, T.R.; Ankley, G.T. 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17alpha-methyltestosterone: conversion of 17alpha-methyltestosterone to 17alpha-methylestradiol. *Aquat Toxicol* 66: 15-23.
- Hou, L.; Xie, Y.; Ying, G.; Fang, Z. 2011. Developmental and reproductive characteristics of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to paper mill effluent in the Dengcun River, Sihui, South China. *Aquat Toxicol* 103: 140-149.
- Hoyos, L.E.; Cingolani, A.M.; Zak, M.R.; Vaieretti, M.V.; Gorla, D.E.; Cabido, M.R. 2012. Deforestation and precipitation patterns in the arid Chaco forests of central Argentina. *Appl Veg Sci*: 1-12.
- Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2002. Caracterización de la fauna Íctica del Río Icho Cruz-San Antonio (Córdoba, Argentina). *Natura Neotropicalis* 33: 1-9.
- Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2005. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543: 279-298.
- Hued, A.C.; Dardanelli, S.; Bistoni, M.A. 2010. Temporal and spatial variability of fish assemblages in a river with an environmental degradation gradient. *Community Ecol* 11: 41-50.
- Hued, A.C.; Oberhofer, S.; Bistoni, M.A. 2011. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup(R)) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Contam Toxicol* 62: 107-117.
- Hued, A.C.; Nostro, F.L.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2012. Reproductive impairment of a viviparous fish species inhabiting a freshwater system with anthropogenic impact. *Arch Environ Contam Toxicol* 64: 281-290.
- Hulak, M.; Psenicka, M.; Coward, K.; Linhart, O. 2008. A quantitative study of testicular germ cell populations in masculinized neomale common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell Biol Int* 32: 515-524.
- Hunter, G.A.; Donaldson, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M.Z. (eds.). *Fish Physiology, Reproduction, Behaviour, and Fertility Control*, Vol. IX-B. Academic Press, New York, pp 223-303.
- Hutchinson, J.B. 1993. Aromatase: neuromodulator in the control of behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 509-520.

I

- InfoStat. 2002. Grupo InfoStat Profesional, versión 1.1. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ishibashi, H.; Hirano, M.; Matsumura, N.; Watanabe, N.; Takao, Y.; Arizono, K. 2006. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 65: 1019-1026.
- Islinger, M.; Willimski, D.; Volkl, A.; Braunbeck, T. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquat Toxicol* 62: 85-103.

J

- Jeng, S.R.; Dufour, S.; Chang, C.F. 2005. Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303: 802-812.
- Jobling, S.; Sumpter, J.P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 27: 361- 372.
- Jobling, S.; Sheahan, D.; Osborne, J.A.; Matthiessen, P.; Sumpter, J.P. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15 (2): 194-202.
- Jobling, S.; Nolan, M.; Tyler, C.R.; Brighty, G.; Sumpter, J. 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506.
- Jobling, S.; Beresford, N.; Nolan, M.; Rodgers-Gray, T.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2002a. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 66: 272-281.
- Jobling, S.; Coey, S.; Whitmore, J.G.; Kime, D.E.; Van Look, K.J.; McAllister, B.G.; Beresford, N.; Henshaw, A.C.; Brighty, G.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. 2002b. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol Reprod* 67: 515-524.
- Jobling, S.; Tyler, C.R. 2003. Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology* 126: 103-108.
- Jobling, S.; Casey, D.; Rogers-Gray, T.; Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Pawlowski, S.; Baunbeck, T.; Turner, A.P.; Tyler, C.R. 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 66: 207-222.

- Jobling, S.; Owen, R. 2013. Ethinyl oestradiol in the aquatic environment. In: Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation Part B - Emerging lessons from ecosystems. European Environment Agency Report, pp 279-307.
- Johnson, A.C.; Aerni, H.R.; Gerritsen, A.; Gibert, M.; Giger, W.; Hylland, K.; Jurgens, M.; Nakari, T.; Pickering, A.; Suter, M.J.; Svenson, A.; Wettstein, F.E. 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res* 39: 47-58.
- Juberg, D.R.; Gehen, S.C.; Coady, K.K.; Lebaron, M.J.; Kramer, V.J.; Lu, H.; Marty, M.S. 2013. Chlorpyrifos: Weight of evidence evaluation of potential interaction with the estrogen, androgen, or thyroid pathways. *Regul Toxicol Pharmacol* 66: 249-263.

K

- Kallivretaki, E.; Eggen, R.; Neuhaus, S.; Alberti, M.; Kausch, U.; Segner, H. 2006. Aromatase in zebrafish: a potential target for endocrine disrupting chemicals. *Mar Environ Res* 62: S187-190.
- Kang, I.J.; Yokota, H.; Oshima, Y.; Tsuruda, Y.; Yamaguchi, T.; Maeda, M.; Imada, N.; Tadokoro, H.; Honjo, T. 2002. Effect of 17beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- Kang, I.J.; Yokota, H.; Oshima, Y.; Tsuruda, Y.; Shimasaki, Y.; Honjo, T. 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 87: 37-46.
- Kavlock, R.J.; Daston, G.P.; DeRosa, C.; Fenner-Crisp, P.; Gray, L.E.; Kaattari, S. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104: 715-740.
- Kazeto, Y.; Ijiri, S.; Place, A.R.; Zohar, Y.; Trant, J.M. 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 503-508.
- Kazeto, Y.; Goto-Kazeto, R.; Place, A.R.; Trant, J.M. 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiol Biochem* 28: 29-32.
- Kazeto, Y.; Place, A.R.; Trant, J.M. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol* 69: 25-34.
- Kazeto, Y.; Trant, J.M. 2005. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *J Mol Endocrinol* 35: 571-583.
- Kidd, K.A.; Blanchfield, P.J.; Mills, K.H.; Palace, V.P.; Evans, R.E.; Lazorchak, J.M.; Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8897-8901.

- Kime, D.E. 1998. Endocrine disruption in fish. Boston, Kluwer, pp 416.
- Kime, D.E. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci Tot Environ* 225(2): 3-11.
- Kime, D.E.; Nash, J.P. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Sci Total Environ* 233: 123-129.
- Kinnberg, K.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P.; Jespersen, A. 2000. Effects of nonylphenol and 17beta-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *J Exp Biol* 203: 171-181.
- Kinnberg, K.; Toft, G. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 16-24.
- Kishida, M.; Callard, G.V. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142: 740-750.
- Kishida, M.; McLellan, M.; Miranda, J.A.; Callard, G.V. 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Phys B* 129: 261-268.
- Kitano, T.; Takamune, K.; Nagahama, Y.; Abe, S.I. 2000. Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev* 56: 1-5.
- Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36: 1202-1211.
- Korner, W.; Bolz, U.; Sussmuth, W.; Hiller, G.; Schuller, W.; Hanf, V.; Hagenmaier, H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40: 1131-1142.
- Korsgaard, B.; Pedersen, K.L. 1998. Vitellogenin in *Zoarcetes viviparus*: purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 beta and 4-nonylphenol. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 120: 159-166.
- Kortner, T.M.; Mortensen, A.S.; Hansen, M.D.; Arukwe, A. 2009. Neural aromatase transcript and protein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) are modulated by the ubiquitous water pollutant, 4-nonylphenol. *Gen Comp Endocrinol* 164: 91-99.
- Kristensen, T.; Baatrup, E.; Bayley, M. 2005. 17alpha-ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy (*Poecilia reticulata*). *Biol Reprod* 72: 150-156.
- Kuhl, A.J.; Manning, S.; Brouwer, M. 2005. Brain aromatase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen-induced sex reversal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96: 67-77.
- Kwak, H.I.; Bae, M.O.; Lee, M.H.; Lee, Y.S.; Lee, B.J.; Kang, K.S.; Chae, C.H.; Sung, H.J.; Shin, J.S.; Kim, J.H.; Mar, W.C.; Sheen, Y.Y.; Cho, M.H. 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their

mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ Toxicol Chem* 20: 787-795.

Kwon, J.Y.; McAndrew, B.J.; Penman, D.J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59: 359-370.

L

Lange, A.; Katsu, Y.; Ichikawa, R.; Paull, G.C.; Chidgey, L.L.; Coe, T.S.; Iguchi, T.; Tyler, C.R. 2008. Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17alpha-ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicol Sci* 106: 113-123.

Lange, A.; Paull, G.C.; Coe, T.S.; Katsu, Y.; Urushitani, H.; Iguchi, T.; Tyler, C.R. 2009. Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol. *Environ Sci Technol* 43: 1219-1225.

Lange, R.; Hutchinson, T.H.; Croudace, C.P.; Siegmund, F.; Schweinfurth, H.; Hampe, P.; Panter, G.H.; Sumpter, J.P. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20: 1216-1227.

Larsson, D.G.J.; Hällman, H.; Förlin, L. 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 19: 2911-2917.

Larsson, J.; Förlin, L. 2002. Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown. *Environ Health Perspect* 110: 739-742.

Lauenstein, G.G.; Daskalakis, K. 1998. U.S. Long-term Coastal Contaminant Temporal Trends Determined from Mollusk Monitoring Programs, 1965-1993. *Mar Pollut Bull* 37: 6-13.

Lavado, R.; Thibaut, R.; Raldua, D.; Martin, R.; Porte, C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 247-257.

Lavelle, C.; Sorensen, P.W. 2011. Behavioral responses of adult male and female fathead minnows to a model estrogenic effluent and its effects on exposure regime and reproductive success. *Aquat Toxicol* 101: 521-528.

Le Page, Y.; Scholze, M.; Kah, O.; Pakdel, F. 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ Health Perspect* 114: 752-758.

Le Page, Y.; Menuet, A.; Kah, O.; Pakdel, F. 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol Reprod Dev* 75: 1549-1557.

Le Page, Y.; Diotel, N.; Vaillant, C.; Pellegrini, E.; Anglade, I.; Mérot, Y.; Kah, O. 2010. Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *Eur J Neurosci* 32: 2105-2115.

- Lee, Y.H.; Lee, F.Y.; Yueh, W.S.; Tacon, P.; Du, J.L.; Chang, C.N.; Jeng, S.R.; Tanaka, H.; Chang, C.F. 2000. Profiles of gonadal development, sex steroids, aromatase activity, and gonadotropin II in the controlled sex change of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker. *Gen Comp Endocrinol* 119: 111-120.
- Lee, Y.M.; Seo, J.S.; Kim, I.C.; Yoon, Y.D.; Lee, J.S. 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 894-903.
- Legler, J.; Zeinstra, L.M.; Schuitemaker, F.; Lanser, P.H.; Bogerd, J.; Brouwer, A.; Vethaak, A.D.; De Voogt, P.; Murk, A.J.; Van der Burg, B. 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 36: 4410-4415.
- Lephart, E.D. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Rev* 22: 1-26.
- Levin, E.R. 2001. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 91: 1860-1867.
- Lewis, S.K.; Lech, J.J. 1996. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 26: 813-819.
- Li, W.; Zha, J.; Li, Z.; Yang, L.; Wang, Z. 2009. Effects of exposure to acetochlor on the expression of thyroid hormone related genes in larval and adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat Toxicol* 94: 87-93.
- Lin, L.L.; Janz, D.M. 2006. Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquat Toxicol* 80: 382-395.
- Loos, R.; Hanke, G.; Umlauf, G.; Eisenreich, S.J. 2007. LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66: 690-699.
- Lye, C.M.; Frid, C.L.J.; Gill, M.E.; McCormick, D. 1997. Abnormalities in the Reproductive health of Flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a Sewage Treatment Works. *Mar Pollut Bull* 34: 34-41.
- Lye, C.M.; Frid, C.L.J.; Gill, M.E.; Cooper, D.W.; Jones, D.M. 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. *Environ Sci Technol* 33: 1009-1014.
- Lyssimachou, A.; Jenssen, B.M.; Arukwe, A. 2006. Brain cytochrome P450 aromatase gene isoforms and activity levels in atlantic salmon after waterborne exposure to nominal environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol and antifoulant tributyltin. *Toxicol Sci* 91: 82-92.

M

- Ma, T.; Wan, X.; Huang, Q.; Wang, Z.; Liu, J. 2005. Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 59: 281-288.
- MacLatchy, D.L.; Courtenay, S.C.; Rice, C.D.; Van der Kraak, G.J. 2003. Development of a short-term reproductive endocrine bioassay using steroid hormone and vitellogenin endpoints in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem* 22: 996-1008.
- MacLusky, N.J.; Naftolin, F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1302.
- Maggioni, T.; Hued, A.C.; Monferrán, M.V.; Bonansea, R.I.; Galanti, L.N.; Amé, M.V. 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquia River (Cordoba, Argentina). *Arch Environ Contam Toxicol* 63: 337-353.
- Malabarba, L.; Reis, R.; Vari, R.; Lucena, Z.; Lucena, C. 1998. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 603.
- Marlatt, V.L.; Martyniuk, C.J.; Zhang, D.; Xiong, H.; Watt, J.; Xia, X.; Moon, T.; Trudeau, V.L. 2008. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17beta-estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 283: 38-48.
- Martínez, V.H.; Monasterio de Gonzo, G.A.M. 2002. Testis morphology and spermatocyte formation in *Jenysia multidentata*. Second International Symposium on Live-Bearing Fishes, Querétaro.
- Martinovic, D.; Hogarth, W.T.; Jones, R.E.; Sorensen, P.W. 2007. Environmental estrogens suppress hormones, behavior, and reproductive fitness in male fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 26: 271-278.
- Martinovic, D.; Denny, J.S.; Schmieder, P.K.; Ankley, G.T.; Sorensen, P.W. 2008. Temporal variation in the estrogenicity of a sewage treatment plant effluent and its biological significance. *Environ Sci Technol* 42: 3421-3427.
- Martyniuk, C.J.; Xiong, H.; Crump, K.; Chiu, S.; Sardana, R.; Nadler, A.; Gerrie, E.R.; Xia, X.; Trudeau, V.L. 2006. Gene expression profiling in the neuroendocrine brain of male goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17alpha-ethinylestradiol. *Physiol Genomics* 27: 328-336.
- McEwen, B.S. 1997. Hormone actions in the brain. In: Conn, P.M.; Melmed, S. (eds.). *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., pp 63-78.
- McLachlan, J.A. 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22: 319-341.
- Meina, E.G.; Lister, A.; Bosker, T.; Servos, M.; Munkittrick, K.; MacLatchy, D. 2013. Effects of 17alpha-ethinylestradiol (EE2) on reproductive endocrine status in mummichog

- (*Fundulus heteroclitus*) under differing salinity and temperature conditions. *Aquat Toxicol* 134-135: 92-103.
- Melo, A.C.; Edmunds, J.S.G.; Ramsdell, J.S. 1999. Localization and sex steroid regulation of brain aromatase activity: identification of a positive feedback mechanism that may be triggered by environmental cues. In: Henshel, D.S.; Black, M.C.; Harrass, M.C. (eds.). Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment. West Conshohocken, PA, American Society for Testing and Materials, pp 226-238.
- Melo, A.C.; Ramsdell, J.S. 2001. Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. *Environ Health Perspect* 109: 257-264.
- Menuet, A.; Anglade, I.; Le Guevel, R.; Pellegrini, E.; Pakdel, F.; Kah, O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J Comp Neurol* 462: 180-193.
- Menuet, A.; Pellegrini, E.; Brion, F.; Gueguen, M.M.; Anglade, I.; Pakdel, F.; Kah, O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485: 304-320.
- Merlo, C.; Abril, A.; Amé, M.V.; Arguello, G.A.; Carreras, H.A.; Chiappero, M.S.; Hued, A.C.; Wannaz, E.; Galanti, L.N.; Monferrán, M.V.; Gonzalez, C.M.; Solis, V.M. 2011. Integral assessment of pollution in the Suquia River (Cordoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Sci Total Environ* 409: 5034-5045.
- Metcalfe, C.D.; Metcalfe, T.L.; Kiparissis, Y.; Koenig, B.G.; Khan, C.; Hughes, R.J.; Croley, T.R.; March, R.E.; Potter, T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20: 297-308.
- Meucci, V.; Arukwe, A. 2006a. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquat Toxicol* 77: 167-177.
- Meucci, V.; Arukwe, A. 2006b. The environmental estrogen, 4-nonylphenol modulates brain estrogen-receptor- and aromatase (CYP19) isoforms gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar Environ Res* 62:195-199.
- Miles-Richardson, S.R.; Kramer, V.J.; Fitzgerald, S.D.; Render, J.A.; Yamini, B.; Barbee, S.J.; et al. 1999a. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47: 129-145.
- Miles-Richardson, S.R.; Pierens, S.L.; Nichols, K.M.; Kramer, V.J.; Snyder, E.M.; Snyder, S.A.; Render, J.A.; Fitzgerald, S.D.; Giesy, J.P. 1999b. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Res* 80: S122-S137.
- Milnes, M.R.; Bermudez, D.S.; Bryan, T.A.; Edwards, T.M.; Gunderson, M.P.; Larkin, I.L.; Moore, B.C.; Guillette, L.J., Jr. 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environ Res* 100: 3-17.

- Mills, L.J.; Chichester, C. 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci Total Environ* 343: 1-34.
- Mohan, B.S.; Hosetti, B.B. 1999. Review: Aquatic plants for toxicity assessment. *Environ Res Sect A* 81: 259-274.
- Monferrán, M.V.; Galanti, L.N.; Bonansea, R.I.; Amé, M.V.; Wunderlin, D.A. 2011. Integrated survey of water pollution in the Suquia River basin (Cordoba, Argentina). *J Environ Monit* 13: 398-409.
- Morris, J.A.; Jordan, C.L.; Breedlove, S.M. 2004. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system, *Nat Neurosci* 7:1034-1039.
- Mouriec, K.; Pellegrini, E.; Anglade, I.; Menuet, A.; Adrio, F.; Thieulant, M.L.; Pakdel, F.; Kah, O. 2008. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Res Bull* 75: 274-280.

N

- Naftolin, F.; Ryan, K.J.; Davies, I.J.; Reddy, V.V.; Flores, F.; Petro, Z.; Kuhn, M.; White, R.J.; Takaoka, Y.; Wolin, L. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31: 295-319.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M. (eds.). *Fish physiology*, Vol. IX, Reproduction, Part A, Endocrine tissues and hormones. Academic Press, New York, pp 223-275.
- Nakada, N.; Nyunoya, H.; Nakamura, M.; Hara, A.; Iguchi, T.; Takada, H. 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem* 23: 2807-2815.
- Nash, J.P.; Kime, D.E.; Van der Ven, L.T.; Wester, P.W.; Brion, F.; Maack, G.; Stahlschmidt-Allner, P.; Tyler, C.R. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ Health Perspect* 112: 1725-1733.
- Naylor, C.G. 1992. Environmental fate of alkylphenol ethoxylates. *Soap Cosmet Chem Spec*: 27-32.
- Neff, B.; Cargnelli, L. 2004. Relationships between condition factors, parasite load, and paternity in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Environ Biol Fish* 71: 297-301.
- Nelson, D.R.; Kamataki, T.; Waxman, D.J.; Guengerich, F.P.; Estabrook, R.W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F.J.; Coon, M.J.; Gunsalus, I.C.; Gotoh, O.; et al. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51.
- Nielsen, L.; Baatrup, E. 2006. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquat Toxicol* 80: 140-148.

- Nilsson, S.; Makela, S.; Treuter, E.; Tujague, M.; Thomsen, J.; Andersson, G.; Enmark, E.; Pettersson, K.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81: 1535-1565.
- Nimptsch, J.; Wunderlin, D.A.; Dollan, A.; Pflugmacher, S. 2005. Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquia River basin (Cordoba, Argentina). *Chemosphere* 61: 147-157.
- Noaksson, E.; Tjarnlund, U.; Bosveld, A.T.; Balk, L. 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol Appl Pharmacol* 174: 160-176.
- Noaksson, E.; Linderoth, M.; Bosveld, A.T.; Balk, L. 2003. Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *Gen Comp Endocrinol* 134: 273-284.
- Nocillado, J.N.; Elizur, A.; Avitan, A.; Carrick, F.; Levavi-Sivan, B. 2007. Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty. *Mol Cell Endocrinol* 263: 65-78.

O

- Orlando, E.F.; Davis, W.P.; Guillette, L.J., Jr. 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ Health Perspect* 110 (3): 429-433.
- Orlando, E.F.; Kolok, A.S.; Binzcik, G.A.; Gates, J.L.; Horton, M.K.; Lambright, C.S.; Gray, L.E., Jr.; Soto, A.M.; Guillette, L.J., Jr. 2004. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow. *Environ Health Perspect* 112: 353-358.
- Orlando, E.F.; Guillette, L.J., Jr. 2007. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environ Res* 104: 163-173.
- Örn, S.; Holbech, H.; Madsen, T.H.; Norrgren, L.; Petersen, G.I. 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat Toxicol* 65: 397-411.
- Ortiz-Zarragoitia, M.; Cajaraville, M.P. 2005. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141: 133-144.
- Oshima, Y.; Kang, I.J.; Kobayashi, M.; Nakayama, K.; Imada, N.; Honjo, T. 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17beta-estradiol. *Chemosphere* 50: 429-436.

P

- Page, R.D.M. 2003. UNIT 6.2 Visualizing Phylogenetic Trees Using TreeView. Current Protocols in Bioinformatics.
- Pait, A.S.; Nelson, J.O. 2002. Endocrine Disruption in fish: Assessment of Recent Research and Results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD:NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, pp 55.
- Palace, V.P.; Evans, R.E.; Wautier, K.; Baron, C.; Vandebylardt, L.; Vandersteen, W.; Kidd, K. 2002. Induction of vitellogenin and histological effects in wild fathead minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethinylestradiol. *Water Qual Res J Canada* 37 (3): 637-650.
- Pandian, T.J.; Sheela, S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138: 1-22.
- Panter, G.H.; Thompson, R.S.; Sumpter, J.P. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat Toxicol* 42: 243-253.
- Parenti, L.R.; Grier, H.J. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44: 333-348.
- Parrott, J.L.; Wood, C.S. 2002. Fathead minnow lifecycle test for detection of endocrine-disrupting substances in effluent. *Water Qual Res J Canada* 37: 651-667.
- Parrott, J.L.; Blunt, B.R. 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ Toxicol* 20: 131-141.
- Parsons, B.; Rainbow, T.C.; McEwen, B.S. 1984. Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterin receptors in rat brain. *Endocrinology* 115: 1412-1417.
- Pasmanik, M.; Callard, G.V. 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122: 1349-1356.
- Pasmanik, M.; Schlinger, B.A.; Callard, G.V. 1988. In vivo steroid regulation of aromatase and 5 alpha-reductase in goldfish brain and pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 71: 175-182.
- Pasquini, A.I.; Formica, S.M.; Sacchi, G.A. 2012. Hydrochemistry and nutrients dynamic in the Suquia River urban catchment's, Córdoba, Argentina. *Environ Earth Sci* 65: 453-467.
- Patel, M.R.; Scheffler, B.E.; Wang, L.; Willett, K.L. 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquat Toxicol* 77: 267-278.
- Pawlowski, S.; van Aerle, R.; Tyler, C.R.; Braunbeck, T. 2004. Effects of 17alpha-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 330-345.

- Pellegrini, E.; Mouriec, K.; Anglade, I.; Menuet, A.; Le Page, Y.; Gueguen, M.M.; Marmignon, M.H.; Brion, F.; Pakdel, F.; Kah, O. 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501: 150-167.
- Pérez, M.R.; Fernandino, J.I.; Carriquiriborde, P.; Somoza, G.M. 2012. Feminization and altered gonadal gene expression profile by ethinylestradiol exposure to pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, a South American teleost fish. *Environ Toxicol Chem* 31: 941-946.
- Pesce, S.F.; Wunderlin, D.A. 2000. Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River. *Wat Res* 34: 2915-2926.
- Pesce, S.F.; Cazenave, J.; Monferrán, M.V.; Frede, S.; Wunderlin, D.A. 2008. Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ Pollut* 156: 775-783.
- Petit, F.G.; Metivier, R.; Valotaire, Y.; Pakdel, F. 1999. Synergism between a half-site and an imperfect estrogen-responsive element, and cooperation with COUP-TFI are required for estrogen receptor (ER) to achieve a maximal estrogen-stimulation of rainbow trout ER gene. *Eur J Biochem* 259: 385-395.
- Petrovic, M.; Fernandez-Alba, A.R.; Borrull, F.; Marce, R.M.; González, M.E.; Barcelo, D. 2002. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ Toxicol Chem* 21: 37-46.
- Piferrer, F.; Donaldson, E.M. 1993. Dosage dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol Biochem* 9: 145-150.
- Piferrer, F.; Baker, I.J.; Donaldson, E.M. 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen Comp Endocrinol* 91: 59-65.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32: 459-497.

R

- Rey-Vázquez, G.; Meijide, F.J.; Da Cuña, R.H.; Lo Nostro, F.L.; Piazza, Y.G.; Babay, P.A.; Trudeau, V.L.; Maggese, M.C.; Guerrero, G.A. 2009. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150: 298-306.
- Richman, L.A.; Hobson, G.; Williams, D.J.; Reiner, E. 2011. The Niagara River mussel biomonitoring program (*Elliptio complanata*): 1983-2009. *J Great Lakes Res* 37(2): 213-225.

- Rodgers-Gray, T.P.; Jobling, S.; Morris, S.; Kelly, C.; Kirby, S.; Janbakhsh, A. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ Sci Technol* 34: 1521-1528
- Roggio, M.A.; Hued, A.C.; Guyón, N.F.; Bistoni, M.A. 2011. Alteraciones en el comportamiento reproductivo en machos de *Jenynsia multidentata* como biomarcador de exposición a xenoestrogenos. II Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Juan, Argentina, p160.
- Roggio, M.A.; Maldonado, C.; Guyón, N.F.; Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2012. Efectos de xenohormonas sobre la ultraestructura de testículo de *Jenynsia multidentata*. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Buenos Aires, Argentina.

S

- Saaristo, M.; Craft, J.A.; Lehtonen, K.K.; Bjork, H.; Lindstrom, K. 2009. Disruption of sexual selection in sand gobies (*Pomatoschistus minutus*) by 17alpha-ethinyl estradiol, an endocrine disruptor. *Horm Behav* 55: 530-537.
- Salierno, J.D.; Kane, A.S. 2009. 17alpha-ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones, and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 28: 953-961.
- Sawyer, S.J.; Gerstner, K.A.; Callard, G.V. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen Comp Endocrinol* 147: 108-117.
- Schaar, H.; Clara, M.; Gans, O.; Kreuzinger, N. 2010. Micropollutant removal during biological wastewater treatment and a subsequent ozonation step. *Environ Pollut* 158: 1399-1404.
- Schlinger, B.A.; Callard, G.V. 1990. Aromatization mediates aggressive behavior in quail. *Gen Comp Endocrinol* 79: 39-53.
- Schlinger, B.A.; Greco, C.; Bass, A. 1999. Aromatase activity in the hindbrain vocal control region of a teleost fish: divergence among males with alternative reproductive tactics. *Proc Roy Soc Lond, B* 266: 131-136.
- Schoenfuss, H.L.; Levitt, J.T.; Van der Kraak, G.; Sorensen, P.W. 2002. Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ Toxicol Chem* 21: 2185-2190.
- Schoenfuss, H.L.; Bartell, S.E.; Bistodeau, T.B.; Cediell, R.A.; Grove, K.J.; Zintek, L.; Lee, K.E.; Barber, L.B. 2008. Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. *Aquat Toxicol* 86: 91-98.
- Scholz, S.; Gutzeit, H.O. 2000. 17-alpha-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 50: 363-373.

- Scholz, S.; Klüver, N. 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. *Sex Dev* 3: 136-151.
- Schultz, I.R.; Orner, G.; Merdink, J.L.; Skillman, A. 2001. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17alpha-ethynylestradiol. *Aquat Toxicol* 51: 305-318.
- Schultz, I.R.; Skillman, A.; Nicolas, J.M.; Cyr, D.G.; Nagler, J.J. 2003. Short-term exposure to 17 alpha-ethynylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 22: 1272-1280.
- Schulz, R.W.; Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26: 43-56.
- Schwaiger, J.; Mallow, U.; Ferling, H.; Knoerr, S.; Braunbeck, T.; Kalbfus, W.; Negele, R.D. 2002. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat Toxicol* 59: 177-189.
- Schweer, G. 2002. Draft Detailed Review Paper on a Fish Two-generation Toxicity Test. EPA, Battelle, Report No.68-W-01-02.
- Segner, H.; Carroll, K.; Fenske, M.; Janssen, C.R.; Maack, G.; Pascoe, D.; Schafers, C.; Vandenberg, G.F.; Watts, M.; Wenzel, A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 302-314.
- Segner, H. 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149: 187-195.
- Seki, M.; Yokota, H.; Matsubara, H.; Maeda, M.; Tadokoro, H.; Kobayashi, K. 2004. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 23: 774-781.
- Shanathanagouda, A.H.; Patil, J.G.; Nugegoda, D. 2013. Effects of exposure to oestrogenic compounds on aromatase gene expression are gender dependent in the rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 157: 162-171.
- Shore, L.S.; Gurevitz, M.; Shemesh, M. 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull Environ Contam Toxicol* 51: 361-366.
- Shyu, C.; Cavileer, T.D.; Nagler, J.J.; Ytreberg, F.M. 2011. Computational estimation of rainbow trout estrogen receptor binding affinities for environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 250: 322-326.
- Silva, P.; Rocha, M.J.; Cruzeiro, C.; Malhao, F.; Reis, B.; Urbatzka, R.; Monteiro, R.A.; Rocha, E. 2012. Testing the effects of ethynylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads: a stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquat Toxicol* 124-125: 1-10.
- Simpson, E.R.; Mahendroo, M.S.; Means, G.D.; Kilgore, M.W.; Hinshelwood, M.M.; Graham-Lorence, S.; Amarneh, B.; Ito, Y.; Fisher, C.R.; Michael, M.D. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15: 342-355.

- Simpson, E.R.; Clyne, C.; Rubin, G.; Boon, W.C.; Robertson, K.; Britt, K.; Speed, C.; Jones, M. 2002. Aromatase, a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64: 93-127.
- Singh, P.B.; Singh, V. 2008. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17beta and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere* 72: 422-431.
- Slooff, W.; van Kreijl, C.F.; Baars, A.J. 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquat Toxicol* 4: 1-14.
- Snyder, S.A.; Keith, T.L.; Verbrugge, D.A.; Snyder, E.M.; Gross, T.S.; Kannan, K.; Giesy, J.P. 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ Sci Technol* 33(16): 2814-2820.
- Snyder, S.A. 2008. Occurrence, Treatment, and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Water. *Ozone-Sci Eng* 30 (1): 65-69.
- Soares, A.; Guieysse, B.; Jefferson, B.; Cartmell, E.; Lester, J.N. 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 34: 1033-1049.
- Söffker, M.; Tyler, C.R. 2012. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish: a critical review on effects and possible consequences. *Crit Rev Toxicol* 42: 653-668.
- Sohoni, P.; Tyler, C.R.; Hurd, K.; Caunter, J.; Hetheridge, M.; Williams, T.; Woods, C.; Evans, M.; Toy, R.; Gargas, M.; Sumpter, J.P. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35: 2917-2925.
- Solé, M.; Lopez de Alda, M.J.; Castillo, M.; Porte, C.; Ladegaard-Pedersen, K.; Barcelo, D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from Catalanian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 34: 5076-5083.
- Sonnenschein, C.; Soto, A.M. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 143-150.
- Soto, A.M.; Calabro, J.M.; Prechtel, N.V.; Yau, A.Y.; Orlando, E.F.; Daxenberger, A.; Kolok, A.S.; Guillette, L.J., Jr.; le Bizec, B.; Lange, I.G.; Sonnenschein, C. 2004. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environ Health Perspect* 112: 346-352.
- Strobl-Mazzulla, P.H.; Moncaut, N.P.; Lopez, G.C.; Miranda, L.A.; Canario, A.V.; Somoza, G.M. 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen Comp Endocrinol* 143: 21-32.
- Strobl-Mazzulla, P.H.; Nunez, A.; Pellegrini, E.; Gueguen, M.M.; Kah, O.; Somoza, G.M. 2010. Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain Behav Evol* 76: 20-31.
- Sumpter, J.P.; Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103(7): 173-178.
- Sumpter, J.P. 1998. Xenoendocrine disrupters- environmental impacts. *Toxicol Lett* 102-103: 337-342.

- Sumpter, J.P. 2008. The ecotoxicology of hormonally active micropollutants. *Water Sci Technol* 57: 125-130.
- Sun, L.; Liu, Y.; Chu, X.; Lin, J.M. 2010. Trace Analysis of Fifteen Androgens in Environmental Waters by LC-ESI-MS-MS Combined with Solid-Phase Disk Extraction Cleanup. *Chromatographia* 71: 867-873.
- Sun, L.; Shao, X.; Hu, X.; Chi, J.; Jin, Y.; Ye, W.; Fu, Z. 2011. Transcriptional responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to binary mixtures of an estrogen and anti-estrogens. *Aquat Toxicol* 105: 629-639.

T

- Takatsuki, A.; Yamaguchi, I. 2001. Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds. *RIKEN Rev* 42: 43-44.
- Tanaka, M.; Telecky, T.M.; Fukada, S.; Adachi, S.; Chen, S.; Nagahama, Y. 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 beta in the ovary. *J Mol Endocrinol* 8: 53-61.
- Tchoudakova, A.; Callard, G.V. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139: 2179-2189.
- Tchoudakova, A.; Kishida, M.; Wood, E.; Callard, G.V. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 427-439.
- Ternes, T.A.; Kreckel, P.; Mueller, J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 225: 91-99.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Thorpe, K.L.; Cummings, R.I.; Hutchinson, T.H.; Scholze, M.; Brighty, G.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol* 37: 1142-1149.
- Tilton, F.; Benson, W.H.; Schlenk, D. 2002. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquat Toxicol* 61: 211-224.
- Tilton, S.C.; Foran, C.M.; Benson, W.H. 2005. Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 24: 352-359.

- Toft, G.; Baatrup, E. 2001. Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17beta-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 48: 76-84.
- Toft, G.; Baatrup, E. 2003. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17beta-estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 228-237.
- Toft, G.; Baatrup, E.; Guillette, L.J., Jr. 2004. Altered social behavior and sexual characteristics in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) living downstream of a paper mill. *Aquat Toxicol* 70: 213-222.
- Trant, J.M. 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450arom. *Gen Comp Endocrinol* 95: 155-168.
- Trant, J.M.; Gavasso, S.; Ackers, J.; Chung, B.C.; Place, A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool* 290: 475-483.
- Tsai, C.L.; Wang, L.H.; Chang, C.F.; Kao, C.C. 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J Neuroendocrinol* 12: 894-898.
- Tsuda, T.; Suga, K.; Kaneda, E.; Ohsuga, M. 2000. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 746: 305-309.
- Tsuda, T.; Takino, A.; Muraki, K.; Harada, H.; Kojima, M. 2001. Evaluation of 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. *Water Res* 35: 1786-1792.
- Tyler, C.R.; Routledge, E.J. 1998. Oestrogenic effects in fish in english rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem* 70: 1795-1804.
- Tyler, C.R.; Filby, A.L.; Bickley, L.K.; Cumming, R.I.; Gibson, R.; Labadie, P.; Katsu, Y.; Liney, K.E.; Shears, J.A.; Silva-Castro, V.; Urushitani, H.; Lange, A.; Winter, M.J.; Iguchi, T.; Hill, E.M. 2009. Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. *Environ Sci Technol* 43: 3897-3904.

U

- Uguz, C.; Iscan, M.; Erguven, A.; Isgor, B.; Togan, I. 2003. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environ Res* 92:262-270.

V

- Vajda, A.M.; Barber, L.B.; Gray, J.L.; Lopez, E.M.; Woodling, J.D.; Norris, D.O. 2008. Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environ Sci Technol* 42: 3407-3414.
- Vajda, A.M.; Barber, L.B.; Gray, J.L.; López, E.M.; Bolden, A.M.; Schoenfuss, H.L.; Norris, D.O. 2011. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquat Toxicol* 103: 213-221.
- Valdés, E.; Marino, D.; Somoza, G.M.; Ronco, A.; Wunderlin, D.; Carriquiriborde, P. 2010. Metodología de análisis de esteroides de relevancia ambiental en efluentes cloacales y sus cuerpos de agua receptores por HPLC-MS/MS. III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Santa Fe, Argentina, p 128.
- Valdés, M.E.; Bistoni, M.A.; Wunderlin, D.A. 2012. Optimización metodológica de análisis de fármacos en agua superficial y su determinación en la cuenca del Río Suquía (Córdoba, Argentina). IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Buenos Aires, Argentina, comunicación oral.
- Van den Belt, K.; Wester, P.W.; van der Ven, L.T.; Verheyen, R.; Witters, H. 2002. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ Toxicol Chem* 21: 767-775.
- Van den Belt, K.; Verheyen, R.; Witters, H. 2003. Effects of 17alpha-ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, gonads and female reproductive success. *Sci Total Environ* 309: 127-137.
- Van Der Kraak, G.; Zacharewski, T.; Janz, D.M.; Sanders, B.M.; Gooch, J.W. 1998. Comparative endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. In: Kendall, R.J.; Dickerson, R.L.; Giesey, J.P.; Suk, W.A. (eds.). Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruptions in Wildlife. SETAC, Pensacola, Florida.
- Van Der Kraak, G.; Hewitt, M.; Lister, A.; McMaster, M.E.; Munkittrick, K.R. 2001. Endocrine Toxicants and Reproductive Success in Fish. *Hum Ecol Risk Assess* 7: 1017-1025.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- van der Ven, L.T.; Wester, P.W.; Vos, J.G. 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 22: 908-913.
- Vandenberg, L.N.; Colborn, T.; Hayes, T.B.; Heindel, J.J.; Jacobs, D.R., Jr.; Lee, D.H.; Shioda, T.; Soto, A.M.; vom Saal, F.S.; Welshons, W.V.; Zoeller, R.T.; Myers, J.P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33: 378-455.
- Vázquez-Duhalt, R.; Marquez-Rocha, F.; Ponce, E.; Licea, A.F.; Viana, M.T. 2005. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Appl Ecol Env Res* 4: 1-25.

- Vázquez, J.B.; Lopez-Robles, A.; Saez, M.P. 1979. Aguas. En: Vázquez, J.B.; Miatello, R.A.; Roque, M. (eds.). Geografía física de la provincia de Córdoba. Córdoba, Banco Provincia de Córdoba, pp 139-211.
- Velasco-Santamaría, Y.M.; Bjerregaard, P.; Korsgaard, B. 2010. Gonadal alterations in male eelpout (*Zoarces viviparus*) exposed to ethinylestradiol and trenbolone separately or in combination. *Mar Environ Res* 69: 67-69.
- Versonnen, B.J.; Janssen, C.R. 2004. Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 19: 198-206.
- Villeneuve, D.L.; Villalobos, S.A.; Keith, T.L.; Snyder, E.M.; Fitzgerald, S.D.; Giesy, J.P. 2002. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 47: 15-28.
- Vizziano-Cantonnet, D.; Anglade, I.; Pellegrini, E.; Gueguen, M.M.; Fostier, A.; Guiguen, Y.; Kah, O. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *Gen Comp Endocrinol* 170: 346-355.
- Vos, J.G.; Dybing, E.; Greim, H.A.; Ladefoged, O.; Lambre, C.; Tarazona, J.V.; Brandt, I.; Vethaak, A.D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30: 71-133.
- Vosges, M.; Le Page, Y.; Chung, B.C.; Combarous, Y.; Porcher, J.M.; Kah, O.; Brion, F. 2010. 17alpha-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat Toxicol* 99: 479-491.
- Vosges, M.; Kah, O.; Hinfrey, N.; Chadili, E.; Le Page, Y.; Combarous, Y.; Porcher, J.M.; Brion, F. 2011. 17alpha-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reprod Toxicol* 33: 198-204.

W

- Wang, J.; Liu, X.; Wang, H.; Wu, T.; Hu, X.; Qin, F.; Wang, Z. 2010. Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 152: 313-320.
- Watanabe, T.; Coler, R.A.; Paz, R.J. 1999. The implementation of a regional biomonitoring program in northeast Brazil. *Aquat Ecosyst Health* 2:187-189
- Waye, A.; Trudeau, V.L. 2011. Neuroendocrine Disruption: More Than Hormones are Upset. *J Toxicol Env Health B* 14: 270-291.
- Weber, L.P.; Kiparissis, Y.; Hwang, G.S.; Niimi, A.J.; Janz, D.M.; Metcalfe, C.D. 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131: 51-59.

- Weber, L.P.; Hill, R.L., Jr.; Janz, D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat Toxicol* 63: 431-446.
- Welshons, W.V.; Thayer, K.A.; Judy, B.M.; Taylor, J.A.; Curran, E.M.; vom Saal, F.S. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111: 994-1006.
- Wen, R.; Xie, Y.; Wan, C.; Fang, Z. 2013. Estrogenic and androgenic effects in mosquitofish (*Gambusia affinis*) from streams contaminated by municipal effluent in Guangzhou, China. *Aquat Toxicol* 132-133: 165-172.
- White, R.; Jobling, S.; Hoare, S.A.; Sumpter, J.P.; Parker, M.G. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.
- Williams, R.J.; Johnson, A.C.; Smith, J.L.; Jürgens, M.D.; Holtaus, K. 2001. Fate and behaviour of steroid oestrogens in aquatic systems. EA R&D Technical Report, pp 2-162.
- Wise, A.; O'Brien, K.; Woodruff, T. 2011. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environ Sci Technol* 45: 51-60.
- Wolf, J.C.; Dietrich, D.R.; Friederich, U.; Caunter, J.; Brown, A.R. 2004. Qualitative and quantitative histomorphologic assessment of fathead minnow *Pimephales promelas* gonads as an endpoint for evaluating endocrine-active compounds: a pilot methodology study. *Toxicol Pathol* 32: 600-612.
- Wong, T.T.; Ijiri, S.; Zohar, Y. 2006. Molecular biology of ovarian aromatase in sex reversal: complementary DNA and 5'-flanking region isolation and differential expression of ovarian aromatase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 74: 857-864.
- Wu, Z.; Zhang, Z.; Chen, S.; He, F.; Fu, G.; Liang, W. 2007. Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China. *Fresenius Environ Bull* 16: 227-234.
- Wunderlin, D.A.; Diaz, M.P.; Amé, M.V.; Pesce, S.F.; Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2001. Pattern Recognition Techniques for the Evaluation of Spatial and Temporal Variations in Water Quality. A Case Study: Suquia River Basin (Córdoba-Argentina). *Water Res* 35: 2881-2894.

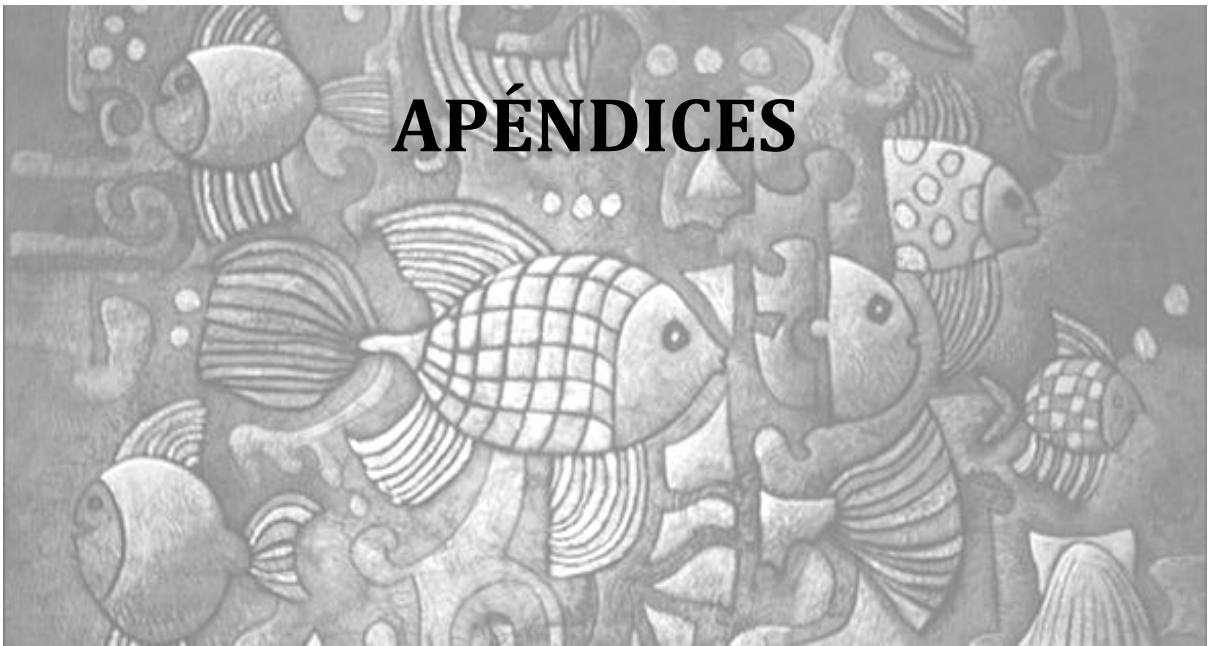
Y

- Yamazaki, F. 1972. Effects of methyltestosterone on the skin and the gonads of salmonids. *Gen Comp Endocrinol* 3: 741-750.
- Ying, G.G.; Kookana, R.S.; Ru, Y.J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int* 28: 545-551.
- Young, W.F.; Whitehouse, P.; Johnson, I.; Sorokin, N. 2004. Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters, EA R&D Technical Report P2-T04/1, Environment Agency, Bristol.

Z

- Zaroogian, G.; Gardner, G.; Horowitz, D.B.; Gutjahr-Gobell, R.; Haebler, R.; Mills, L. 2001. Effect of 17beta-estradiol, o,p'-DDT, octylphenol and p,p'-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat Toxicol* 54: 101-112.
- Zerulla, M.; Lange, R.; Steger-Hartmann, T.; Panter, G.; Hutchinson, T.; Dietrich, D.R. 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Lett* 131: 51-63.
- Zhang, D.; Trudeau, V.L. 2006. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144: 306-315.
- Zhang, X.; Hecker, M.; Park, J.W.; Tompsett, A.R.; Newsted, J.; Nakayama, K.; Jones, P.D.; Au, D.; Kong, R.; Wu, R.S.; Giesy, J.P. 2008. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka. *Aquat Toxicol* 88: 173-182.
- Zhang, X.; Li, Q.; Li, G.; Wang, Z.; Yan, C. 2009. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. *Mar Pollut Bull* 58: 1210-1216.
- Zhao, J.; Mak, P.; Tchoudakova, A.; Callard, G.; Chen, S. 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *Gen Comp Endocrinol* 123: 180-191.
- Zhao, C.; Fujinaga, R.; Yanai, A.; Kokubu, K.; Takeshita, Y.; Watanabe, Y.; Shinoda, K. 2008. Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain: a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 332: 381-391.
- Zhong, X.; Xu, Y.; Liang, Y.; Liao, T.; Wang, J. 2005. The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an in vivo model for endocrine disruption in freshwater teleosts: a full life-cycle test with diethylstilbestrol. *Aquat Toxicol* 71: 85-95.
- Zillioux, E.J.; Johnson, I.C.; Kiparissis, Y.; Metcalfe, C.D.; Wheat, J.V.; Ward, S.G.; Liu, H. 2001. The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17alpha-ethynylestradiol. *Environ Toxicol Chem* 20: 1968-1978.
- Zuo, Y.; Zhang, K.; Deng, Y. 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17alpha-ethynylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere* 63: 1583-1590.
- Zupanc, G.K.; Hensch, K.; Gage, F.H. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol* 488: 290-319.

APÉNDICES



*Environmental Toxicology and Chemistry in Latin America*IMPAIRMENTS IN AROMATASE EXPRESSION, REPRODUCTIVE BEHAVIOR, AND SPERM QUALITY OF MALE FISH EXPOSED TO 17 β -ESTRADIOLNOELIA F. GUYÓN,^{†‡} MARÍA A. ROGGIO,^{†‡} MARÍA V. AMÉ,^{*†§} ANDREA C. HUED,^{†‡} MARÍA E. VALDÉS,^{†‡} ||
LAURA C. GIOJALAS,^{‡#} DANIEL A. WUNDERLIN,[‡] || and MARÍA A. BISTONI[†][†]Cátedra de Diversidad Animal II, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas, y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina[‡]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina[§]Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina^{||}Departamento de Química Orgánica-ISIDSA-ICYTAC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina[#]Centro de Biología Celular y Molecular, Edificio de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

(Submitted 1 June 2011; Returned for Revision 11 July 2011; Accepted 6 September 2011)

Abstract—Growing evidence shows that environmental estrogen can reach levels that are high enough to exert adverse reproductive effects on wild fish populations. The authors report different parameters of male reproductive behavior, brain, and gonadal aromatase expression, as well as sperm quality in an internally fertilizing fish species (*Jenynsia multidentata*, Jenyns) exposed to environmentally relevant concentrations of 17 β -estradiol (E₂). Adult males were exposed to 0, 50, 100, and 250 ng/L E₂ over 28 d. The authors' findings demonstrate that E₂ exposure resulted in a very clear increase in brain aromatase transcript abundance at all assayed concentrations compared with control; however, no effects on gonadal aromatase expression were observed. Behavioral measures revealed increased sexual activity at 50 ng/L but not 100 or 250 ng/L E₂. In contrast to the molecular and behavioral responses, the condition factor, gonadosomatic index, and sperm quality were unaltered by E₂ exposure. The results from the present work suggest that E₂ affects some aspects of the reproductive biology of *J. multidentata*. These modifications in the reproductive biology caused by exposure to E₂ could potentially lead to long-term effects at population levels that may not always be immediately evident. To the best of the authors' knowledge, this is the first report on the combined effect of E₂ on aromatase expression, sexual behavior, and sperm parameters in fish. Environ. Toxicol. Chem. 2012;31:935–940. © 2012 SETAC

Keywords—17 β -Estradiol *Jenynsia multidentata* Aromatase expression Sexual behavior Sperm quality

INTRODUCTION

Over the last few years, increasing evidence has shown that wild populations of aquatic animals are being exposed to chemical compounds that can behave as hormone mimics and thus severely disrupt their reproductive physiology. One class of such endocrine disruptors is composed of environmental estrogens (either natural or synthetic), which bind to estrogen receptors and could induce biological changes affecting the animals' development and reproduction.

Estrogens have been detected in several aquatic environments, mainly in effluents from municipal wastewater treatment plants, paper mills, and feedlots [1,2]. Although levels of estrogens in effluents are low, ranging from <1 to 343 ng/L for 17 β -estradiol (E₂) [3,4], these levels are high enough to elicit adverse reproductive effects in fish [5–7].

Sex hormones, especially E₂, are key regulators in sexual differentiation, maturation, and reproduction and are also associated with the development of reproductive behavior in several fish species [8,9]. Estrogens are synthesized from androgens through the enzyme cytochrome P450 aromatase, a product of the *cyp19* gene [10]. Most tetrapods have a single copy of the *cyp19* gene, which is expressed in a variety of tissues such as ovary, testis, liver, kidney, placenta, skin, adipose, and nervous tissue [11]. In contrast, teleosts fish have two *cyp19*

variants (*Cyp19a1a* and *Cyp19a1b*), which are products of different gene loci. *Cyp19a1a*, commonly known as gonadal aromatase, is preferentially expressed in the ovary and plays an important role in sex differentiation and oocyte growth. *Cyp19a1b*, called brain aromatase, is constitutively expressed in the brain and is probably involved in the development of the central nervous system, survival, morphology, synaptogenesis, and sex behavior [12–14]. In bony fish, brain aromatase activity is nearly 100 to 1,000 times greater than in mammals [15], and males display higher activity than females in brain areas involved in the control of reproduction and sex behavior [16–18].

It has been reported that estrogen treatment generally causes upregulation of the *cyp19a1b* gene [5,12,13,19], which suggests that aromatase expression is not only a good biomarker to test estrogen exposure but also a key gene that could be related to abnormalities in the functioning of the reproductive axis and consequently to sex behavior.

Because behavior is the physical manifestation of integrated physiological responses of an animal to its environment, alterations in sexual activity have also been suggested as biomarkers of water pollution. Several studies have investigated the effects of exogenous estrogen administration on the reproductive behavior of fish and have generally shown a decline in the sexual activity of exposed males [20–22]. Nevertheless, little is known about the possible regulatory effects of aromatase on the sex behavior of fish, and few studies have looked at connections between brain aromatase and male reproductive behavior in teleosts [23].

It has also been shown that exposure to estrogenic compounds affects sperm viability and motility [6,24]; therefore,

* To whom correspondence may be addressed
(vame@fcq.unc.edu.ar).

Published online 2 March 2012 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

these parameters have been suggested as biomarkers of water pollution [25,26].

For this reason, we evaluated the effects of E₂ on aromatase expression, sex behavior, and sperm features in fish exposed to environmentally realistic levels of E₂. We used the one-sided livebearing fish *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) as a laboratory model. This species presents a wide neotropical distribution [27], and has been used as an excellent model in both laboratory and field studies [28–31], mainly because of its ability to adapt to a wide variety of environments, including poor water quality conditions [32]. This species shows sexual dimorphism: males are smaller than females and develop a modification of the anal fin, called the gonopodium, which is used for sperm transference to the female during copulation [33]. The reproductive behavior of *J. multidentata* involves internal fertilization and coercion: males approach females from behind and try to thrust their gonopodium at the female genital pore [34]. These characteristics make *J. multidentata* an excellent model to study the effects of environmental pollutants under laboratory conditions.

The main goals of the present study were to assess the effects of environmentally relevant concentrations of E₂ on *cyp19a1* gene expression, that is, male sexual behavior and sperm viability and motility, and to establish any possible connection between brain *cyp19a1b* expression and changes in male reproductive behavior. To our knowledge, no previous studies have reported on this issue, including all previously described effects on a single fish species after exposure to environmentally relevant concentrations of E₂.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Ultrapure water (<5 µg/L TOC) was obtained from a purification system (Arium 61316-RO plus Arium 611 UV). The 17β-estradiol of 98% purity was obtained from Sigma-Aldrich. An E₂ stock solution (1 mg/ml) was prepared by dissolving the reagent in acetone (Merck Chemist) and stored at –20°C until use. An aliquot of this solution was used to prepare the E₂ working solution by diluting it with ultrapure water.

Determination of E₂ in water

The concentration of E₂ in water solutions was verified by immunochemistry with electrochemiluminescence detection using a Cobas 4000 e411 analyzer (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Recovery percentages were evaluated from spiked aquarium water samples with 25 and 100 ng/L E₂. The recovery percentages obtained for both concentrations were 90 ± 4.7% and 92 ± 4.6%, respectively. The calibration procedure was performed with standard solutions of E₂ covering a range of 5 to 4,000 ng/L, affording a limit of quantification of 7.5 ng/L. Samples were collected before and after water replacement in 100-ml glass bottles and stored at 4°C until analysis.

Test organisms

A total of 80 adult males of *J. multidentata* Jenyns (mean standard length 28.80 ± 2.57 mm and mean body weight 0.52 ± 0.15 g) were collected from an unpolluted site (Yuspe River, Córdoba, Argentina) [32,35] using a backpack electro-fisher, during the reproductive season (February 2010). The fish were transported to the laboratory in water tanks (20 L) and randomly separated and maintained in 5-L aerated glass aquaria (one fish per liter) containing aquarium water. The fish were

maintained for 30 d at 21°C ± 1°C under a constant 12:12-h light:dark photoperiod and fed twice a day ad libitum with commercial fish pellets (TetraMin).

Exposure conditions

Five adult males were exposed together in a glass aquarium containing 5 L of water supplied with 0 (control group), 50, 100, or 250 ng/L E₂, over 28 d. Although the concentrations used were relatively high, they correspond to environmentally realistic levels of E₂ for Argentinean streams [36]. Four replicates were made for each treatment. Test solutions were totally renewed every second day throughout the exposure experiment.

Behavioral test

At the end of the experimental period (28 d), each male was transferred to a 3-L glass aquarium and paired with an unexposed female to record sexual behavior. At 10 min after female introduction, sexual activity was recorded for 20 min using a video recorder (Sony CCD TR818) and by direct observations. Based on the normal reproductive behavior described by Bisazza et al. [34], the following variables were estimated: persecution time (PT), period of time (in seconds) that a male spends in persecuting a female to make contact with the female gonopore; number of persecutions (P), number of times that a male persecutes a female in attempting to make contact with female gonopore; copulatory attempts (CA), number of times that a male enlarges its gonopodium to make contact with female gonopore; and number of copulations (C), number of times that a male makes direct contact through its gonopodium with the female gonopore.

From these variables, the present study proposes the following relations to evaluate the effectiveness of male behavior: CA:PT, CA:P, C:PT, C:P, and C:CA. The latter parameter was used as an estimation of mating success [34]. These relationships give an idea of the effective ability of a male to copulate after a persecution or a copulation attempt [31].

When none of the reproductive behaviors defined above occurred, the female was removed and replaced with another one. A maximum of four replacements was allowed to assess male behavior. The same pool of 10 females was used for the entire behavioral test.

Sperm parameters

Semen collection. For semen collection, males were anesthetized in a water solution of MS-222 (tricaine methanesulfonate; Sigma-Aldrich). The gonopodium was swung forward and introduced into a capillary tube. Gentle pressure was applied to the sides of the abdomen using a cotton tip. This procedure was repeated five times for each fish to increase the amount of collected spermatozoa. Sperm was removed at the base of the gonopodium and diluted in 80 µl of HAMF-10 culture medium at pH 7.4 (Invitrogen). Sperm separation was achieved by mixing the suspension with a micropipette.

Sperm dynamic parameters. Immediately after semen extraction, a 12-µl aliquot of diluted sperm solution was placed on a glass slide. The sample was recorded at ×10 magnification over 4 min, and the microscope field was changed at random every 10 s. Sperm analysis was carried out with a videomicroscopy system consisting of a phase microscope (Olympus CX41) and a digital camera (ICAM 1500; Labomed). In each sample 150 cells were tracked. Each track was followed for 1 s divided into seven steps. The sperm dynamic parameters were

analyzed with two software packages: the ImageJ (NIH) plugin MTrackJ (Ver 191.1.0, Eric Meijering; www.imagejscience.org/meijering/software/mtrackj/) to set the X and Y coordinates of each track, and the Spermtrack IV (Centre for Cell and Molecular Biology, University of Córdoba) to calculate the sperm kinetic parameters defined as follows: straight line velocity (in $\mu\text{m/s}$); straight distance traveled by the spermatozoon from the beginning to the end of its track over time; curvilinear velocity (in $\mu\text{m/s}$), length of the spermatozoon track over measurement time; and linearity, the quotient between straight line velocity and curvilinear velocity, which indicates the grade of straightness of a track (expressed in percentage), where values near 100% represent a linear movement and values near 0% represent a more erratic path.

Viability. A total of 15 min after sample collection, sperm viability was measured using the Eosin-Y staining test, which crosses the head membrane of dead cells, which in turn become pink in color (whereas live cells remain unstained) [37]. Ten microliters of the sample was mixed on a microscope slide with 1 μl of Eosin-Y stain (0.5% w/v) for 1 to 2 min, and then the sample was examined under an optical microscope at $\times 1,000$. The percentage of live spermatozoa (either motile or immotile) was determined for each male.

After semen collection, fish were measured, weighed, and sacrificed by breaking the spinal cord. Total weight and standard length were registered to determine the condition factor for each fish. Gonads were excised and then weighed to calculate the gonadosomatic index.

The cyp19a1a and cyp19a1b gene expression in gonads and brain

For *cyp19a1* mRNA quantification, brain and gonads were snap-frozen in liquid nitrogen and stored in RNAlater (QIAGEN) at -80°C until analysis. Total RNA was extracted from brain and gonadal tissue by the guanidine thiocyanate-phenol chloroform extraction method in accordance with Chomczynski and Sacchi [38]. The quantity and quality of RNA were evaluated both by spectrophotometry and by elution of 2 μg RNA through nondenaturing agarose gel electrophoresis, using ethidium bromide as the staining agent. Nonspecific reverse transcription was performed with an Oligo (dT)₁₅ primer (Biodynamics SRL [28]). Quantitative polymerase chain reaction was performed with a Bio-Rad iQ cycler and was used to amplify and measure the transcript abundance of *cyp19a1a* in testis and *cyp19a1b* in brain. We have previously characterized the partial cDNA sequences for *cyp19a1a* and *cyp19a1b* of *J. multidentata* (Guyón et al., unpublished data, University of Córdoba, Córdoba, Argentina; GenBank accession numbers are FJ169945 and EU851873, respectively) and have designed specific *J. multidentata* primers for real-time polymerase chain reaction (*cyp19a1a* forward: 5'CAAAGGGCACAAATATCATCTTGA3' reverse: 5'CGGGCTGGTGGAAAGAACTC3'; *cyp19a1b* forward: 5'GAAACATCATTAACAAAAGTGAAGAAACATCATTAACAAAAGTGAAGAACTG3' reverse: 5'GAGAGCTCCCATGGTTCTG3'). The primers were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems), and primers were obtained from Sigma-Aldrich. The use of *J. multidentata* β -actin [28] as a housekeeping gene was tested. The β -Actin expression was found to be a useful internal standard for normalization of the *cyp19* data, mainly because changes in C_t for the β -actin transcript abundance along the assay were not statistically different throughout for the concentrations studied. Relative gene expression was analyzed by using the standard curve method.

Statistics

Statistical analyses were carried out using the Infostat Software Package [39]. All values are expressed as mean \pm standard deviation. Normal distribution for data was analyzed by the Shapiro-Wilk test, and the Levene test was used to check the homogeneity of variance. Normal variables were analyzed through one-way analysis of variance to evaluate differences between treatments followed by the Di Rienzo, Guzmán, and Casanoves posttest. When necessary, data were log transformed to fulfill heteroscedasticity and normality assumptions. When data were not normally distributed, even after transformation, data were subjected to nonparametric statistical analysis on ranks (Kruskal-Wallis) followed by Dunn's posttest. Significance was accepted at $p < 0.05$ for all comparisons.

RESULTS

E₂ water contents and mortality

The stability of E₂ in solution was independent of the concentration tested, showing E₂ residual levels of $44.7 \pm 6.2\%$ after 48 h. Even when decay in E₂ concentration was measured, the nominal values are used throughout the paper. Only 2 of 20 males died in the control group during the 28 d of exposure. In the 50-, 100-, and 250-ng E₂/L treatment groups, two, three, and one male died, respectively. Consequently, the mortality observed was assumed to not be related to E₂ treatment.

Behavioral test

Control males of *J. multidentata* exhibited the same sexual behavior pattern described by Bisazza et al. [34]. However, some reproductive behavioral parameters were affected by estrogen exposure. Significant changes were observed only at the lowest concentration tested (50 ng/L E₂), at which males displayed increased behavior toward a stimulus female. At higher concentrations (100 and 250 ng/L), behavior did not differ significantly from that of control individuals (Table 1).

It was noticeable that all the animals exposed to 50 ng/L began female approaches immediately after the first female was introduced into the tank. This situation was not observed in the other treatments (including controls), where it was necessary to replace the female at least once for approximately 40% of males to cause male stimulation. Moreover, 50% of the males exposed to 50 ng/L E₂ showed sustained copulations, defined as direct contact through the gonopodium with the female gonopore in a prolonged way for at least 5 s, whereas in the other treatments sustained copulation was only observed for 25% of males.

Sperm parameters

The exposure to all concentrations of E₂ did not affect sperm viability and motility (Table 2). However, a 1.88-fold increase in the percentage of dead sperm was observed at the highest concentration (250 ng/L) in comparison with the control group.

Condition factor and gonadosomatic index

After the experimental time no significant differences for either the condition factor or the gonadosomatic index were observed between treatments ($p > 0.05$, data not shown).

Effects of E₂ on cyp19a1 genes

Expression of the *cyp19a1b* gene was significantly enhanced after chronic exposure (28 d) to E₂, even at the lowest concentration assayed (50 ng/L) (Fig. 1A). Although no significant

Table 1. Reproductive behavioral parameters registered in *Jenynsia multidentata* males exposed to different concentrations of 17 β -estradiol (E₂) over 28 d^a

Reproductive variable	Control	50 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
P:PT	0.40 ± 0.19 (A)	0.37 ± 0.17 (A)	0.33 ± 0.04 (A)	0.38 ± 0.11 (A)
CA:PT	0.56 ± 0.10 (A)	2.13 ± 1.14 (B)	0.31 ± 0.19 (A)	0.58 ± 0.15 (A)
C:PT	0.14 ± 0.06 (A)	0.75 ± 0.37 (B)	0.06 ± 0.04 (A)	0.08 ± 0.05 (A)
CA:P	1.60 ± 0.53 (A)	4.79 ± 1.12 (B)	1.73 ± 0.52 (A)	1.66 ± 0.74 (A)
C:P	0.37 ± 0.14 (A)	1.66 ± 0.89 (B)	0.30 ± 0.23 (A)	0.21 ± 0.09 (A)
C:CA	0.24 ± 0.06 (A)	0.30 ± 0.14 (A)	0.16 ± 0.07 (A)	0.16 ± 0.11 (A)

^aThe capital letters in parentheses indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

PT = persecution time; P = number of persecutions; CA = copulatory attempts; C = copulation.

differences were found among treatments, a trend toward increased *cyp19a1b* transcript abundance in a concentration-dependent manner throughout all E₂-exposed fish was observed. Expression of the *cyp19a1b* gene showed 3-, 3.8-, and 5-fold inductions with respect to the control group in individuals exposed to 50, 100, and 250 ng/L E₂, respectively. Conversely, no effect on *cyp19a1a* gene expression was observed (Fig. 1B).

DISCUSSION

The present study reveals that exposure to environmentally relevant concentrations of E₂ over 28 d causes alterations in the reproductive biology of *J. multidentata*. To our knowledge, this is the first study integrating aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality in internally fertilizing fish exposed to realistic doses of E₂.

Our findings demonstrate that exposure to E₂ resulted in a very clear enhancement of *cyp19a1b* expression at all concentrations assayed. It is interesting to note that data variability for *cyp19a1b* increased when fish were exposed to E₂, probably involving differences in the response to E₂ among individuals. Conversely, no clear influence of E₂ on *cyp19a1a* transcription could be observed in the testis of *J. multidentata*. The induction of brain aromatase expression by estrogens has also been shown in *Pimephales promelas* after 14 d of exposure to a similar range of E₂ (32–320 ng/L) [5]. These results are in agreement with previous studies in which exposure to estrogenic compounds caused upregulation of *cyp19a1b* but failed to modulate *cyp19a1a* expression [13,19]. This differential responsiveness of *cyp19s* to estrogenic compounds is consistent with the fact that estrogen-responsive elements were identified in the *cyp19a1b* promoter region of several fish species [40,41] but not in *cyp19a1a*, suggesting that estrogen receptors are involved in the E₂ regulation of *cyp19a1b* transcription [12].

Aromatase activity in the brain is concentrated mainly in forebrain areas, which are known to control reproduction and sexual behavior [18,42,43]. However, a detailed description of the role of the aromatization process in the regulation of fish sexual behavior is still not completely understood [44,45]. Only the study carried out by Hallgren et al. [46] related some effects of an aromatase inhibitor on fish sexual behavior. These authors

found in *Poecilia reticulata* that two male sexual activities (the sigmoid display and the gonopodium swing) were reduced when aromatase was blocked, suggesting that brain aromatase is necessary for normal male sexual displays.

Several studies have documented the adverse effects of exogenous administration of chemicals with estrogenic activity on fish reproductive behavior, showing a generalized decline in male reproductive performance and a behavioral demasculinization [20–22,47]. In this context, our results show that at the higher levels of E₂ tested (100 and 250 ng/L), male reproductive performance was not significantly affected. Conversely, exposure to the lowest concentration of E₂ (50 ng/L) exacerbated male sexual activity. This variability in the response of reproductive behavior to exogenous estrogens has been noted in other investigations using different species of fish [47,48]. For instance, Schoenfuss et al. [48] reported that male *P. promelas* exposed to a low concentration of the xenoestrogen 4*n*-nonylphenol exhibited an apparently beneficial effect on their nest holding ability (an excitatory response), whereas males exposed to high nonylphenol concentrations suffered adverse consequences. These authors suggest that male fish are primed for reproductive performance by pheromones secreted by the females immediately before and after ovulation [49] and that low concentrations of nonylphenol could act as an exogenous primer. In the present study, all fish exposed to the lowest concentration of E₂ started sexual activity immediately after the first contact with the female. According to the proposal of Schoenfuss et al. [48], it is likely that the lowest concentration of estrogen (50 ng/L) could act as an exogenous primer that stimulates male sexual behavior in *J. multidentata*.

Melo and Ramsdell [17] reported a sexual dimorphism in the localization of brain aromatase activity, in accordance with the suggested role of aromatase in the regulation of male or female sex-specific behaviors. They also demonstrated that male *Oryzias latipes* treated with E₂ showed feminization of the male brain phenotype, which included elevation in total levels of aromatase activity and increased activity in brain areas in which females usually show higher levels. Our results show that estrogen treatments strongly induced expression of the *cyp19a1b* gene, and even though differences were not significant among treatments, a trend toward increased aromatase

Table 2. Sperm parameters measured in *Jenynsia multidentata* males exposed to different concentrations of 17 β -estradiol (E₂) over 28 d

Sperm parameter		Control	50 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
Motility	VSL	110.10 ± 11.03	110.6 ± 12.12	111.12 ± 3.42	116.33 ± 32.29
	VCL	112.89 ± 12.29	114.56 ± 12.43	114.60 ± 1.60	118.43 ± 32.85
	LIN	98 ± 2	97 ± 2	97 ± 3	98 ± 1
Viability	Live motile sperm	79.24 ± 7.02	78.26 ± 10.12	69.94 ± 22.96	74.29 ± 10.08
	Live immotile sperm	16.04 ± 5.79	14.71 ± 7.23	24.53 ± 18.39	18.69 ± 10.91
	Dead sperm	4.48 ± 1.94	5.85 ± 4.85	5.58 ± 4.18	8.42 ± 5.07

VSL = straight line velocity; VCL = curvilinear velocity; LIN = linearity.

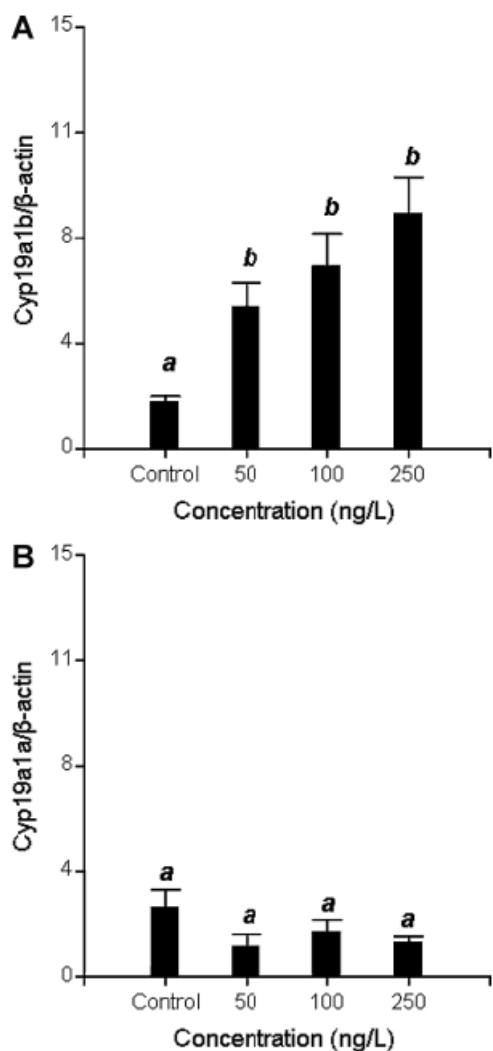


Fig. 1. The *cyp19a1* gene expression relative to β -actin in *Jenynsia multidentata* males exposed to different concentrations of 17 β -estradiol by quantitative real-time polymerase chain reaction. (A) *Cyp19a1b* expression in brain. (B) *Cyp19a1a* expression in testis. Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

expression in a concentration-dependent manner was observed. We expected that the higher aromatase levels observed at higher E₂ concentrations would probably cause male brain feminization of aromatase distribution, which in turn would cause a reduction in male sexual behavior. However, we did not find differences in sexual activity among control fish and fish exposed to 100 and 250 ng/L E₂. It might be that higher concentrations or longer exposures times than those used in the present study would give results supporting increased aromatase expression as a plausible reason for the reduction of male sexual behavior observed by other authors.

In contrast to the molecular and behavioral responses, estrogen exposure did not alter the condition factor, the gonadosomatic index, or the sperm quality of exposed individuals. Sperm motility was not affected by estrogen exposure, in agreement with Schoenfuss et al. [6], who showed that exposure to 50 ng/L E₂ over 21 d did not affect the mean progressive velocity of *P. promelas* spermatozoa. Moreover, when males of *Oncorhynchus mykiss* were exposed to lower E₂ concentrations (0.5–2.5 ng/L) for 35 d, no changes were seen in the rate of sperm motility and swimming velocity [50].

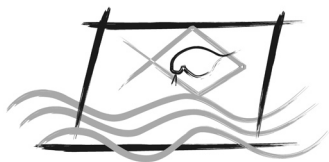
In summary, the remarkable changes observed in *cyp19a1b* gene expression and the behavioral alterations induced by estrogen suggest that these parameters are sensitive and potentially useful biomarkers for exposure to environmentally relevant estrogenic compounds. Although in the present study sperm quality seemed to be unaffected by E₂, longer or full-life exposure may reverse this result. Our results suggest that the E₂ influence on the male reproductive biology of *J. multidentata* could potentially lead to long-term effects on wild populations that may not always be immediately evident.

Acknowledgement—This work was supported by grants from the National Research Council (CONICET-PIP), the Science and Technology Secretariat of the Province of Córdoba (SECyT), and the National Agency of Scientific and Technological Promotion (FONCyT). The present work is part of the PhD thesis of N.F. Guyón and M.A. Roggio, who gratefully acknowledge fellowships from CONICET. We thank G.M. Somoza for his critical comments on the manuscript, J.M. Kembro for language assistance, and H.A. Guidobaldi for helpful software assistance.

REFERENCES

- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.
- Soto AM, Calabro JM, Precht NV, Yau AY, Orlando EF, Daxenberger A, Kolok AS, Guillette LJ Jr, le Bizet B, Lange IG, Sonnenschein C. 2004. Androgenic and estrogenic activity in waterbodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environ Health Perspect* 112:346–352.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32: 1549–1558.
- Rodgers-Gray TP, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ Sci Technol* 34:1521–1528.
- Halm S, Pounds N, Maddix S, Rand-Weaver M, Sumpter JP, Hutchinson TH, Tyler CR. 2002. Exposure to exogenous 17 β -oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 60:285–299.
- Schoenfuss HL, Levitt JT, Van der Kraak G, Sorensen PW. 2002. Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ Toxicol Chem* 21:2185–2190.
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8897–8901.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:352–366.
- Piferrer F, Guiguen Y. 2008. Fish gonadogenesis. Part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Rev Fish Sci* 16: 35–55.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342–355.
- Simpson ER, Bulun SE, Nichols JE, Zhao Y. 1996. Estrogen biosynthesis in adipose tissue: Regulation by paracrine and autocrine mechanisms. *J Endocrinol* 150:51–57.
- Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142:740–750.
- Kishida M, McLellan M, Miranda JA, Callard GV. 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Phys B* 129:261–268.
- Strobl-Mazzulla PH, Nunez A, Pellegrini E, Gueguen MM, Kah O, Somoza GM. 2010. Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain Behav Evol* 76:20–31.

15. Callard GV, Drygas M, Gelinas D. 1993. Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *J Steroid Biochem* 44: 541–547.
16. Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21:8943–8955.
17. Melo AC, Ramsdell JS. 2001. Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: Induction of a female phenotype by estradiol. *Environ Health Perspect* 109:257–264.
18. Strobl-Mazzulla PH, Moncaut NP, Lopez GC, Miranda LA, Canario AV, Somoza GM. 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen Comp Endocrinol* 143:21–32.
19. Kazeto Y, Place AR, Trant JM. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol* 69:25–34.
20. Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H, Mayer I, Dimberg K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17beta-estradiol. *Aquat Toxicol* 53:139–152.
21. Doyle CJ, Lim RP. 2005. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17[beta]-estradiol. *Ecotox Environ Safe* 61:392–397.
22. Oshima Y, Kang IJ, Kobayashi M, Nakayama K, Imada N, Honjo T. 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17beta-estradiol. *Chemosphere* 50:429–436.
23. Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RI. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 155:31–62.
24. Lahnsteiner F, Berger B, Kletzl M, Weismann T. 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquat Toxicol* 75:213–224.
25. Billard R, Cosson MP. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool* 261:122–131.
26. Kime DE, Nash JP. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Sci Total Environ* 233:123–129.
27. Ghedotti MJ. 1998. Phylogeny and classification of the Anablepidae (Cyprinodontiformes: Teleostei). In Malabarba L, Reis R, Vari R, Lucena Z, Lucena C, eds, *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, N edition. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, pp 561–582.
28. Ame MV, Baroni MV, Galanti LN, Bocco JL, Wunderlin DA. 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74:1179–1186.
29. Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:199–205.
30. Cazenave J, Nores ML, Miceli M, Diaz MP, Wunderlin DA, Bistoni MA. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res* 42:1299–1307.
31. Hued AC, Oberhofer SS, Bistoni MA. 2011. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters the normal gill and liver histology and affects the male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Contam Toxicol*. DOI: 10.1007/s00244-011-9686-7.
32. Hued AC, Bistoni MA. 2005. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543:279–298.
33. Malabarba L, Reis R, Vari R, Lucena Z, Lucena C. 1998. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
34. Bisazza A, Manfredi S, Pilaastro A. 2000. Sexual competition, coercive mating and mate assessment in the one-sided livebearer, *Jenynsia multidentata*: Are they predictive of sexual dimorphism? *Ethology* 106: 961–978.
35. Wunderlin DA, Diaz MP, Amé MV, Pesce SF, Hued AC, Bistoni MA. 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia River Basin (Córdoba-Argentina). *Water Res* 35:2881–2894.
36. Valdes E, Marino D, Somoza GM, Ronco A, Wunderlin D, Carriquiriborde P. 2010. Metodología de análisis de esteroides de relevancia ambiental en efluentes cloacales y sus cuerpos de agua receptores por HPLC-MS/MS. *Proceedings, III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC)*, Santa Fe, Argentina, May 12, p 128.
37. World Health Organization. 1999. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, 4th ed. Published on behalf of the World Health Organization, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
38. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
39. InfoStat. 2002. Grupo InfoStat Profesional. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
40. Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem* 79:305–314.
41. Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, Zohar Y, Trant JM. 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 288:503–508.
42. Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485:304–320.
43. Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31:295–319.
44. Blazquez M, Somoza GM. 2010. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 166:470–477.
45. Vizziano-Cantonnet D, Anglade I, Pellegrini E, Gueguen MM, Fostier A, Guiguen O, Kah O. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *Gen Comp Endocrinol* 170:346–355.
46. Hallgren SL, Linderöth M, Olsen KH. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *Gen Comp Endocrinol* 147:323–328.
47. Lavelle C, Sorensen PW. 2011. Behavioral responses of adult male and female fathead minnows to a model estrogenic effluent and its effects on exposure regime and reproductive success. *Aquat Toxicol* 101:521–528.
48. Schoenfuss HL, Bartell SE, Bistodeau TB, Cediel RA, Grove KJ, Zintek L, Lee KE, Barber LB. 2008. Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. *Aquat Toxicol* 86:91–98.
49. Sorensen PW, Stacey NE. 1987. 17β,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a bisexual priming pheromone in goldfish. *Am Zool* 27:412.
50. Lahnsteiner F, Berger B, Kletzl M, Weismann T. 2006. Effect of 17beta-estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquat Toxicol* 79:124–131.



ECOTOX - BRASIL

J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 7, n. 1, 2012, 97-104
doi: 10.5132/jbse.2012.01.014

JBSE

Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality

N.F. GUYÓN¹, M.A. BISTONI¹, D.A. WUNDERLIN² & M.V. AMÉ^{3*}

¹Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Cátedra de Diversidad Animal II, Universidad Nacional de Córdoba, Avenida Vélez Sársfield 299, 5000 Córdoba, Argentina.

²Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Orgánica-ISIDSA-ICYTAC, Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Haya de la Torre esquina Medina Allende, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

³Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Haya de la Torre esquina Medina Allende, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

(Received January 31, 2011; Accept September 03, 2011)

Abstract

Cytochrome P450 aromatase is the steroidogenic enzyme that catalyzes the conversion of androgens to estrogens. Teleosts express two structurally and functionally different P450 aromatase isoforms, termed Cytochrome 19a1a and Cytochrome 19a1b. The first is preferentially expressed in ovary while the second is constitutively expressed in brain. The aim of the present study was to evaluate changes in *cyp19a1b* expression in brain of *Jenynsia multidentata* collected in Suquía river (Córdoba, Argentina) in order to assess if this biological response reflects changes in water quality. For this purpose we first identified *cyp19a1b* parcial cDNA sequence and adjusted the method to quantify mRNA expression by qRT-PCR (quantitative RT-PCR). Then, water and fish samples were collected in five monitoring stations located along a pollution gradient in Suquía river. The qRT-PCR analysis of female brains reveals that *cyp19a1b* mRNA levels change as water pollution does, showing the highest levels at both unpolluted and recovered areas, with suppression as pollution increases. Even when *cyp19a1b* expression in *J. multidentata* will need further studies, the results here presented indicate that this biological response appear as a promising biomarker of water pollution that may also point out the probable presence of endocrine disruptors.

Keywords: Aromatase; Fish; Real time RT-PCR; Water pollution.

La inhibición de la expresión de Citocromo P450 aromatasa en cerebro de *Jenynsia multidentata* refleja cambios en la calidad de agua

Resumen

La enzima Citocromo P450 aromatasa cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos. En teleósteos se expresan dos isoformas (Citocromo 19a1a y Citocromo 19a1b) que difieren en su estructura y funcionalidad. La *cyp19a1a* se expresa preferentemente en ovario mientras que *cyp19a1b* se encuentra en cerebro. El objetivo del presente trabajo fue evaluar cambios en la expresión de *cyp19a1b* en cerebro de *Jenynsia multidentata* recolectadas en el río Suquía (Córdoba, Argentina) para evaluar si esta respuesta biológica refleja cambios en la calidad de agua. Con este fin se identificó la secuencia parcial del cADN de *cyp19a1b* y se ajustó un método para cuantificar la expresión de mRNA por qRT-PCR (RT-PCR cuantitativa). Posteriormente se recolectaron muestras de agua y peces en cinco estaciones de monitoreo con distinto grado de contaminación en el río Suquía. El análisis en la expresión de *cyp19a1b* mRNA en cerebros de hembras mostró los mayores niveles de expresión en áreas de baja contaminación e inhibición en los sitios con mayor contaminación. Si bien se necesitan aún estudios complementarios, los resultados encontrados son promisorios en el uso de expresión de *cyp19a1b* en *J. multidentata* como biomarcador de contaminación acuática que podría indicar la presencia de disruptores endócrinos.

Keywords: Aromatasa; *Jenynsia multidentata*; RT-PCR en tiempo real; Contaminación acuática.

* Author for correspondence: M. V. Amé, e-mail: vame@fcq.unc.edu.ar

INTRODUCTION

Cytochrome P450 aromatase is the steroidogenic enzyme that catalyzes the conversion of androgens (C19) to estrogens (C18). The enzymatic complex consists of the Cytochrome P450 aromatase, product of the *cyp19* gene, and the flavoprotein NADPH-cytochrome P450 reductase (Simpson *et al.*, 1994).

Euteleosts express two structurally and functionally different P450 aromatase isoforms, termed Cyp19a1a and Cyp19a1b. The first is preferentially expressed in ovary, playing important roles in sex-differentiation and oocyte growth, while the second is constitutively expressed in brain and is probably involved in the development of central nervous system, survival, morphology, synaptogenesis, neurogenesis, neuroplasticity, neuroprotection, sex differentiation and sexual and aggressive behavior (Kishida *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2001; Trant *et al.*, 2001; Gracia-Segura *et al.*, 2003; Blázquez *et al.*, 2008; Clotfelter & Rodriguez, 2010; Diotel *et al.*, 2010).

Since aromatase genes are potential targets for endocrine disruption (reviewed in Cheshenko *et al.*, 2008) considerable research effort has been done to detect changes in *cyp19* expression or Cyp19 activity, which could indicate the presence of endocrine disrupting compounds (EDCs) in the environment (Noaksson *et al.*, 2001, 2003a, 2003b; Orlando *et al.*, 2002; Greytak *et al.*, 2005).

Endocrine disruption in fish is strongly linked to natural or man-made chemicals that enter rivers and streams. Sewage treatment works, for example, release a complex mixture of natural and synthetic chemicals (domestic, industrial and/or agricultural waste) into the aquatic environment (Jobling *et al.*, 2004). As urban areas tend to increase, the concentrations of these compounds in rivers is also likely to increase.

Research on endocrine disruption in wild freshwater fishes has been limited to a small number of northern hemisphere fish species of commercial importance. Among neotropical fishes, *cyp19* genes were described for only two species *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005), and eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Orlando *et al.*, 2002).

Jenynsia multidentata (Anablepidae, Cyprinodontiformes) is a native fish inhabiting the neotropical region, from the Río Negro Province (Argentina) to the city of Río de Janeiro (Brazil) (Malabarba *et al.*, 1998). It is frequently used for experimental studies (Cazenave *et al.*, 2008; Pesce *et al.*, 2008; Amé *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2009a, 2009b). However, the biomarkers investigated in *J. multidentata* are considered as non-specific ones, since several pollutants can modify directly or indirectly their responses (Monserrat *et al.*, 2007).

The aim of the present study was to assess changes in *cyp19a1b* expression in the brain of *J. multidentata* in an urban polluted river. For this purpose we identified *cyp19a1b* parcial cDNA sequence and adjusted the method to quantify mRNA expression. We decided to evaluate the *cyp19a1b* expression considering previous reports showing that aromatase activity in brain is several times higher than in ovary and that *cyp19a1b*

could be used as sensitive exposure biomarker (González & Piferrer, 2002).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of cyp19a1b partial cDNA sequence and RT-qPCR

Adult females of *J. multidentata* were collected from an unpolluted site (San Antonio River, Córdoba, Argentina) (Wunderlin *et al.*, 2001; Hued & Bistoni, 2005) using a backpack electrofisher. Fish were immediately transported to the laboratory in water tanks (20 L), acclimatized for two weeks at 21±1°C, with a photoperiod of 12-h light: 12-h dark. They were kept in a 15 L aerated glass aquarium, containing aquarium water (Best *et al.*, 2002).

After dissection, brain was quickly removed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored in RNAlater (QIAGEN) at -80°C until analysis. Total RNA from a ten fish pool was extracted by the guanidine thiocyanate-phenol chloroform extraction method according to Chomczynski and Sacchi (1987). Non-specific reverse transcription was performed on 5 µg RNA using a first strand complementary DNA synthesis method (Amé *et al.*, 2009).

The resulting cDNA was used as template to amplify *cyp19a1b* using a polymerase chain reaction (PCR) strategy. Degenerate primers were designed based on conserved nucleotide sequences with high interspecies homology of fish *cyp19a1b* cDNAs available in GenBank (*Cyp19a1b* Forward 5'AAYTAYTTYGARACNTGGCA3', Reverse 5'NCCRCANCCRAANGGYTGRAA3'). PCR was performed and the expected 660bp amplicon was cloned into pCR 2.1 plasmidic vectors (Invitrogen) and transformed in *E. coli* competent cells. The plasmidic cDNA was sequenced in Macrogen Inc. (Korea), and submitted to Blast for comparison with previously reported teleostean *cyp19a1b* cDNA sequences accessible in GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). From the partial cDNA sequence obtained, new specific and non-degenerate primers for real-time RT-PCR were designed (*Cyp19a1b* Forward 5'GAAACATCATTAACAAACTGAGAACTG3', Reverse 5'GAGAGCTCCCCATGGTTCTG3') with Primer Express Software (Applied Biosystems).

β -actin was used as housekeeping gene. Primers for real-time PCR (β -actin Forward 5'-CCA AAG CCA ACA GGG AGA AGA TGA-3'; Reverse 5'-TCG GCT GTG GTG GTG AAG GAG T-3') were designed based on *J. multidentata* β -actin sequence previously described (Genbank accession numbers EF362747, Amé *et al.*, 2009). Quantitative PCR was used to amplify and measure the transcript abundance of *cyp19a1b* in brain. Real-time PCR was performed on a Bio-Rad iQ cycler with 1 µL of a 1/10 dilution of cDNA (25 ng reverse-transcribed total RNA), the SYBR Green PCR Master Mix spiked with fluorescein 10 nM (Applied Biosystems) and 7.5 pmol primers in a final volume of 20 µL. Cycling conditions were as follows: 1 x 95°C, 15 min; 45

x [94°C, 15 sec, 61.2°C, 30 sec and 72°C, 30 sec]. Real-time PCR reactions were run in triplicate for each cDNA sample and melting curves were carried out to monitor the quality of amplicons and reactions. Amplifications were also performed on 25 ng of non-retrotranscribed RNA as negative control to check absence of genomic contaminants. To estimate efficiencies, a standard curve was generated for each primer pair based on known quantities of cDNA (10-fold serial dilutions corresponding to cDNA transcribed from 100 to 0.01 ng of total RNA). The relative expression levels (fold change) of the gene, calculated using the relative expression software tool (REST[®]), were based on mean threshold cycle differences between each site and the sampling station located before Córdoba city (Pfaffl *et al.*, 2002).

Cyp19a1b measurement in wild fish

In order to assess the changes in *cyp19a1b* expression associated to urban pollution, we used adult female brains of *J. multidentata* collected in July 2006 (non-reproductive season) at different sampling stations of Suquia River basin (Fig. 1). Sampling stations were selected according to previous studies on water quality and fish assemblages, reporting high anthropogenic impact in locations downstream from the sewage discharge of Córdoba City (Argentina) (Pesce & Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Hued & Bistoni, 2005). Thus, five sites with different pollution levels ranging from quasi pristine to heavily polluted along Suquia River were sampled. La Calera (LC) is located 30 km upstream from Córdoba City (considered as quasi pristine site); Villa Corazón de María (CM) is 15 km downstream from the Córdoba Waste Water Treatment Plant (WWTP) discharge. Further stations: Capilla de los Remedios (CR), Río Primero (RI) and Santa Rosa de Río Primero (SR) are situated 35, 70 and 110 km downstream from the WWTP, respectively. Water quality parameters were determined at each sampling site to describe the environmental conditions of the study area. Dissolved oxygen, conductivity, pH and temperature were monitored in the field, while water samples were analyzed in the laboratory for 5-day biological oxygen

demand (BOD-5), chemical oxygen demand (COD), ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, orthophosphate-phosphorous, chloride, sulphates, total solids, and total coliforms (all determinations were performed according to AOAC, 1995 and APHA, 2005). These physicochemical parameters were integrated into a Water Quality Index (WQI, Pesce & Wunderlin, 2000). The construction of WQI requires normalization for each parameter on a 0-100 scale to avoid interferences arising from different magnitudes of the parameters measured, with 100 being the optimal and 0 the worst water quality. Further to normalization, WQI requires the application of a weighting factor to each measured parameter, reflecting its importance on the water quality (Pesce & Wunderlin, 2000). WQI gives then a non-dimensional number that can be associated with a quality percentage.

Seven fish were collected at each site as described in 2.1 and transported to the laboratory in fresh water tanks. Fish were kept within their respective river water with aeration, and dissected within 12 h of capture. The means of the standard length (SL) and mass were 42.0 ± 4.1 mm and 1.45 ± 0.11 g, and were not statistically different between sampling stations. Brain was quickly removed and treated as previously described for RNA extraction.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were carried out using Infostat Software Package (Di Rienzo *et al.*, 2011). Normal distribution of data was analyzed by Shapiro Wilks test, and Levene test was used to test the homogeneity of variance. One-way ANOVA followed by DGC's (Di Rienzo *et al.*, 2002) test was performed to compare the sampling sites. Spearman correlation test was used to determine association between WQI and *cyp19a1b* expression. Significance was set at $p < 0.05$.

The link between water quality parameters and *cyp19a1b* expression in *J. multidentata* was assessed by means of a Principal Component Analysis (PCA) performed on the standardized variables in order to avoid misclassifications

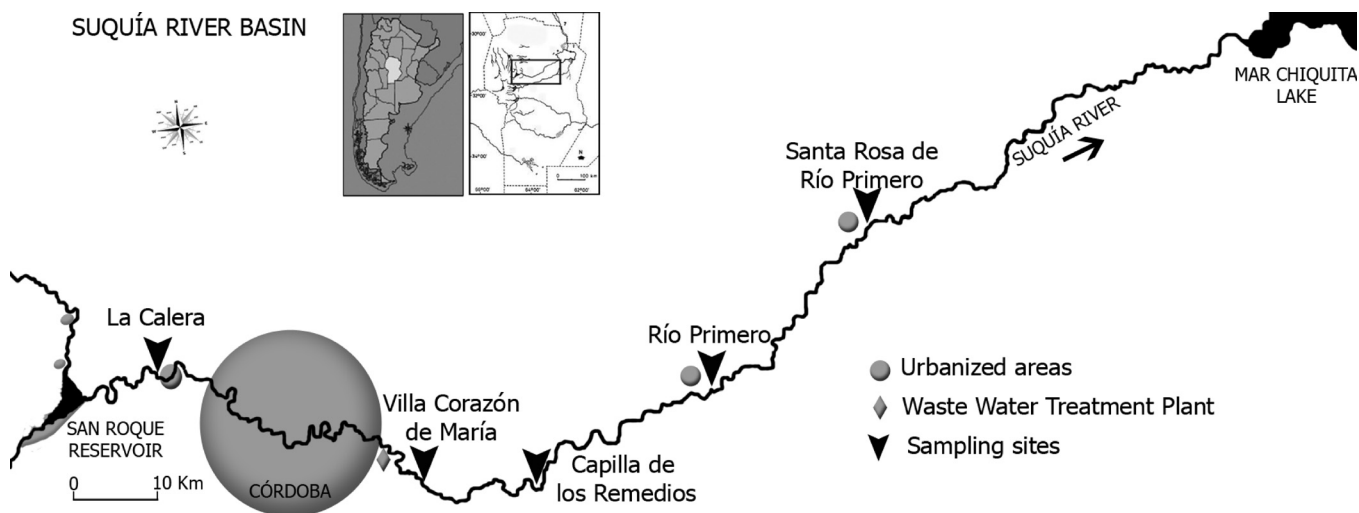


Figure 1 - Sampling stations selected along the Suquia River Basin.

arising from the different orders of magnitude of both numerical value and variance of the parameters analyzed (Wunderlin *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2009).

RESULTS

Cyp19a1b in *Jenynsia multidentata*

GenBank accession number of the partial cDNA sequence for *cyp19a1b* of *J. multidentata* is EU851873. The characterized partial fragment of *Cyp19a1b* was 660bp in length, encoding a 184 amino acid polypeptide with a predicted molecular weight of 21.3 kDa. A BLAST search revealed the highest homology of *cyp19a1b* with *Poecilia reticulata* (90%) and *Fundulus heteroclitus* (89%).

The amplification efficiencies of real-time RT-PCR obtained for *cyp19a1b* and β -actin were 1.88 and 1.87, respectively. The slopes used to calculate the amplification efficiency were -3.65 and -3.69 for *cyp19a1b* and β -actin. The use of β -actin as housekeeping gene was tested in our experiments. Non significant differences were observed between sampling stations.

Field study

Water quality parameters

As it can be observed from Table 1, water quality was greatly altered by Córdoba city as showed by significant differences for all the measured parameters between LC and CM. This deterioration could be mainly attributed to urban run-off and to the city sewage discharge. Evidences of these facts are the drastic drop in dissolved oxygen and the increase in BOD, COD, total inorganic nitrogen (TIN=additive amounts of ammonia, nitrates and nitrites nitrogen), phosphorous, sulfates and chloride concentrations as well as in the proliferation of coliform bacteria at CM (Table 1). However, different patterns were observed downstream this monitoring station. Ammonia and nitrites-nitrogen, BOD and DO displayed a slow recovery from CM to SR. In contrast, chloride, phosphorous, sulfates, total solids, conductivity and temperature remained with similar levels throughout CR, RI and SR. Nitrates- nitrogen increased approximately two times from CM to CR and continue with this level toward SR. It is remarkable that the rise in TIN at stations directly affected by the city sewage discharge was due to ammonia nitrogen content of water (CM and SR) while in other monitoring stations the main contributor to TIN was nitrates- nitrogen. TIN pattern observed in our study is in good agreement with previous reports (Pesce & Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001). COD displayed a significant maximum at CM and lower values with punctual variations at the other monitoring stations.

The applied WQI (Table 1) showed a significant drop after Córdoba city. The higher impact of urban pollution

was observed at CM, CR and RI (WQI= 36.6, 42.6 and 51.5 respectively) contrasting with the 73.7 observed in the sampling station located upstream from Córdoba (LC). Further downstream, at SR the river tend to restore its water quality, with WQI reaching means of 60.1.

Cyp19a1b expression in wild fish

As shown in Fig. 2, when expressed levels of *cyp19a1b* were analyzed by one way ANOVA, significant differences were obtained. In naturally exposed fish, the highest mRNA levels of *cyp19a1b* were found at the extremes of the gradient studied, in LC (reference site) and SR (Fig. 1). CM, CR and RI had a significant inhibition of mRNA expression in comparison with the reference site.

Association between *cyp19a1b* expression and water quality

Principal component analysis (PCA) is an unbiased method which indicates associations between samples and/or variables. These associations, based on similar magnitudes and variations in physiological responses, chemical and physical constituents, may indicate the presence of seasonal or human influences (Wunderlin *et al.*, 2001).

Three principal components were defined as explaining the major amount of total variance (97%). The first principal component (PC1) accounts for 64% of the variance and shows the association between *cyp19a1b* expression in brain of *J. multidentata* with the WQI, dissolved oxygen and pH levels in the water samples of Suquía River (Table 2 and Fig. 3). These parameters showed lower levels at the most impacted sites. PC1 has positive scores at the highly polluted sites (CM, CR and RI) and negative scores for the less contaminated stations (LC and SR, Table 2 and Fig. 3). The PC2 and PC3 account for the 25 % and 9% of the total variance respectively. PC2 separates those parameters with different variation pattern through the river basin as has been previously described (3.2.1). PC2 has positive scores for the parameters with higher levels at the low basin (chloride, phosphorous, sulfates, total solids, conductivity, pH and temperature) and negative scores for the variables that show recovery after CM (Total coliforms, BOD, COD, nitrites and ammonia-nitrogen) (Fig. 3).

DISCUSSION

It is widely accepted that human activities affect not only the physical, chemical and biological process in a stream, but also the resident biota and the associated human population. Suquía River is not an exception. As most water courses that run across big cities, receives pollutants of complex composition from different sources (Wunderlin *et al.*, 2001; Nimptsch *et al.*, 2005; Contardo-Jara *et al.*, 2009). A significant drop in WQI has been previously informed and was directly related with the poorly treated sewage discharges from the municipal WWTP, the main source of water pollution in the Suquía River (Pesce & Wunderlin, 2000; Contardo-Jara *et al.*, 2009).

Table 1 - Water quality parameters of selected sampling sites in Suquía River basin. Values are expressed in mg L⁻¹ if not indicated directly, total coliforms correspond to E⁺³ exponential values (i.e. 2.3=2300), and are expressed as MPN 100 m L⁻¹ (most probable number per 100 mL). Different letters indicate significantly different values at different monitoring stations (p<0.05).

Parameters	Sampling sites				
	La Calera (LC)	Villa Corazón de María (CM)	Capilla de los Remedios (CR)	Río Primero (RI)	Santa Rosa de Río Primero (SR)
Ammonia-nitrogen	0.05 ± 0.04 ^a	11.07 ± 1.05 ^b	13.53 ± 2.55 ^b	0.60 ± 0.33 ^a	0.16 ± 0.04 ^a
Biological Oxygen demand after 5 days (BOD)	2.7 ± 0.5 ^a	20.0 ± 0.5 ^e	12.9 ± 0.2 ^d	6.9 ± 0.2 ^c	3.9 ± 0.1 ^b
Chemical oxygen demand (COD)	99 ± 1 ^d	202 ± 6 ^e	74 ± 2 ^b	54 ± 2 ^a	82 ± 1 ^c
Chloride	22.2 ± 0.1 ^a	89.9 ± 0.1 ^c	80.1 ± 0.2 ^b	89.9 ± 0.1 ^d	80.0 ± 0.2 ^b
Conductivity [µS cm ⁻¹]*	405 ± 2 ^a	1474 ± 2 ^e	1354 ± 3 ^c	1387 ± 6 ^d	1340 ± 5 ^b
Dissolved oxygen *	13.1 ± 2.1 ^b	5.1 ± 1.6 ^a	7.1 ± 0.8 ^a	8.3 ± 1.4 ^a	10.4 ± 1.6 ^b
Nitrates-nitrogen	0.46 ± 0.04 ^a	3.74 ± 0.55 ^b	6.39 ± 0.78 ^c	7.96 ± 0.63 ^d	6.79 ± 0.45 ^c
Nitrites-nitrogen	0.03±0.01 ^b	0.53±0.01 ^d	0.23±0.01 ^c	0.22 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.01 ^a
Orthophosphate Phosphorous	0.01 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.03 ^c	0.35 ± 0.03 ^b	0.44 ± 0.05 ^c
pH *	8.0 ± 0.1 ^b	7.5 ± 0.3 ^a	7.6 ± 0.1 ^a	7.7 ± 0.1 ^a	8.3 ± 0.1 ^b
Solids: Total	168 ± 1 ^a	845 ± 2 ^d	819 ± 5 ^c	954 ± 6 ^e	786 ± 5 ^b
Sulfates	32 ± 1 ^a	244 ± 2 ^d	218 ± 2 ^b	232 ± 3 ^c	232 ± 2 ^c
Temperature * [°C]	8.3 ± 0.2 ^a	11.4 ± 0.2 ^b	10.3 ± 0.3 ^b	11.7 ± 0.4 ^b	13.5 ± 0.2 ^b
Total coliforms	5.0 ± 0.1 ^a	4400 ± 0.2 ^c	220 ± 0.1 ^c	750 ± 0.1 ^d	110 ± 0.1 ^b
WQI	73.7 ± 3.0 ^e	36.6 ± 3.4 ^a	42.6 ± 2.1 ^b	51.5 ± 0.5 ^c	60.1 ± 2.3 ^d

* Field measurements during the monitoring.

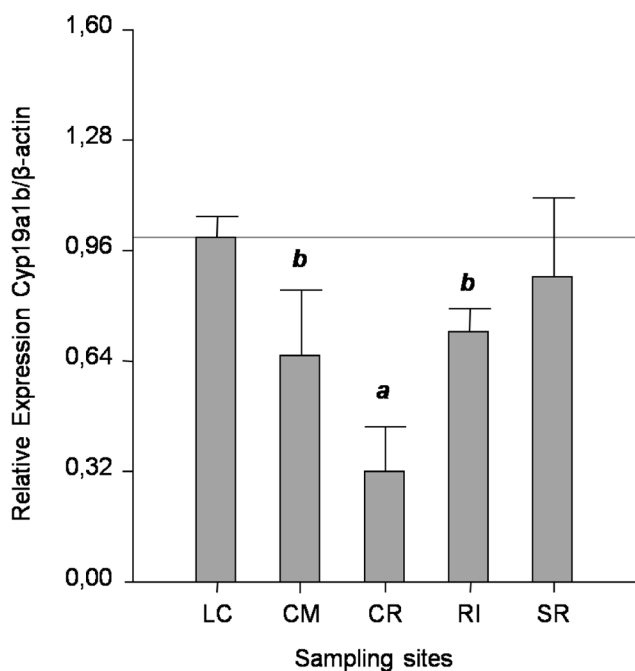


Figure 2 - Brain *cyp19a1b* expression in *J. multidentata* as fold change relative to β -actin, measured by qRT-PCR. Different letters indicate significant statistical differences to control (p<0.05). Horizontal line at 1 indicates the gene expression at the site located before Córdoba (LC).

The WQI presented here are lower than those registered before evidencing the progressive deterioration of this aquatic system. Moreover, in this study we have evidenced that the strong impact of Córdoba city persists even 110 km away from the pollution source.

Deterioration of water quality affects the aquatic life preservation. In particular, fish are sensitive to the impact of pollutants that can be found in the environment. Hued & Bistoni (2005) reported that in Suquía river fish assemblages changed with increasing water degradation, displaying a simpler structure in the most polluted sites.

Changes at community-level could be consequence of pollutants effects at lower biological levels (molecular, subcellular, cellular, tissue, organism and population, van der Oost *et al.*, 2003). Thus nowadays, different biological responses studies are advancing to propose new biomarkers that allow an early detection of toxic effects occurring due to pollution charges (Contardo-Jara *et al.*, 2008). In this way, the evaluation of changes in gene expression is emerging as the most promising molecular tool.

Several authors have used *J. multidentata* to investigate biomarkers at different organization levels such as histological, enzymatic and behavioral alterations (Cazenave *et al.*, 2005, 2008; Ballesteros *et al.*, 2007, 2009a, 2009b; Pesce *et al.*, 2008;

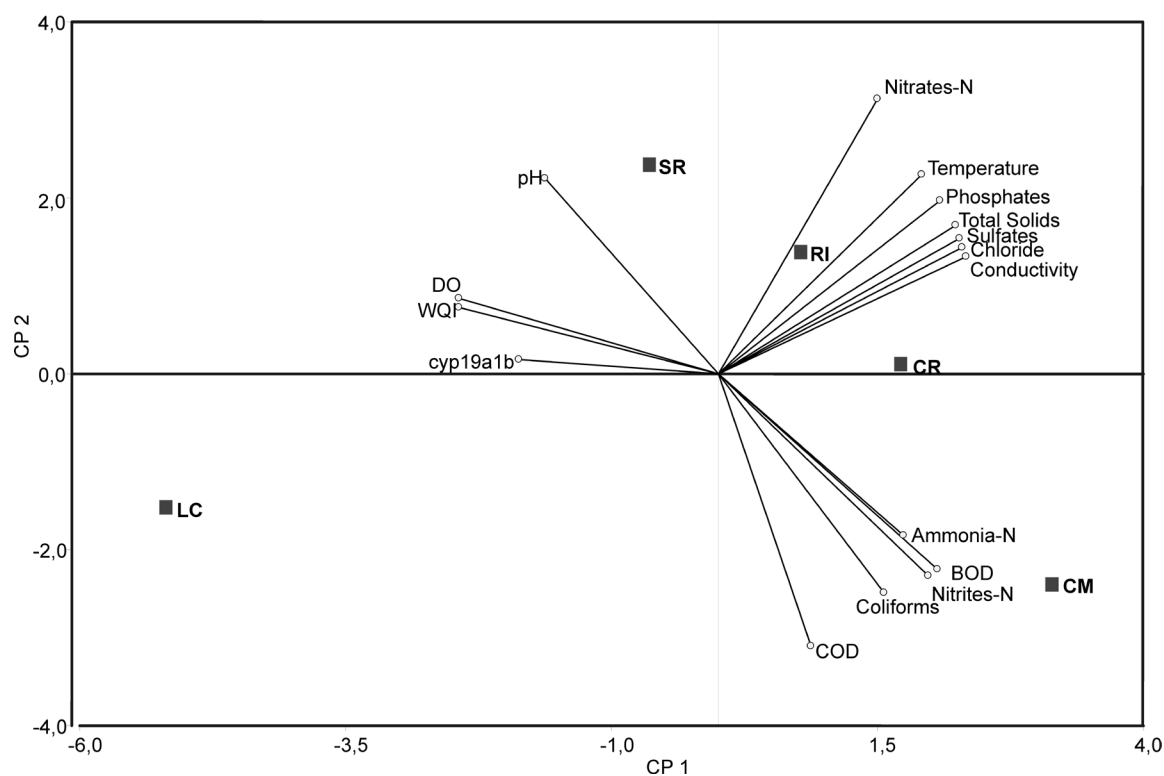


Figure 3 - Biplot of the two first principal components generated by the Principal Component Analysis showing the association between water quality parameters and *cyp19a1b* expression.

Table 2 - Results of the Principal Component Analysis (PCA) on the data set with Water Quality Index, chemical and physical parameters in water and *cyp19a1b* expression in brain of *J. multidentata*: coefficients of the eigenvectors (loadings of the original variables) in the linear combination of variables from which the PCA are computed.

	Principal Components		
	PC1 (64%)	PC2 (24%)	PC3 (9%)
WQI	-0,31	0,09	-0,09
Cyp19a1b	-0,23	0,02	-0,55
Ammonia-nitrogen	0,22	-0,23	0,37
5 days- BOD	0,26	-0,28	0,01
COD	0,11	-0,39	-0,42
Chloride	0,29	0,18	-0,11
Conductivity	0,29	0,17	-0,10
Dissolved oxygen	-0,31	0,11	-0,03
Nitrates-nitrogen	0,19	0,39	0,09
Nitrites-nitrogen	0,25	-0,29	-0,09
Phosphorous	0,26	0,25	-0,03
pH	-0,20	0,28	-0,31
Solids: Total	0,28	0,21	-0,05
Sulfates	0,28	-0,19	-0,14
Temperature	0,24	0,28	-0,25
Total coliforms	0,20	-0,31	-0,40

Amé *et al.*, 2009). The study of changes in gene expression needs the previous knowledge of DNA sequence. However, the information available for neotropical native fish species is very limited (Orlando *et al.*, 2002; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005). To the extent of our knowledge, this is the first study reporting the isolation and partial sequencing of *cyp19a1b* gene encoding brain aromatase of *J. multidentata*. With this information we were able to adjust the qRT-PCR method to assess if this biological response reflects changes in water quality.

Some studies have reported reproductive disorders and/or endocrine disruption in wild fishes exposed to environmental pollutants. Sometimes the results are discrepant, what could be due to many different factors, including the nature, concentration and duration of exposure to a given pollutant (Greytak *et al.*, 2005), and the stages of fish development when they are exposed. Orlando *et al.*, (2002) reported that brain aromatase activity was higher in female mosquitofish living downstream of a paper mill than in reference site. Greytak *et al.*, (2005) reported higher levels of *Cyp19a1b* in brain of killifish from highly polluted than unpolluted environments. On the contrary, Noaksson *et al.*, (2003b) found low brain aromatase activity in female perch from the leachate-contaminated Lake Molnbyggen, which is similar to our present qRT-PCR results revealing the influence of water quality on the expression of *cyp19a1b*. In our current study, we found aromatase inhibition at the most polluted areas of the basin (CM, CR and RI) (Fig. 1; Table I) while the highest mRNA levels were observed in females collected at the site situated before Córdoba (LC) and far downstream from WWTP

(SR), where there was some recovery of the water quality after the severe impact of the sewage exit.

The ecological significance of the *cyp19a1b* inhibition in the most polluted areas of Suquia River basin is yet unknown. However, it could be hypothesized that such inhibition cause or contribute to estrogen-related disorders, probably resulting in gradual loss of reproductive function upon long exposure.

There are evidences about the occurrence of EDCs in freshwaters receiving domestic and industrial effluents. Considering that most of streams receive some kind of effluents, endocrine disruption is probably more widespread than is currently documented. A more global assessment of endocrine disruption should include the more rare and vulnerable species, with different life stories and reproductive strategies (Jobling *et al.*, 2004). So, identifying biomarkers in native fish that could be used as sentinels is extremely necessary for a better understanding of how EDCs can affect fish sustainability.

As shown by the PCA analysis, changes of water quality along the pollution gradient studied in Suquia River is reflected in *cyp19a1b* expression. The impact on aromatase expression in wild fish seems to be less severe with increasing distance from the WWTP, where there is some partial recovery of water quality. So far, our results suggest that further studies of *cyp19a1b* expression in *J. multidentata* could be interesting in order to propose a new biomarker to evaluate changes in the water quality of South American rivers connected with the probable presence of endocrine disruptors.

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT; PICT 1209, 1225), Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) and National Research Council (CONICET-PIP 112-200801-02190). This work is part of PhD. thesis of N.F. Guyón, who gratefully acknowledge fellowships from CONICET.

REFERENCES

- AMÉ, M.V., BARONI, M.V., GALANTI, L.N., BOCCO, J.L. & WUNDERLIN, D.A., 2009, Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, 74: 1179-1186. doi S0045-6535(08)01485-9.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION [APHA], AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION [AWWA] & WATER ENVIRONMENT FEDERATION [WEF], 2005. In: Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W. & Greenberg, A.H. (eds.), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Baltimore, Maryland, 21th ed.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS [AOAC], 1995. AOAC official methods of analysis, 16th ed. (March 1999 revision), AOAC International, Gaithersburg, MD.
- BALLESTEROS, M.L., BIANCHI, G.E., CARRANZA, M. & BISTONI, M.A., 2007, Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J Environ Sci Health B* 42: 351-357. doi 778061466.
- BALLESTEROS, M.L., WUNDERLIN, D.A. & BISTONI, M.A., 2009a, Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 199-205. doi S0147-6513(08)00010-9.
- BALLESTEROS, M.L., DURANDO, P.E., NORES, M.L., DIAZ, M.P., BISTONI, M.A. & WUNDERLIN, D.A., 2009b, Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ Pollut* 157: 1573-1580. doi S0269-7491(09)00004-9.
- BEST, J.H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F.B., METCALF, J.S. & CODD, G.A., 2002, Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 60: 223-231. doi S0166445X02000103.
- BLAZQUEZ, M., GONZALEZ, A., PAPADAKI, M., MYLONAS, C. & PIFERRER, F., 2008, Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 158: 95-101. S0016-6480(08)00225-6 [pii]10.1016/j.yggen.2008.06.001.
- CAZENAVE, J., WUNDERLIN, D.A., BISTONI, M.A., AME, M.V., KRAUSE, E., PFLUGMACHER, S. & WIEGAND, C., 2005, Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquat Toxicol* 75: 178-190. doi S0166-445X(05)00260-2.
- CAZENAVE, J., NORES, M.L., MICELI, M., DIAZ, M.P., WUNDERLIN, D.A. & BISTONI, M.A., 2008, Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res* 42: 1299-1307. doi S0043-1354(07)00627-6.
- CHESHENKO, K., PAKDEL, F., SEGNER, H., KAH, O. & EGGEN, R.I., 2008, Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 155: 31-62. doi S0016-6480(07)00112-8.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- CLOTFELTER, E.D. & RODRIGUEZ, A.C., 2006, Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environ Pollut* 144: 833-839. doi:10.1016/j.envpol.2006.02.007
- CONTARDO-JARA, V. & WIEGAND, C., 2008, Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. *Environ Pollut* 155: 182-189. doi 10.1016/j.envpol.2007.10.018.
- CONTARDO-JARA, V., GALANTI, L.N., AMÉ, M.V., MONFERRÁN, M.V., WUNDERLIN, D.A. & WIEGAND, C., 2009, Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in watercourses of Córdoba, Argentina. *Ecotox Environ Safe* 72: 1871-1880. doi 10.1016/j.ecoenv.2009.07.001.
- DIOTEL, N., LE PAGE, Y., MOURIEC, K., TONG, S.K., PELLEGRINI, E., VAILLANT, C., ANGLADE, I., BRION, F., PAKDEL, F., CHUNG, B.C. & KAH, O., 2010, Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 31, 2: 172-92. DOI: 10.1016/j.yfrne.2010.01.003
- DI RIENZO, J.A., GUZMÁN, A.W. & CASANOVES, F., 2002, A Multiple-Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *J Agr Biol Envir St* 7(2):129-142. doi 10.1198/10857110260141193.
- DIRIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINIM G., GONZALEZ

- L., TABLADA M. & ROBLEDO C.W., 2011, InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- GARCIA-SEGURA, L.M., VEIGA, S., SIERRA, A., MELCANGI, R.C. & AZCOITIA, I., 2003, Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71:31-41. S0301008203001552 [pii]
- GONZÁLEZ, A. & PIFERRER, F., 2002, Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293: 500-510. doi: 10.1002/jez.90005.
- GREYTAK, S.R., CHAMPLIN, D. & CALLARD, G.V., 2005, Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquat Toxicol* 71: 371-389. doi S0166-445X(04)00363-7.
- HUED, A.C. & BISTONI, M.A., 2005, Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543: 279-298. doi: 10.1007/s10750-004-7893-1.
- JOBLING, S., CASEY, D., RODGERS-GRAY, T., OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., PAWLOWSKI, S., BAUNBECK, T., TURNER, A.P. & TYLER, C.R., 2004, Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol* 66: 207-222. doi 10.1016/S0166-445X(03)00134-6.
- KISHIDA, M., MCLELLAN, M., MIRANDA, J.A. & CALLARD, G.V., 2001, Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 261-268. doi S1096495901003190.
- KWON, J.Y., MCANDREW, B.J. & PENMAN, D.J., 2001, Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59: 359-370. doi 10.1002/mrd.1042.
- MALABARBA, L., REIS, R., VARI, R., LUCENA, Z. & LUCENA, C., 1998, Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre. 603p.
- MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L., MARTINS, C.M., PINHO, G.L., CHAVES, I.S., FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., BIANCHINI, A., 2007, Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146: 221-234. S1532-0456(06)00199-2 [pii]10.1016/j.cbpc.2006.08.012.
- NIMPTSCH, J., WUNDERLIN, D.A., DOLLAN, A. & PFLUGMACHER, S., 2005, Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquia River basin (Córdoba, Argentina). *Chemosphere* 61, 147-157. doi 10.1016/j.chemosphere.2005.02.079.
- NOAKSSON, E., TJARNLUND, U., BOSVELD, A.T. & BALK, L., 2001, Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol Appl Pharmacol* 174: 160-176. doi 10.1006/taap.2001.9194S0041-008X(01)99194-X.
- NOAKSSON, E., LINDEROTH, M., BOSVELD, A.T. & BALK, L., 2003a, Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *Gen Comp Endocrinol* 134: 273-284. doi S0016648003002673.
- NOAKSSON, E., LINDEROTH, M., BOSVELD, A.T., NORRGREN, L., ZEBUHR, Y. & BALK, L., 2003b, Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *Sci Total Environ* 305: 87-103. doi S0048-9697(02)00503-X.
- ORLANDO, E.F., DAVIS, W.P. & GUILLETTE, L.J., 2002, Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 429-433. doi sc271_5_1835.
- PEREIRA, P., DE PABLO, H., SUBIDA, M.D., VALE, C. & PACHECO, M., 2009, Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Óbidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1471-1480. doi 10.1016/j.ecoenv.2008.12.012.
- PESCE, S.F. & WUNDERLIN, D.A., 2000, Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River. *Wat Res* 34: 2915-2926. doi 10.1016/S0043-1354(00)00036-1.
- PESCE, S.F., CAZENAVE, J., MONFERRAN, M.V., FREDE, S. & WUNDERLIN, D.A., 2008, Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ Pollut* 156: 775-783. doi S0269-7491(08)00310-2.
- PFÄFFL, M., HORGAN, G. & DEMPFFLE, L., 2002, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nucl Acids Res* 30 (9): e36. doi 10.1093/nar/30.9.e36.
- SIMPSON, E.R., MAHENDROO, M.S., MEANS, G.D., KILGORE, M.W., HINSHELWOOD, M.M., GRAHAM-LORENCE, S., AMARNEH, B., ITO, Y., FISHER, C.R., MICHAEL, M.D., MENDELSON, C.R. & BULUN, S.D., 1994, Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15: 342-355. doi 10.1210/edrv-15-3-342.
- STROBL-MAZZULLA, P.H., MONCAUT, N.P., LOPEZ, G.C., MIRANDA, L.A., CANARIO, A.V. & SOMOZA, G.M., 2005, Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen Comp Endocrinol* 143: 21-32. doi S0016-6480(05)00093-6.
- TRANT, J.M., GAVASSO, S., ACKERS, J., CHUNG, B.C. & PLACE, A.R., 2001, Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool* 290: 475-483. doi 10.1002/jez.1090.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. & VERMEULEN, N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar* 13: 57-149. doi 10.1016/S1382-6689(02)00126-6.
- WUNDERLIN, D., DÍAZ, M.P., AMÉ, M.V., PESCE, S., HUED, A. & BISTONI, M.A., 2001, Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia river basin (Córdoba, Argentina). *Water Res* 35: 2881-2894. doi 10.1016/S0043-1354(00)00592-3.