

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*“Alteraciones Reproductivas en peces expuestos a xenoestrógenos: nuevas herramientas en el monitoreo de la calidad de los recursos hídricos”*

Biól. María Angelina Roggio



*Obra de Feliberto Pichardo Valerio*

2015

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*“Alteraciones Reproductivas en peces expuestos a  
xenoestrógenos: nuevas herramientas en el monitoreo de la  
calidad de los recursos hídricos”*

**Biól. María Angelina Roggio**

**Directora:** Dra. María de los Ángeles Bistoni

**Co-directora:** Dra. Andrea Cecilia Hued



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
CÁTEDRA DE DIVERSIDAD ANIMAL II**

**Córdoba, Argentina**

**2015**

## 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. Laura Ceccilia Giojalas.** Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM-CONICET-UNC). Cátedra de Biología Celular- FCEFYN- UNC.

**Dr. Víctor Enrique Cussac.** Centro científico tecnológico Patagonia Norte-CONICET.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

## TRIBUNAL

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

Firma: .....

Aclaración: .....

*A mis padres por su amor y apoyo incondicional,*

*A la luz de mi vida, mi hija Juliana*

## AGRADECIMIENTOS

Es difícil con palabras agradecer a todas las personas que de una u otra manera colaboraron con un granito de arena para la realización de esta tesis Doctoral...

Para comenzar quiero agradecerle a Dios, por haberme dado la Vida y bendecirme con tantas cosas lindas.

Quiero agradecer profundamente a toda mi familia, en especial a mis padres por su amor y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias papá y mamá por estar siempre, por enseñarme cada día a ser una mejor persona. A Juliana mi hija, la luz de mi vida, y a Fernando por contenerme, darme constantemente ánimos para seguir adelante, por entender mis malos momentos y ausencias y sin embargo siempre estar ahí.

A mis directoras de tesis Dra. María de los Ángeles Bistoni y Dra. Andrea Cecilia Hued, porque no solo me abrieron las puertas de su lugar de trabajo para que yo pueda transitar los caminos de la ciencia, sino además por su paciencia, por siempre brindarme palabras de apoyo, aún en los momentos más difíciles. Encontré en ellas a dos personas excelentes tanto humana como profesionalmente.

A los miembros de mi comisión asesora la Dra. Laura Cecilia Giojalas y el Dr. Víctor E. Cussac por su valioso aporte para el desarrollo de esta tesis Doctoral. Especialmente a Laura por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme la realización de muchos de los experimentos de esta tesis.

A CONICET por brindarme la becas de Postgrado tipo I y II para la realización de mi tesis doctoral.

A la Dra. María Valeria Amé por permitirme trabajar en su laboratorio, a la Dra. María Eugenia Téves, Dra. Laura Gatica, Dr. Lucas N. Galanti por enseñarme desinteresadamente diversas técnicas de laboratorio, al Dr. Alejandro Guidobaldi y Diego Uñates por su ayuda en la parte de videomicroscopía y a la Dra. Cristina Maldonado, del centro de Microscopía Electrónica-UNC, por el asesoramiento brindado a lo largo de esta tesis y por su calidez humana.

A todos mis compañeros de trabajo de la cátedra de Diversidad Animal II: Mari, Andrea, Gustavo, Ricardo T., Mariano, Ricardo B., Alejo, Eugenia H., Eugenia V., Sabrina., Paola, Gisela, por hacer más llevadero el día a día y en especial a dos personitas a las cuales quiero y aprecio mucho: la Dra. María Laura Ballesteros, quien siempre estuvo dispuesta ayudarme y me ha socorrido más de una vez, quien siempre estuvo ahí en los momentos buenos y malos y a la Dra. Noelia F. Guyón, quien ha sido mi gran compañera y sostén a lo largo de estos 7 años, juntas compartimos ensayos de laboratorio y muestreos que siempre quedarán guardados en mi corazón.

A mis compañeros del CEBICEM por hacerme un lugarcito en su laboratorio y a las Dras. María Eugenia Valdés y Rocío Bonansea de Ciencias Químicas, por tantas charlas y congresos compartidos.

A mis amigas y amigos de la vida, Nadi, Vane, Gabi, Yami, Puri, Adri, Cin, Mari V., Lau M., Sil, Lau G., Ceci, Euge H., Pau W., por acompañarme siempre y darme apoyo para seguir adelante y en especial a mi gran amiga Gabi Ferreiro, porque desde hace 15 años compartimos el amor por la biología y juntas transitamos buenos y malos momentos. Gracias por tu amistad, por siempre estar ahí, por ser un gran sostén en mi vida.

Finalmente agradecer a mi hermano, mis tíos, primos por todo su apoyo a lo largo de mi carrera, por entender mis ausencias y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me acompañaron a lo largo de este camino

A todos, muchas gracias!!

Angelina

## PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Roggio, M.A.; Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2012. Effects of 4n-nonylphenol exposure on the reproductive behavior and testis histology of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae: Cyprinodontiformes). *Natura Neotropicalis*. 43(1-2): 31-45
  
- Guyón, N.F.; Roggio, M.A.; Amé, M.V.; Hued, A.C.; Valdés M.E.; Giojalas, L.C.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2012. Impairments on aromatase expression, reproductive behavior and Sperm Quality of male fish exposed to 17 $\beta$ -estradiol. *Environ Toxicol Chem* 31 (5): 935-940.
  
- Roggio, M.A.; Guyón, N.F.; Valdés, M.E.; Hued A.C.; Amé, M.V.; Giojalas, L.C.; Wunderlin, D.A.; Bistoni MA. 2014. Effects of the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the fish *Jenynsia multidentata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 92(5):579-84.
  
- Roggio, M.A.; Teves, M.E.; Hued A.C; Giojalas L.C.; Bistoni, M.A. 2014. Spermatozoa characterization in the one-sided livebearing fish, *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae). *Rev. Biol. Trop*. 62 (3): 997-1006.

# ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>SUMMARY</b> .....	3

## **CAPÍTULO I: Aspectos generales**

1.1. Introducción.....	5
1.1.1. <i>Perturbadores endocrinos químicos: Xenoestrógenos</i> .....	5
1.1.2. <i>Jenymsia multidentata como bioindicador</i> .....	9
1.1.3. <i>Biomarcadores</i> .....	11
1.2. Objetivo general y objetivos específicos .....	15
1.2.1. Objetivo general .....	15
1.2.2. Objetivos específicos.....	15
1.3. Hipótesis general de trabajo.....	15

## **CAPÍTULO II: Estructura histológica del testículo y caracterización de parámetros espermáticos de *J. multidentata* en condiciones controladas de laboratorio.**

2.1. Introducción.....	17
2.2. Metodología .....	26
2.2.1. <i>Recolección de especímenes</i> .....	26
2.2.2. <i>Histología del testículo</i> .....	26
2.2.3. <i>Ultraestructura del testículo</i> .....	26
2.2.4. <i>Obtención y tratamiento de muestras de semen</i> .....	27
2.2.5. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	27
2.2.5.1. <i>Motilidad espermáticos</i> .....	28
2.2.5.2. <i>Viabilidad espermática</i> .....	28
2.2.5.3. <i>Recuento espermático</i> .....	29
2.2.5.4. <i>Morfometría de los espermatozoides</i> .....	29
2.3. Resultados y Discusión.....	30

## **CAPÍTULO III: Análisis de biomarcadores de efecto en machos de *J. multidentata* expuestos xenoestrógenos**

3.1. Introducción.....	44
------------------------	----



3.2. Hipótesis.....	45
3.3. Metodología .....	45
3.3.1. <i>Recolección de peces y aclimatación</i> .....	45
3.3.2. <i>Compuestos químicos</i> .....	45
3.3.3. <i>Condiciones de Exposición</i> .....	46
3.3.4. <i>Biomarcadores</i> .....	47
3.3.4.1. <i>Comportamiento reproductivo</i> .....	47
3.3.4.2. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	48
3.3.4.3. <i>Índices somáticos</i> .....	48
3.3.4.4. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	48
3.3.4.5. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	49
3.3.4.6. <i>Análisis estadístico</i> .....	49
<b>3.4 Sección A. 17<math>\beta</math>-estradiol (E<sub>2</sub>)</b> .....	50
3.4.A.1. Introducción .....	50
3.4.A.2. Condiciones de Exposición y determinación de E <sub>2</sub> en agua.....	52
3.4.A.3. Resultados .....	53
3.4.A.3.1. <i>Contenidos de E<sub>2</sub> en agua</i> .....	53
3.4.A.3.2. <i>Mortalidad e Índices somáticos</i> .....	53
3.4.A.3.3. <i>Comportamiento Reproductivo</i> .....	53
3.4.A.3.4. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	55
3.4.A.3.5. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	55
3.4.A.3.6. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	57
3.4.A.3.7. <i>Análisis discriminante</i> .....	63
3.4.A.4. Discusión.....	64
<b>3.5 Sección B. 17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (EE<sub>2</sub>)</b> .....	68
3.5.B.1. Introducción.....	68
3.5.B.2. Condiciones de Exposición y determinación de EE <sub>2</sub> en agua.....	70
3.5.B.3. Resultados.....	70
3.5.B.3.1. <i>Contenidos de EE<sub>2</sub> en agua</i> .....	70
3.5.B.3.2. <i>Mortalidad e Índices somáticos</i> .....	70
3.5.B.3.3. <i>Comportamiento Reproductivo</i> .....	71
3.5.B.3.4. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	72
3.5.B.3.5. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	73
3.5.B.3.6. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	75

3.5.B.3.7 <i>Análisis discriminante</i> .....	78
3.5.B.4. <i>Discusión</i> .....	79
<b>3.6 Sección C. 4n-nonilfenol (4n-NP)</b> .....	84
3.6.C.1. <i>Introducción</i> .....	84
3.6.C.2. <i>Condiciones de Exposición y determinación de 4n-NP en agua</i> .....	86
3.6.C.3. <i>Resultados</i> .....	86
3.6.C.3.1. <i>Contenidos de 4n-NP en agua</i> .....	86
3.6.C.3.2. <i>Mortalidad e Índices somáticos</i> .....	86
3.6.C.3.3. <i>Comportamiento Reproductivo</i> .....	87
3.6.C.3.4. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	88
3.6.C.3.5. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	89
3.6.C.3.6. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	91
3.6.C.3.7. <i>Análisis discriminante</i> .....	93
3.6.C.4. <i>Discusión</i> .....	94
<b>3.7. Sección D-17<math>\alpha</math>-metiltestosterona (MT)</b> .....	99
3.7.D.1 <i>Introducción</i> .....	99
3.7.D.2 <i>Condiciones de Exposición y determinación de MT en agua</i> .....	101
3.7.D.3 <i>Resultados</i> .....	101
3.7.D.3.1. <i>Contenidos de MT en agua</i> .....	101
3.7.D.3.2. <i>Mortalidad e Índices somáticos</i> .....	101
3.7.D.3.3. <i>Comportamiento Reproductivo</i> .....	102
3.7.D.3.4. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	102
3.7.D.3.5. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	103
3.7.D.3.6. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	105
3.7.D.3.7. <i>Análisis discriminante</i> .....	106
3.7.D.4. <i>Discusión</i> .....	107
 <b>CAPÍTULO IV: Biomarcadores a campo en peces recolectados en dos sitios con diferente calidad de agua de la cuenca del Río Suquía.</b>	
4.1. <i>Introducción</i> .....	111
4.2. <i>Hipótesis</i> .....	114
4.3. <i>Metodología</i> .....	115
4.3.1. <i>Área de estudio</i> .....	115
4.3.2. <i>Recolección de muestras</i> .....	117

4.3.3. <i>Parámetros de calidad de agua</i> .....	117
4.3.4. <i>Biomarcadores</i> .....	117
4.3.4.1. <i>Comportamiento reproductivo</i> .....	117
4.3.4.2. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	118
4.3.4.3. <i>Índices somáticos</i> .....	118
4.3.4.4. <i>Análisis histológico de testículo</i> .....	118
4.3.4.5. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	118
4.3.4.6. <i>Análisis estadístico</i> .....	119
4.4. Resultados .....	119
4.4.1. <i>Parámetros de calidad de agua</i> .....	119
4.4.2. <i>Biomarcadores</i> .....	122
4.4.2.1. <i>Índices somáticos</i> .....	122
4.4.2.2. <i>Comportamiento reproductivo</i> .....	124
4.4.2.3. <i>Parámetros espermáticos</i> .....	125
4.4.2.4. <i>Análisis histológico del testículo</i> .....	129
4.4.2.5. <i>Análisis ultraestructural del testículo</i> .....	133
4.5. Discusión .....	136

## **CAPÍTULO V: Discusión general y conclusiones**

5.1. Discusión general .....	143
5.2. Conclusiones .....	152

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	154
---------------------------	-----

<b>APÉNDICES</b> .....	198
------------------------	-----

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**4n-NP:** 4n-nonilfenol

**Cyp19:** Citocromo P450 aromatasa

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

**DDT:** diclorodifeniltricloroetano

**E<sub>1</sub>:** estrona

**E<sub>2</sub>:** 17 $\beta$ - estradiol

**EDAR-Bajo Grande:** Estación Depuradora de Aguas Residuales de la Ciudad de Córdoba.

**EE<sub>2</sub>:** 17 $\alpha$ - etinilestradiol

**H&E:** tinción con hematoxilina y eosina.

**ICA:** índice de calidad del agua

**IGS:** índice gonadosomático

**IHS:** índice hepatosomático.

**K:** factor de condición

**LD:** límite de detección

**MT:** 17 $\alpha$ -metiltestosterona

**NMP:** número más probable

**PCBs:** bifenilos policlorados

**PEs:** perturbadores endocrinos “PEs” (en inglés “endocrine disrupting chemicals”, EDCs)

**Sc:** espermatocito

**Se:** célula de Sertoli

**Sg:** espermatogonia

**St:** espermátida

**Sz:** espermatozoide

**VL:** velocidad Lineal

**VCL:** velocidad curvilíneal

**LIN:** linealidad

**T:** testosterona

# RESUMEN

La contaminación de los recursos acuáticos es una problemática de creciente importancia. La evidencia científica sugiere que una amplia variedad de compuestos químicos alteran el sistema endocrino de los animales, razón por la cual no solo provocan efectos adversos a nivel individual sino incluso a nivel poblacional y/o de comunidades. Debido a la contaminación registrada en aguas de nuestra provincia y al escaso conocimiento sobre las alteraciones que se producen en la fauna autóctona, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la respuesta de diversos biomarcadores reproductivos a diferentes niveles de organización biológica (celular, tisular, somático y comportamental) en machos de *Jenynsia multidentata* expuestos a compuestos con actividad estrogénica, tanto en condiciones de laboratorio como a campo. Se desarrolló además para esta especie íctica un protocolo sencillo de obtención y tratamiento para muestras de esperma. A través de la realización de bioensayos se analizaron los biomarcadores frente a la exposición a:  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol,  $4n$ -nonilfenol y  $17\alpha$ -metiltestosterona; mientras que a campo en la cuenca del Río Suquía, se compararon las respuestas en individuos provenientes de dos sitios con diferente calidad de agua. Los resultados obtenidos en laboratorio demuestran que el comportamiento reproductivo y la ultraestructura de gónadas fueron los biomarcadores más sensibles frente a la exposición a xenoestrógenos, respondiendo incluso a concentraciones ambientalmente relevantes. Dentro de los parámetros espermáticos el recuento y la viabilidad fueron en general los que más cambios evidenciaron en individuos expuestos a los tóxicos. El  $17\alpha$ -etinilestradiol demostró ser el compuesto estrogénico más potente, mientras que la  $17\alpha$ -metiltestosterona no se comportó como xenoestrógeno a las distintas concentraciones ensayadas. A campo se evidenció que la calidad del agua de la cuenca del Río Suquía se vio fuertemente afectada luego de que éste atraviesa la ciudad de Córdoba. Los biomarcadores más sensibles fueron el comportamiento reproductivo, velocidad de los espermatozoides, histología y ultraestructura de gónadas e índices somáticos. Los resultados obtenidos en la presente tesis ponen en evidencia la importancia de evaluar el efecto de xenobióticos sobre variables reproductivas a través de la utilización de un conjunto de biomarcadores. La capacidad reproductiva de *J. multidentata* podría verse alterada frente a la exposición crónica a contaminantes ambientales y representar, de esta manera, una amenaza para la especie. Dado que diversos aspectos del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada se encuentran conservados entre los vertebrados, incluidos el hombre, las alteraciones observadas en esta especie podrían registrarse también en otros organismos. Lo anteriormente expuesto vislumbra la necesidad de aplicar mejoras en el tratamiento de efluentes urbanos, industriales y agrícolas para lograr disminuir la carga de contaminantes que se liberan a los recursos hídricos.

# SUMMARY

Pollution of water resources is a problem of growing importance. Scientific evidences suggest that a wide variety of chemicals disrupts the endocrine systems of animals and causes adverse effects at the individual level but also at the population and/or community level. Due to the freshwater contamination registered in Córdoba Province and the limited knowledge about its effects on the native fish fauna, the main objective of the present thesis was to evaluate the response of reproductive biomarkers at different levels of biological organization (cell, tissue, somatic and behavioral) in males of the *Jenynsia multidentata* exposed to compounds with estrogenic activity, under laboratory and field conditions. Also in this work it was developed a simple protocol for collection and processing sperm samples for this fish species. Different biomarkers were analyzed after the exposure to:  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -ethinylestradiol, 4-nonylphenol and  $17\alpha$ -methyltestosterone. At field, the reproductive responses were compared in individuals from two sites with different water quality of Rio Suquía River. The laboratory results show that reproductive behavior and the ultrastructure of gonads were the most sensitive biomarkers from exposure to xenoestrogens. Among the sperm parameters, the sperm count and viability showed in generally more changes in individuals exposed to the toxics tested. The  $17\alpha$ -ethinylestradiol was the most potent estrogenic compound, whereas the different concentrations of  $17\alpha$ -methyltestosterone used in the present study did not present xenoestrogenic activity. At field, the water quality of the Rio Suquía was significantly decreased downstream Cordoba city. The most sensitive biomarkers under such environmental degradation were reproductive behavior, sperm velocities, testis histology and ultrastructure and somatic indices. The results obtained through the present research demonstrate the importance of evaluating the xenobiotics effects on reproductive parameters through the application of a set of biomarkers. *J. multidentata* reproduction could be affected after chronic exposure to environmental pollutants and therefore, the water quality degradation could represent a threat to the species. The functioning of hypothalamus-pituitary-gonadal axis is conserved among vertebrates, including humans, thus the alterations observed in this species may also be registered in other organisms. Furthermore, the results obtained at field reflect the need for improvements in the treatment of municipal, industrial and agricultural effluents in order to reduce the amount of pollutants released into the freshwater system.



# *CAPÍTULO I*

## *Aspectos Generales*

## 1.1.INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. *Perturbadores endocrinos químicos: Xenoestrógenos*

Los ecosistemas de agua dulce son esenciales para el desarrollo y el bienestar humano ya que históricamente han sido utilizados para el asentamiento y desarrollo de las poblaciones por los servicios que estos brindan, como el aporte de agua para el consumo y riego, fuentes de alimentos, recreación, reducción de los desechos generados por el hombre y la capacidad de actuar como reguladores del clima.

Las aguas superficiales están sometidas a contaminación de origen antrópico, tales como descargas de residuos domésticos, efluentes de procesos industriales, escorrentía agrícola, entre otras fuentes puntuales. De esta manera, la contaminación y/o la sobreexplotación de estos recursos impacta negativamente sobre su integridad y la biota que forma parte de los mismos, afectando directamente a los servicios que prestan y por lo tanto al bienestar humano (PNUMA 2007, 2012).

La contaminación de los recursos acuáticos, es una problemática de creciente importancia en las últimas décadas, debido al intenso incremento en el uso de estos recursos provocado por el crecimiento poblacional, el cual no se ve acompañado en igual medida de políticas sustentables para garantizar su integridad y el mantenimiento de las funciones ecosistémicas. En los últimos años, la evidencia científica sugiere que una amplia variedad de compuestos químicos introducidos al ambiente, producen efectos adversos, tanto en la salud humana como en la de los ecosistemas en general. Aunque la diversidad de sustancias determina una amplia variedad de mecanismos de acción, se destacan aquellas que alteran el sistema endocrino de animales y poblaciones humanas, ya que interfieren con la síntesis, liberación, transporte, unión, ingreso, metabolismo o acción de las hormonas naturales. Dichas sustancias se las conoce bajo el nombre de *perturbadores endocrinos* “PEs” (en inglés “endocrine disrupting chemicals”, EDCs) (Curtis & Skaar 2002, Jobling & Owen 2013). Los PEs pueden alterar el crecimiento, comportamiento, reproducción y actividad inmune de los organismos, provocando efectos adversos, no solo a nivel individual sino incluso en la progenie o a nivel poblacional (Mills & Chichester 2005, Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville 2005).

Existen fuertes evidencias de que las concentraciones ambientales de PEs afectan adversamente la diferenciación sexual, el desarrollo y reproducción de los organismos expuestos a ellos (Vos et al. 2000, Schweer et al. 2002, Mills & Chichester 2005, Vajda et al. 2011, Wen et al. 2013). Además, estos compuestos son lipofílicos y resistentes a la



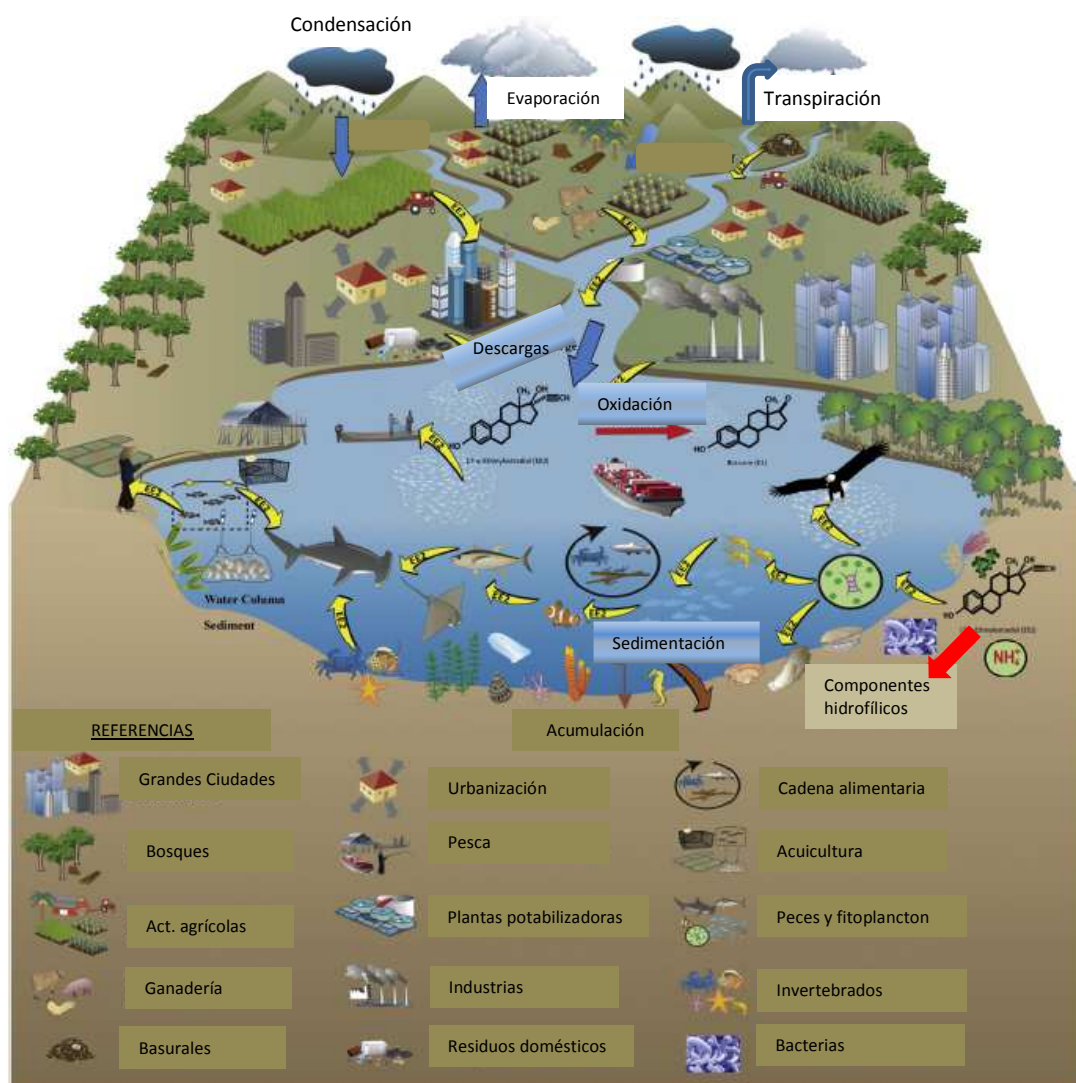
biodegradación, por lo que pueden acumularse en los organismos expuestos (Tyler et al. 1998). Dentro de los PEs, los esteroides fueron los primeros compuestos reportados en sistemas de aguas servidas y por ende, fueron los primeros que captaron la atención de los investigadores desde el punto de vista ambiental. Por otro lado, los xenoestrógenos, compuestos que mimetizan la acción de hormonas naturales estrogénicas, merecen una particular atención tanto por su alto nivel de actividad biológica como por su potencial para provocar efectos indeseables en los organismos expuestos, ya que son capaces de alterar el desarrollo y la maduración sexual, tanto de invertebrados como vertebrados (Gillesby & Zacharewski 1998, Vos et al. 2000, Mills & Chichester 2005, Vajda et al. 2011, Wen et al. 2013). Diversos estudios han demostrado que muchos xenoestrógenos pueden unirse a los receptores de estrógeno con una afinidad idéntica o similar a la hormona endógena  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), y de esta manera, estimular una respuesta biológica similar al  $E_2$ . Esto ha llevado a que distintos estudios definan a estos receptores como “promiscuos” (Jobling & Sumpter 1993, Korner et al. 2000, Mills & Chichester, 2005).

Los estrógenos naturales ( $17\beta$ -estradiol, estrona y estriol) son excretados en la orina en forma inactiva debido a procesos de conjugación en el hígado. Sin embargo, las bacterias presentes en las plantas de tratamientos de residuos cloacales (PTRC) los degradan a compuestos no conjugados y biológicamente activos. El proceso más importante para eliminar los esteroides es la degradación microbiana. La sorción y en menor medida la fotodegradación pueden desempeñar también un papel en la eliminación de estas hormonas. Por ejemplo el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) es oxidado a estrona ( $E_1$ ) en un primer paso. La vida media de este compuesto es de alrededor de 4 a 12 horas en agua y suelo aeróbico. Sin embargo, las tasas de degradación de las hormonas esteroideas en sedimentos anaeróbicos son mucho más pequeñas. La vida media de la degradación anaerobia del  $E_2$  está en el rango de decenas de días. Compuestos como la  $E_1$  y el  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $EE_2$ ) a menudo no pueden ser degradados en condiciones anaeróbicas, por lo tanto estas sustancias se acumulan en estos ambientes (Moschet 2009). Esto sumado a que estas hormonas ejercen su toxicidad sobre los organismos a concentraciones muy bajas (ng/L) pone de manifiesto las consecuencias ambientales que estos compuestos acarrearán (Batty & Lim 1999, Ying et al. 2002, Mills & Chichester 2005, Vajda et al. 2011, Jobling & Owen 2013).

En los ambientes acuáticos, los compuestos con actividad estrogénica provienen de una gran variedad de fuentes tales como papeleras, industrias, la actividad agrícola/ganadera y principalmente de los efluentes provenientes de plantas de tratamiento de líquidos cloacales (Johnson et al. 2005) (Fig. 1.1). Es importante destacar que los compuestos estrogénicos son

utilizados intensamente en terapias de sustitución de estrógenos, en anticonceptivos orales y en medicina veterinaria. En general, la lipofilidad de estas hormonas es suficientemente alta, por lo que una gran parte son removidas vía procesos de sorción en el tratamiento de aguas servidas y, por lo tanto, quedan retenidos en el lodo. Sin embargo, las bajas concentraciones que quedan en el efluente pueden ejercer efectos fisiológicos en la biota acuática (Henriquez Villa 2012).

Dentro de los xenoestrógenos también se incluyen a los fitoestrógenos y micoestrógenos (presentes en plantas y hongos, respectivamente), a los compuestos alquilfenólicos (surfactantes no iónicos), ftalatos y numerosos pesticidas (Desbrow et al. 1998, Korner et al. 2000).



**Fig 1.1.** Vías de ingreso de los xenoestrógenos en los ambientes acuáticos y biomagnificación dentro de los ambientes acuáticos (adaptado de Zaharin Aris et al. 2014).

La habilidad de los PEs para ejercer su acción puede depender de un gran número de factores inherentes a cada compuesto (potencia, eficacia y concentración), a la biota (estadio de vida, sensibilidad, movilidad del individuo) y/o a factores ambientales (presencia de otros PEs, estación del año, temperatura). Aunque las rutas de exposición a estos compuestos para la vida silvestre son diversas, el agua contaminada es una de las más importantes. Los organismos acuáticos pueden encontrarse expuestos crónicamente a bajas concentraciones de estas sustancias en el ambiente (Jobling et al. 1996, White et al. 1994). Los mismos ingresan en los individuos principalmente a través de las branquias, la superficie corporal y/o a través de la ingestión de alimentos contaminados (Lewis 1996, Tsuda et al. 2000, Van Der Kraack et al. 2001).

Si bien el mecanismo exacto a través del cual cada químico ejerce su función en los organismos es poco claro, se ha señalado que la concentración de esteroides circulantes en sangre, la esteroidogénesis y el metabolismo esteroideo hepático son susceptibles a sufrir alteraciones químicas inducidas, cuyos efectos dependen tanto de la dosis como de la especie expuesta (Milnes et al. 2006). Por otra parte, algunos trabajos han demostrado que los xenoestrógenos pueden alterar las secreciones hipotálamo-hipofisarias en machos, o la capacidad de las células de Leydig de sintetizar testosterona en cantidades y tiempo apropiado (Kime & Nash 1999), provocando alteraciones en la morfología de las gónadas, viabilidad de las gametas y por lo tanto afectando el comportamiento reproductivo (Kime & Nash 1999, Jalabert et al. 2000, Milnes 2006).

Los ambientes acuáticos que más preocupan respecto a la contaminación son aquellos donde las descargas de efluentes tienen un caudal significativo respecto al caudal del curso receptor (García et al. 2012). Esta situación es evidente en el Río Suquía (Córdoba, Argentina), el cual recibe la descarga puntual de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de la Ciudad de Córdoba (EDAR-Bajo Grande) y numerosos contaminantes provenientes de fuentes difusas (Wunderlin et al. 2001, Nimptsch et al. 2005, Contardo-Jara et al. 2009).

Diversos estudios han demostrado que la ciudad de Córdoba realiza el principal aporte de contaminantes a este río, provenientes de efluentes industriales, municipales, aguas de escorrentía y vertidos clandestinos, tanto industriales como domésticos. Esto provoca graves impactos ambientales que aceleran los procesos de degradación de la calidad de sus aguas, lo que repercute en 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, Hued et al. 2012, Guzmán et al. 2004, Cazenave et al. 2005,

Merlo et al. 2011, Monferrán et al. 2011, Guyón et al. 2012b, Maggioni et al. 2012). La contaminación de la cuenca del Río Suquía se acentúa aguas abajo de la Planta de tratamiento de residuos cloacales (PTRC) Bajo Grande, donde debido al constante volcamiento de los líquidos cloacales se ha detectado en agua y sedimento compuestos tales como, lindano, diclorobencenos y metales (Pesce & Wunderlin 2000, Monferrán et al. 2009, 2011, Merlo et al. 2011, Bonansea et al. 2013) como así también diferentes hormonas naturales y sintéticas y fármacos (estrona, dihidrotestosterona (Valdés et al. 2014). Por otra parte, la expansión de la frontera agrícola contribuye con el aporte al río de diversos pesticidas utilizados en los campos aledaños. A raíz de esto se han detectado compuestos tales como atrazina, endosulfán-sulfato, acetoclor, clorpirifos y cipermetrina, (Ballesteros et al. 2009, Merlo et al., 2011, Bonansea et al. 2012), algunos de los cuales presentan una reconocida actividad estrogénica (Kojima et al. 2004).

Dada la potencial amenaza que los xenoestrógenos representan para los organismos y sus poblaciones, en las últimas décadas se ha evidenciado un intenso esfuerzo global por identificar y desarrollar marcadores biológicos adecuados para el monitoreo de los recursos hídricos (Bayley et al. 1998, Vanderberg et al. 2012, Sun et al. 2013).

### **1.1.2. *Jenynsia multidentata* como bioindicador**

En estudios de evaluación ambiental es frecuente el uso de *bioindicadores* es decir especies o grupos de especies que nos brindan información sobre ciertas características físico-químicas, micro-climáticas, biológicas, funcionales y ecológicas del medio ambiente, o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio (van der Oost *et al.* 2003). El crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos acuáticos son eventos ecológicamente relevantes y sumamente sensibles a las alteraciones ambientales (Goede & Barton 1990). Entre los bioindicadores más utilizados se destacan los peces, ya que son sensibles a las alteraciones ambientales de los ecosistemas acuáticos. Estos organismos son blancos primarios para la acción de los PEs. La alta fecundidad que estos organismos presentan, sumado a la facilidad de exposición de los mismos a concentraciones de tóxicos conocidas, ya sea a través del agua o alimento, reflejan la importancia de estos organismos en el monitoreo de la degradación de ríos y lagos (Fausch et al. 1990). Así los peces se constituyen en excelentes bioindicadores de las potenciales amenazas que ejercen los PEs (Kime 1999, 2001). Debido a que el sistema

endocrino de los peces es similar al de los mamíferos es posible extrapolar y predecir riesgos en vertebrados superiores incluyendo los humanos (Ankley & Johnson 2004).

A pesar que en las últimas décadas se evidencia un marcado esfuerzo global por encontrar biomarcadores para la evaluación de los efectos de compuestos estrogénicos, este esfuerzo de investigación se ha limitado, en general, a un pequeño número de especies del hemisferio norte. Considerando que la mayoría de los cursos de agua recibe algún tipo de descarga de efluentes, industriales y/o rurales, se hace evidente la necesidad de identificar biomarcadores en peces nativos que puedan ser utilizados como centinelas, para contribuir a comprender como los PEs, pueden afectar parámetros reproductivos y finalmente impactar sobre las poblaciones naturales.

Dentro de los peces sudamericanos *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes), conocida vulgarmente como “orillero o madrecita de agua” (Fig. 1.2), posee importantes ventajas para ser utilizada como modelo ecotoxicológico. Es una especie de amplia distribución Neotropical, desde la ciudad de Río de Janeiro (Brasil) a la provincia de Río Negro (Argentina) (Malabarba et al. 1998), lo que posibilita su utilización como especie indicadora en estudios ambientales para una extensa área de América del Sur. Además, 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 puede ser fácilmente mantenida en condiciones de laboratorio. Su marcado dimorfismo sexual constituye una ventaja importante para el estudio de aspectos reproductivos. En particular los machos adultos presentan una modificación en la aleta anal, llamada gonopodio, la cual es utilizada para la transferencia de esperma durante la cópula.



**Fig. 1.2** Fotografía de un macho de la especie *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes).

El comportamiento reproductivo de *J. multidentata* ha sido descrito por Bisazza et al. (2000). Según estos autores, el comportamiento sexual de los machos es coercivo y estereotipado. Consiste exclusivamente en intentos de cópulas forzadas a través de embestidas con el gonopodio. Cuando los machos se acercan a las hembras, ellos se colocan inmediatamente detrás y debajo de la misma, para luego acercarse por un costado y de esta manera extender su gonopodio hacia delante para que poder contactar con el gonoporo de la hembra. Estas últimas usualmente se alejan para evitar ser copuladas y a menudo, bajo una intensa persecución, pueden reaccionar atacando a los machos.

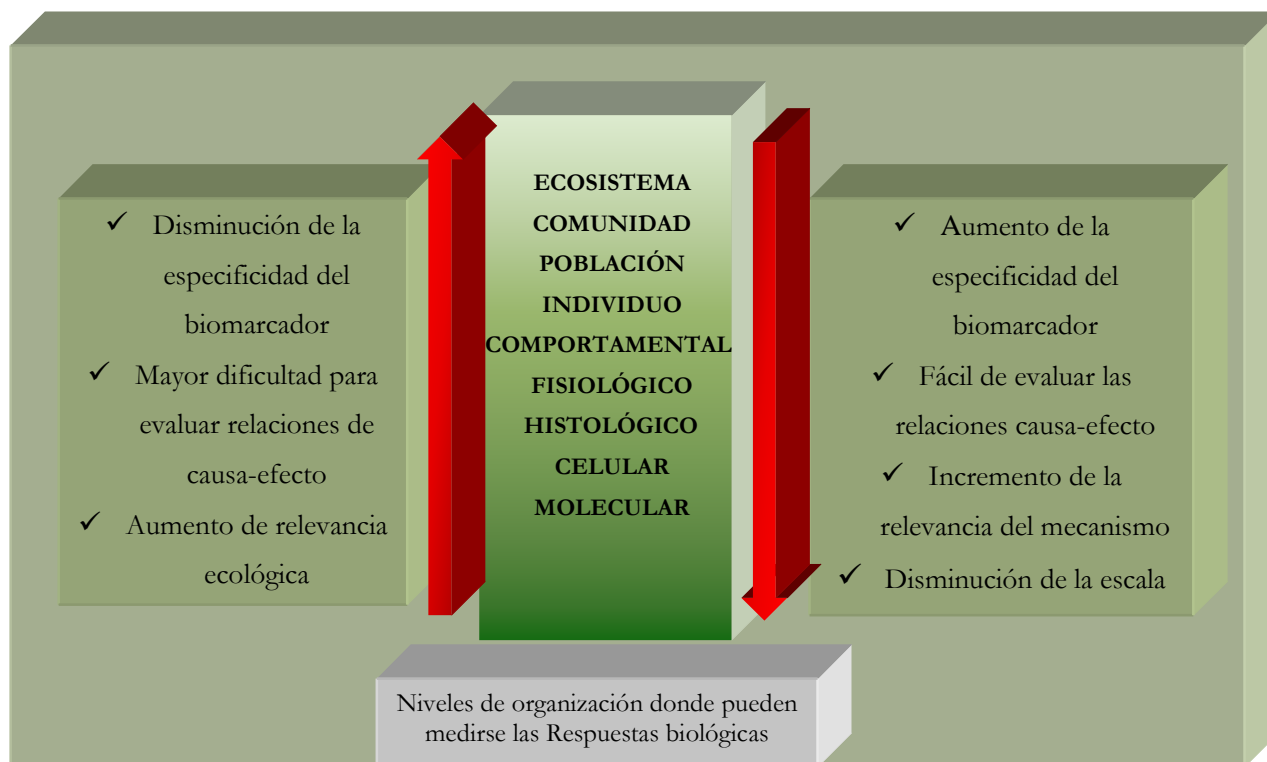
Debido a las características particulares de esta especie y a las ventajas que presenta para su utilización como especie bioindicadora, *J. multidentata* ha sido utilizada en diversos estudios con el fin de evaluar los efectos de diferentes compuestos químicos sobre diversos aspectos biológicos (Cazenave et al. 2005, 2008, Ballesteros et al. 2007, 2009a, 2009b, Pesce et al. 2008, Amé et al. 2009, Monferrán et al. 2011, Hued et al. 2012, 2013, Maggioni et al. 2012, Guyón et al. 2013).

### **1.1.3. Biomarcadores**

En un ambiente acuático degradado, los organismos están expuestos de manera crónica a los contaminantes, provocando en ellos cambios en las funciones fisiológicas antes que eventos de mortalidad en masa. De esta manera, los efectos que los tóxicos producen pueden medirse a través de respuestas detectables a distintos niveles de organización biológica (Fig 1.3). Estas respuestas se denominan *biomarcadores* y se definen como un cambio en la estructura celular o bioquímica, en la función o comportamiento que es medible en un organismo o parte del mismo (Di Giulio & Hinton 2008). Los biomarcadores indican una desviación del estado normal de la variable biológica en estudio y permiten detectar de manera temprana, las alteraciones de los recursos hídricos que pueden impactar en un futuro a los ecosistemas acuáticos (Hansen 2003, van der Oost et al. 2003).

Los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores de exposición y de efecto (van der Oost et al. 2003, Di Giulio & Hinton 2008). El primer tipo de ellos comprende a cualquier sustancia exógena, sus metabolitos o el producto de interacción del xenobiótico, que puede ser medido o detectado dentro de algún compartimiento en el organismo. Estos biomarcadores pueden ser utilizados para confirmar y evaluar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular, proveyendo una relación entre el medio externo

(exposición) y el medio interno (medición de una respuesta). Los biomarcadores de efecto, en cambio, se definen como un cambio en la estructura celular o bioquímica, función o comportamiento que es medible en un organismo o parte del mismo. El uso de estos marcadores biológicos permite brindar información sobre la salud de los organismos y de esa manera evaluar la calidad del agua de los recursos hídricos.



**Fig. 1.3.** Representación esquemática en orden secuencial de las respuestas al estrés de contaminación dentro de un sistema biológico. Extraído de Mussali-Galante et al. (2013).

Dentro de los biomarcadores de efecto, el comportamiento de los individuos relaciona los procesos fisiológicos con los ecológicos, por lo que lo convierte en una herramienta útil para el estudio de los efectos de la calidad del agua. Dado que el éxito reproductivo depende de la habilidad para desarrollar un comportamiento sexual apropiado, se ha sugerido que cambios en el comportamiento sexual evaluado tras una exposición a PEs, pueden predecir efectos a nivel poblacional (Bayley et al. 1999). Diversos estudios han demostrado que diferentes variables comportamentales ofrecen biomarcadores sensibles de exposición a compuestos estrogénicos, tales como, la disminución en la tasa e intensidad del comportamiento sexual, el

número de acercamientos hacia la hembra, cópulas exitosas y disminución en comportamientos de cortejo (Bayley et al. 1999, Bjerselius et al. 2001, Schoenfuss et al. 2002). De esta manera, la evaluación del comportamiento reproductivo de los peces brinda información útil sobre aspectos ecológicamente relevantes que pueden ser fácilmente observados y cuantificados (Scott & Slogan 2004, Söffker & Tyler 2013).

Además de la relevancia del comportamiento para una reproducción exitosa, los parámetros de calidad espermática son importantes en la capacidad de fertilización de los organismos. El recuento espermático, viabilidad y parámetros dinámicos tales como porcentaje de motilidad y velocidad han sido utilizados para evaluar los efectos de diversos contaminantes sobre la calidad espermática (Haubruge et al. 2000, Van Look & Kime 2003, Rurangwa et al. 2004).

Por otra parte, los índices órgano-somáticos, proveen una estimación relativamente simple y rápida sobre la salud general del pez en su ambiente. Los patrones de variación en sus valores pueden reflejar alteraciones bioquímicas y fisiológicas debidas a cambios en la calidad del medio que los rodea (Goede & Barton 1990). Entre ellos, el factor de condición de Fulton (K), relaciona el peso total del pez con su longitud (Fulton 1904). En general, cuanto mayor es K, mayor es el contenido de grasa del pez y por consiguiente hay más energía disponible para utilizar en los diferentes procesos (Neff & Cargnelli 2004). El índice Hepatosomático (IHS) relaciona la masa del hígado respecto a la masa del pez y se utiliza de manera general para evaluar el estado reproductivo y el daño hepático (Schweer 2002). Se ha observado un incremento en el valor de IHS en peces expuestos a diversas sustancias, entre ellos a compuestos estrogénicos (Herman & Kincaid 1988, Nimrod & Benson 1996, Thorpe et al. 2000, Harries et al. 1997). Este incremento ha sido relacionado a procesos de síntesis de vitelogenina, a la hipertrofia e hiperplasia de las células hepáticas en relación a la activación de procesos de detoxificación (Van Boheman et al. 1998, Almeida et al. 2005). Estos últimos autores interpretan la disminución del IHS, como una depleción de las reservas de glucógeno en el hígado relacionadas con el aumento en la demanda de energía producto del estrés producido por la contaminación.

Por otro lado, el índice Gonadosomático (IGS) relaciona la masa de las gónadas respecto a la masa del pez y es utilizado para identificar estadios reproductivos y detectar alteraciones en estos órganos. Tanto machos como hembras son susceptibles a los efectos de los PE, y en ambos sexos se ha registrado una disminución en el valor del IGS en peces expuestos a xenoestrógenos (Jobling et al. 1996, Christiansen et al. 1998, Kinnberg et al. 2000, Sohoni et al. 2001, Toft et al. 2001, Schweer 2002, Martyniuk 2006, Velasco Santamaria et al. 2010). La



inhibición del crecimiento de los testículos en los machos es un biomarcador muy utilizado ante una exposición a estrógenos. Diversos estudios han demostrado una correlación entre la potencia estrogénica de un PE y el grado de inhibición de crecimiento de los testículos, registrándose hasta un 50 % de reducción en el crecimiento de estos órganos (Billard et al. 1981, Jobling et al. 1996).

Los xenoestrógenos pueden actuar inhibiendo la espermatogénesis, actuando en uno o más niveles de la cascada de hormonas que regulan el desarrollo de los testículos. Existen numerosos trabajos que reflejan diversos problemas reproductivos en peces expuestos a xenohormonas tales como: alteraciones en el proceso de espermatogénesis (Metcalf et al. 2001, Van den Belt et al. 2003, Martyniuk et al. 2006, Velasco-Santamaria et al. 2010), cambios en la histología gonadal como variaciones en la proporción de tipos celulares (Weber et al. 2003, Pawlowsky et al. 2004, Silva et al. 2012), muerte de células germinales e hipertrofia de células de Sertoli (Kinnberg et al. 2000), disminución del esperma eyaculado o de la movilidad espermática (Gronen et al. 1999, Baatrup & Junge, 2001, Bayley et al. 2002, Van den Ven et al. 2003) e incluso presencia de ovocitos en testículos (Gray & Metcalfe 1997, Metcalfe et al. 2001).

Las alteraciones anteriormente detalladas pueden afectar la reproducción de los organismos y por ende las poblaciones naturales tal como fue evidenciado por Kidd et al (2007) en un trabajo a gran escala, reflejando las implicancias ambientales de la exposición crónica a compuestos xenoestrogénicos.

De acuerdo a los antecedentes mencionados sobre la presencia de compuestos con actividad estrogénica en la cuenca del Río Suquía y el efecto que los mismos pueden producir en los peces, el propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto de xenoestrógenos sobre diferentes aspectos de la biología reproductiva de la especie íctica *J. multidentata*, a través de ensayos de laboratorio y a campo.

## OBJETIVOS

### *1.2.1. Objetivo general*

Evaluar la respuesta de diversos biomarcadores reproductivos en machos de la especie ictica autóctona *Jenynsia multidentata*, expuestos a compuestos de diferente naturaleza química con actividad estrogénica, en condiciones de laboratorio y a campo.

### *1.2.2 Objetivos específicos*

1. Caracterizar parámetros morfológicos y dinámicos de espermatozoides en individuos de *J. multidentata* bajo condiciones controladas de laboratorio y a campo.
2. Evaluar alteraciones en el comportamiento reproductivo a través de diferentes parámetros de actividad sexual en machos de *J. multidentata* expuestos a xenoestrógenos en ensayos de laboratorio y a campo.
3. Determinar cambios en parámetros morfológicos y dinámicos de espermatozoides de *J. multidentata* expuestos a compuestos xenoestrogénicos en laboratorio y en individuos provenientes de sitios contaminados.
4. Evaluar cambios histológicos y ultraestructurales en testículos de individuos de *J. multidentata* expuestos a xenoestrógenos en ensayos de laboratorio y a campo.
5. Determinar cuáles son los biomarcadores de exposición más sensibles ante la exposición de compuestos estrogénicos.

## 1.3. HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO

La exposición a xenoestrógenos provoca en machos de la especie *J. multidentata*, alteraciones en el comportamiento sexual, parámetros espermáticos y diversos daños histológicos en gónadas, las cuales podrán ser utilizadas como biomarcadores de la presencia de compuestos con actividad estrogénica en agua.



## *CAPÍTULO II*

*Estructura histológica del testículo y caracterización de parámetros  
espermáticos de *J. multidentata* en condiciones controladas de  
laboratorio.*

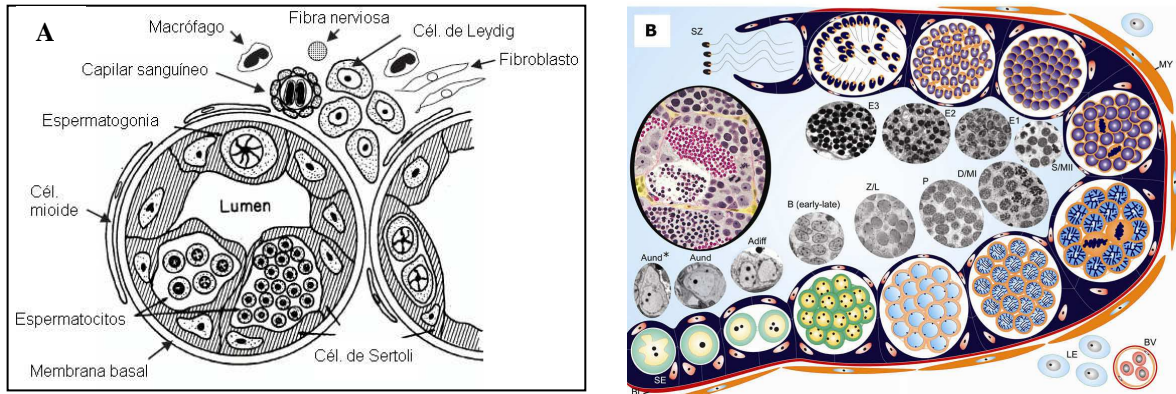
## 2.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la gran variabilidad de estrategias reproductivas presentes en peces, la organización básica del testículo en este grupo se encuentra notablemente conservada. Los testículos están envueltos por una capa de tejido conectivo llamada cápsula testicular. Como ocurre en otros vertebrados, estos órganos están constituidos por un compartimento germinal e intersticial, ambos separados por una membrana basal. El primero comprende un epitelio seminífero compuesto por células germinales y células somáticas (células de Sertoli). El segundo, está compuesto por tejido conectivo que contiene células esteroideogénicas (células de Leydig), fibroblastos, fibras colágenas, células mioides, células sanguíneas, vasos sanguíneos y fibras amielínicas. Una membrana basal separa al epitelio germinal del intersticio (Grier 1993, Lo Nostro et al. 2004, Grier & Uribe Aranzabal 2009) (Fig. 2.1. A-B).

La supervivencia de las células germinales y su desarrollo durante la espermatogénesis depende estrictamente de su íntima asociación con las células de Sertoli, sin embargo a diferencia de mamíferos, las células de Sertoli no envían prolongaciones citoplasmáticas que separen las células germinales (Loir et al. 1995). En los peces (y otros amniotas vertebrados), la etapa inicial de una unidad de este tipo es una sola espermatogonia primaria que está envuelta por unas pocas células de Sertoli. Dicha unidad se denomina espermatocisto, y estos forman el epitelio germinal del testículo de peces teleósteos. Las células germinales que se dividen sufren una citocinesis incompleta, de modo que los puentes citoplasmáticos conectan las células hijas, formando un clon de células isogénicas, lo que permite que todas se encuentren en la misma etapa de diferenciación. (Loir et al. 1995).

Se describen en peces diferentes fases del ciclo espermatogénico (Fishelson et al. 2006). La *espermatocitogénesis*, que incluye la maduración mitótica y la división de las células germinales con la consiguiente formación de las espermatogonias B, la *espermatogénesis*, que incluye la formación de espermatocistos a través de extensiones de las células de Sertoli y la división meiótica y maduración de los espermatocitos, y la *espermiogénesis* que incluye la maduración de las espermátidas-espermatozoides. El proceso de espermatogénesis presenta patrones característicos con una limitada variación estructural entre las especies animales. Sin embargo los procesos de espermiogénesis y la estructura de los espermatozoides muestran una gran diversidad de variaciones morfológicas que pueden ser explicadas por la diversidad de modos de reproducción. Por ejemplo la espermiación en peces con fecundación externa sucede luego de la maduración del esperma, mientras que en peces que presentan fecundación interna las

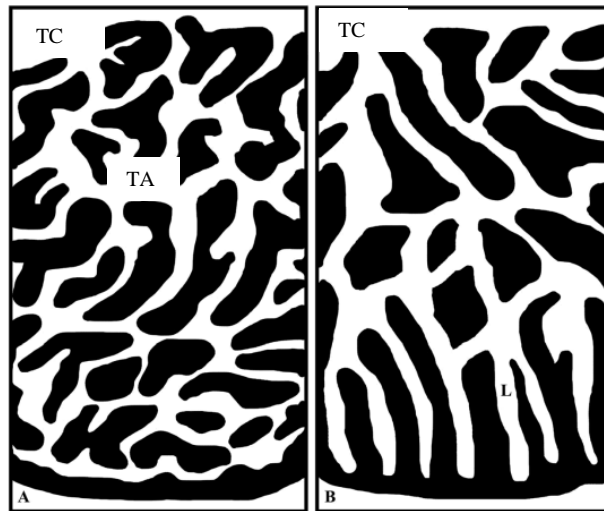
células son liberadas en un estadio de espermátide, donde la maduración final sucede en vesículas seminales o es espermatozeugma en caso de que este se forme (Lahsteiner & Patzner 2009).



**Fig. 2.1** Representaciones gráficas de testículo de peces. Los segmentos de túbulos espermatogénicos son mostrados para ilustrar las diferencias entre la relación de células Sertoli/germinales. El epitelio germinal contiene células de Sertoli (SE) y células germinales delimitadas por una lámina basal y células peritubulares mioideas (MY). Se muestran células de Leydig y vasos sanguíneos (BV). **(A)** Representación gráfica de la composición del tejido seminífero e intersticial modificada de Billard et al. 1982; **(B)** Representación gráfica de un tipo testicular donde se observa la distribución de cistos dentro del túbulo. Espermatogonias A indiferenciadas (Aund), Espermatogonias A diferenciadas (Adiff), espermatogonia tipo B (b), espermatocitos primarios en leptotene/cigotene (L/Z), espermatocitos paquítenicos (P), espermatocitos diploténicos en metafase I (D/MI), espermatocitos secundarios en metafase II (S/MII). Extraído de Lahsteiner & Patzner 2009

La espermatogénesis dentro del testículo toma lugar en el epitelio germinal, el cual se encuentra organizado en divisiones lobulares compuestas por tubos o sacos ciegos. En peces teleosteos los testículos pueden presentar dos tipos principales de organización de acuerdo a la disposición del compartimento germinal: tubular anastomosado y lobular, tipologías que muestran una clara distribución filogenética (Parenti & Grier 2004) (Fig. 2.2).

Los testículos tubulares anastomosados se encuentran presentes en los taxa menos evolucionados tales como Acipenseriformes, Cypriniformes y Salmoniformes. En ellos los compartimentos germinales no están presentes en la periferia del órgano y los túbulos forman rulos interconectados de aspecto muy irregular, formando una red anastomosada. La cápsula testicular está bien desarrollada y los espermatocitos no guardan un ordenamiento sino que se disponen entremezclados y por consiguiente se pueden encontrar cistos en distintos estadios de desarrollo a cualquier altura del lóbulo (Parenti & Grier, 2004, Lahsteiner y Patzner, 2009) (Fig. 2.2A y 2.3 A).



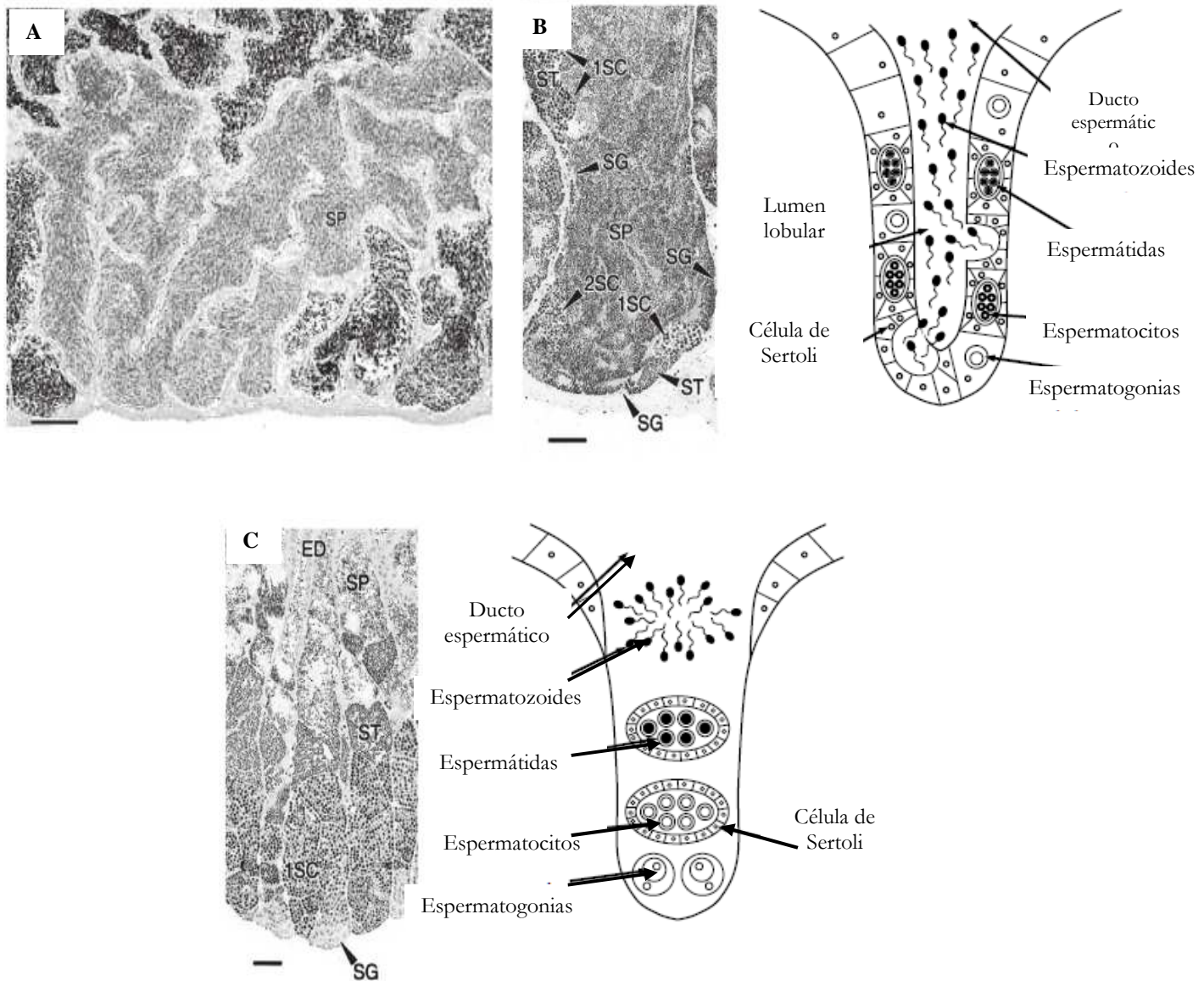
**Fig. 2.2.** Esquema general de la estructura de los dos diferentes tipos de testículos **(A)** testículo tubular anastomosado **(B)** testículo lobular. Referencias TC: túbulo colector, TA: sistema tubular anastomosado y L: lóbulo. Extraído de Dietrich & Krieger (2004).

En los testículos lobulares los lóbulos se desarrollan desde la periferia del testículo hacia el ducto central (Fig. 2.2 B). Los cistos, que contienen las células espermáticas, se desarrollan a lo largo de la longitud del lóbulo, mientras que los espermatozoides maduros son finalmente liberados dentro de una cavidad o lumen central (Dietrich & Krieger 2004). Los testículos lobulares a su vez pueden clasificarse en restringidos o irrestringidos de acuerdo a la disposición de los cistos a lo largo de los lóbulos (Fig. 2.3 B-C). En el testículo lobular irrestringido, el compartimiento germinal se extiende cerca de la túnica albugínea, terminando ciegamente cerca de la periferia de la formación de un lóbulo. Cada lóbulo se abre en el conducto testicular. Los cistos espermáticos permanecen en aproximadamente la misma posición a lo largo del lóbulo a medida que se desarrollan. Cistos en diferentes etapas de desarrollo se distribuyen a través de los lóbulos, sin ningún patrón espacial evidente de distribución. Los lóbulos presentan una luz virtual hacia la que se abrirán camino los espermocistos y donde serán liberados los espermatozoides durante el proceso de espermiación (Grier 1993, Parenti & Grier 2004; Grier & Uribe Aranzabal 2009) (Fig. 2.3B).

Finalmente el taxa Atherinomorpha, grupo al cual pertenece la especie en estudio, se caracteriza por presentar un testículo lobular restringido. La característica definitoria de este testículo es que las espermatogonias sólo se producen alrededor de los extremos ciegos de los lóbulos, cerca de la túnica albugínea y a medida que la espermatogénesis progresa, los cistos migran hacia los conductos testiculares y liberan los espermatozoides en ellos. Así, dentro de los lóbulos, los distintos estadios de la espermatogénesis se encuentran en orden creciente de

maduración. Las espermatogonias A, rodeadas por procesos de las células de Sertoli, se encuentran en el extremo ciego del lóbulo. A continuación espermatocistos conteniendo las espermatogonias B, luego los espermatocitos primarios y secundarios y finalmente las espermátidas y espermatozoides. En este tipo de testículo los lóbulos son sólidos y no poseen luz (Grier 1981, 1993, Parenti & Grier 2004) (Fig 2.3C).

Las tres modalidades diferentes de testículos muestran un patrón filogenético claro, pero aún no se conoce si estas diferencias tienen un significado adaptativo en relación con la producción de esperma (Parenti & Grier 2004). Una característica que distingue a los teleósteos de mamíferos, es que en peces se repone la población de células de Sertoli. Esto, sumado a la reposición mitótica de espermatogonias, evidencia que el epitelio germinal está activo durante toda la vida del individuo.



**Fig. 2.3.** Microfotografías de cortes de testículo y representación esquemática donde puede observarse la distribución del epitelio germinal a lo largo de un testículo **(A)** tubular anastomosado. Se evidencian túbulos continuos e interconectados. Esta imagen corresponde a un pez reproductivamente activo, donde prevalecen espermatozoides maduros. No se observan células germinales en desarrollo, **(B)** lobular irrestricto donde se observan células en distinto estadio de desarrollo a lo largo de la longitud del lóbulo y **(C)** lobular restricto donde se observan como los estadios espermatogénicos van madurando a lo largo del lóbulo desde la periferia hacia la región central, donde son liberados en el ducto espermático. (Figuras y esquemas extraídos de Nagahama 1983 y Norris & Lopez 2004).

Al igual que en los demás vertebrados, la espermatogénesis en peces comienza cuando las células germinales son estimuladas por las gonadotropinas pituitarias, las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), para seguir dos vías: la de renovación (atravesando



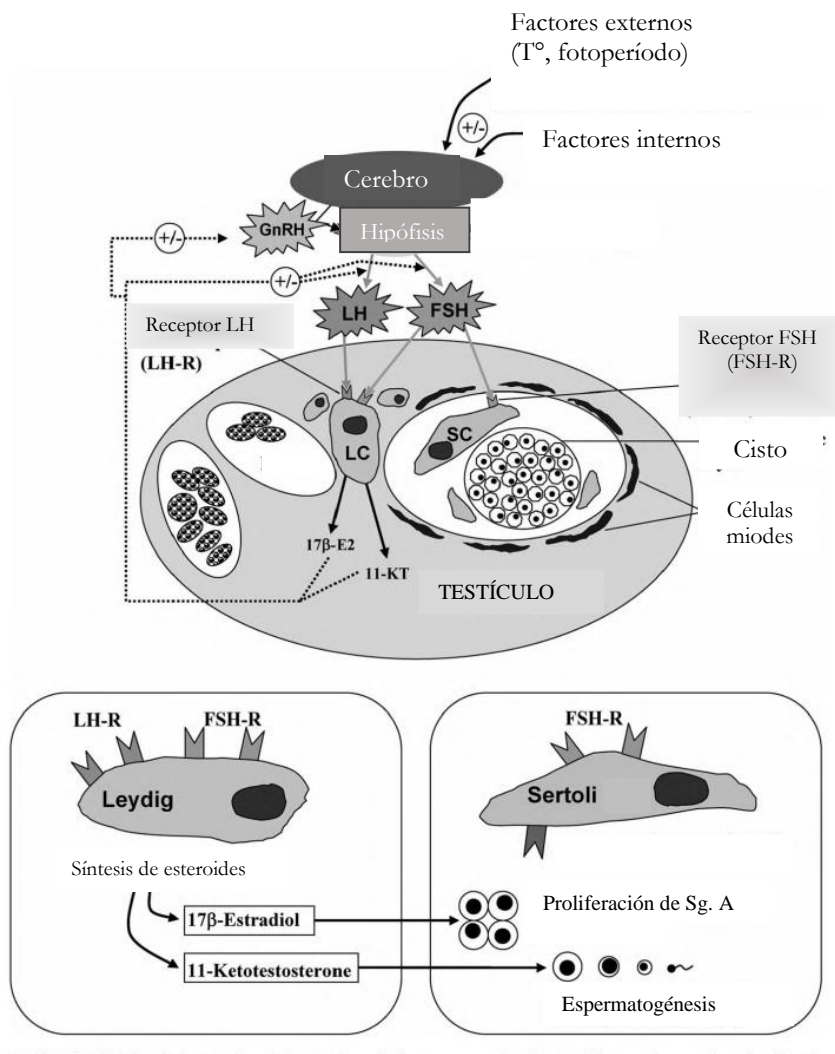
procesos de mitosis o meiosis) o de maduración. La hormona FSH actúa en los estratos primordiales de espermatogonias mientras que la hormona LH en los estadios finales. A diferencia de los amniotas, tanto en peces como anfibios la espermatogénesis sucede en cistos formados por células de Sertoli (Schulz et al. 2010).

En las figuras 2.4 y 2.5 se muestran las diferentes hormonas que regulan el proceso espermatogénico. Los Andrógenos y la FSH son las hormonas más importantes que regulan la espermatogénesis. La principal función de estas hormonas es permitir a las células de Sertoli crear un microambiente que responda a las necesidades cambiantes de las células germinales durante su desarrollo (Schulz et al. 2002). Un papel importante de la FSH es que modulan la liberación de factores de crecimiento las células de Sertoli tales como factores de transformación  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Miura et al. 2002), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (LeGac et al. 1996), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Watanabe & Onitake 1995) que participan en sistemas de señalización tanto autócrina como parácrina.

A diferencia de mamíferos, donde los estrógenos cumplen un papel relevante en la espermatogénesis, en peces esta proliferación está fuertemente influenciada por la acción de andrógenos, particularmente la 11-ketosterona (11-KT) y es necesario un correcto balance entre la testosterona (T) y la 11-KT, porque se ha visto que la T puede inhibir diversos pasos de la espermatogénesis, ya que ejerce un efecto inhibitorio en la liberación de la FSH y la esteroidogénesis, mientras que luego de la conversión a E<sub>2</sub> juega un rol más directo estimulando la renovación de las células madre (Miura et al. 1991, 1999, Cavaco et al. 2001). Durante la espermatogénesis, bajas dosis de E<sub>2</sub> estimulan la renovación de espermatogonias (Sg), la hormona 11-KT controla la maduración de los células mientras que la 17,20 dihidroxiprogesterona es crítica para el comienzo de meiosis y para la espermiación (Schulz & Miura 2002) (Fig. 2.5). Se ha visto que muchos mensajeros químicos pueden influenciar en diversas funciones testiculares (Le Gac et al. 1996).

La duración total del proceso de espermatogénesis y el número de veces que las Sg se dividen se encuentra determinado por el genoma de las células germinales (França et al. 1998). En vertebrados no amniotas, se conoce que la temperatura es un factor que influye en la duración de este ciclo. En peces vivíparos se ha estimado el ciclo espermatogénico es de alrededor de 30 días para las especies *Gambusia affinis* (Koya & Iwase 2004) y para *Poecilia reticulata* (Billard & Escaffre 1969). Billard (1969) estimó que en *P. reticulata* las Sg atraviesan 14 ciclos de divisiones mitóticas mientras que la transición de Sc a St requiere 4.6 días y de St a Sz 9.7 días a 25°C.

Es de destacar que en peces, a diferencia de los mamíferos, la solidez de la barrera testicular varía a lo largo del ciclo espermático (Batlouni et al. 2009). Sólo los cistos que contienen células haploides presentan uniones estrechas entre las células de Sertoli, formando así una barrera que protege a estas células espermáticas de los compuestos químicos que pudieran existir en el plasma. Sin embargo este tipo de uniones no existen en estadios primordiales, lo que provoca que las espermatogonias queden expuestas a cualquier compuesto químico que se encuentre en el plasma, como pueden ser los PEs.



**Fig. 2.4.** Esquema que sintetiza las diferentes hormonas que regulan el proceso espermático y la síntesis de hormonas esteroideas en el testículo de peces (extraído de Norris & Lopez 2010).



La caracterización del testículo y la morfología espermática no solo es importante en estudios de sistemática y filogenia, sino que además tiene numerosas aplicaciones prácticas relacionadas con la fertilización y preservación de esperma (Furbock et al. 2010) y es clave para el entendimiento de los efectos de compuestos tóxicos sobre la reproducción de las especies.

El orden Cyprinodontiformes, que comprende a la especie en estudio, incluye varias especies con fecundación interna (Parenti 2005). Dentro del mismo, la mayor parte de los trabajos sobre las características espermáticas se han centrado en la familia *Poeciliidae* (Constantz 1984, Meffe & Snelson 1989, Meyer & Lydeard 1993, Evans et al. 2003), mientras que para la familia *Anablepidae* se ha descrito la ultraestructura del espermatozoide de *Anableps anableps* (Greven & Schmahl 2006). En la especie *Jenynsia multidentata* solo se ha descrito la estructura del testículo y las características básicas de la ultraestructura del espermatozoide (Grier et al. 1981, Dadone & Narbaitz 1967), no conociéndose en detalle la organización testicular, el proceso espermatogénico, ni medidas morfométricas y dinámicas de los espermatozoides. Los machos de esta especie presentan un gonopodio tubular formado por todos los radios de la aleta anal (Turner 1950, Grier et al. 1981, Malabarba et al. 1998). Por lo tanto los espermatozoides no son empaquetados en espermátóforos como sucede en los Poecílidos, aunque son liberados junto a material mucilaginoso (Grier et al. 1981).

En los últimos años diversos parámetros espermáticos tales como el recuento espermático, viabilidad, y análisis de velocidad de espermatozoides han sido utilizados para caracterizar aspectos reproductivos de peces. Estos parámetros adquieren suma importancia en estudios de acuicultura y reproducción artificial de especies.

A partir de lo expuesto, en el presente capítulo se propone describir la histología y ultraestructura del testículo de *J. multidentata* y caracterizar parámetros morfológicos y dinámicos de sus espermatozoides, a través de un simple protocolo de recolección de esperma apropiado para la especie en estudio. Estas caracterizaciones nos permitirán adquirir un conocimiento de base para evaluar a continuación los efectos producidos por los xenoestrógenos.

## 2.2. METODOLOGÍA

### 2.2.1. Recolección de especímenes

Machos adultos de *J. multidentata* fueron recolectados durante la época reproductiva Septiembre 2008 a Febrero de 2009 en el Río Yuspe, provincia de Córdoba (31° 14' S; 64° 31' W), área caracterizada por la buena calidad de sus aguas (Pesce y Wunderlin, 2000; Hued y Bistoni, 2005). Los ejemplares fueron capturados con un equipo de pesca eléctrica y transportados en bidones de 15 litros al laboratorio para su aclimatación por un lapso de 15 días en condiciones controladas de temperatura (21° C) y fotoperíodo (12:12 horas luz/oscuridad). Se les suministró alimento deshidratado en escamas dos veces al día.

### 2.2.2. Histología del testículo

Las gónadas procedentes de 20 individuos (longitud estándar  $27.34 \pm 2.32$  mm; peso corporal  $0.403 \pm 0.172$  g) fueron fijadas en formaldehído al 10% y posteriormente procesadas según técnicas histológicas de rutina y teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). Los cortes fueron examinados con microscopio óptico (Olympus® CX31), el cual se encuentra acoplado a una cámara fotográfica (MotiCam). De cada corte histológico se analizaron tres fetas longitudinales de 4-6  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidas de la región central del testículo, a partir de las cuales se determinó el porcentaje de estadios primordiales (espermatogonias y espermatoцитos) y estadios maduros (espermátidas y espermatozoides).

### 2.2.3. Ultraestructura del testículo

Para el análisis ultraestructural del testículo muestras de 5 individuos fueron fijadas con una solución de glutaraldehído (2%) y formaldehído (4%) y preparadas para su visualización mediante microscopía electrónica de transmisión según protocolo establecido por el centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Córdoba. Brevemente, cada muestra fue embebida en buffer cacodilato 0.1 M durante 2 horas, posteriormente fijada con tetraóxido de osmio al 1%, deshidratadas y embebida en Araldito. Con ultramicrotomo JEOL JUM-7 se obtuvieron secciones finas que fueron montadas en grillas de níquel, contrastadas con alcohol uranil acetato seguido de citrato y examinadas con microscopio electrónico Zeiss LEO 906E.

#### 2.2.4. Obtención y tratamiento de muestras de semen

Para la caracterización de parámetros espermáticos fueron procesados 45 machos adultos (longitud estándar  $28.83 \pm 3.41$ mm; peso corporal  $0.479 \pm 0.131$ g). Las muestras de espermia fueron obtenidas de acuerdo a la técnica propuesta por Matthews et al. (1997) con modificaciones. Cada individuo fue anestesiado mediante inmersión en triclaína metanosulfato MS222 (5g/l). El gonopodio fue colocado dentro de un tubo microcapilar y se masajeó la zona abdominal desde la mitad del abdomen hasta el inicio del gonopodio, de manera de favorecer la salida del espermia hacia el tubo. Posteriormente se lavó el gonopodio con 80  $\mu$ l de medio HAM F-10 en tubo de microcentrífuga, con el fin de recuperar el semen. Se procedió de la misma manera para recuperar la solución contenida en el microcapilar. Con ayuda de una micropipeta se provocó la separación de los espermatozoides.

Cabe destacar que se realizaron pruebas con dos medios diferentes: PBS y HAM F-10 de manera de seleccionar el más adecuado. Se registró la viabilidad de los espermatozoides en ambos medios registrándose los mayores porcentajes de viabilidad ( $79 \pm 8.4$  %) en HAM F-10 frente a  $45 \pm 10.4$  % para PBS ( $n= 5$ ). Por consiguiente todo el estudio fue realizado utilizando el primer medio.

#### 2.2.5. Parámetros espermáticos

Una vez obtenida la muestra se procedió a determinar parámetros de motilidad espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y recuento espermático. Debido a que la temperatura es un factor clave que incide de manera directa en la motilidad espermática (Rurangwa et al. 2004, Hadi Alavi & Cosson 2005), se analizaron 5 rangos de temperatura (ver tabla 1). Para ello cada muestra obtenida de 10 individuos fue colocada en medio HAM F-10 y mantenida a una temperatura específica.

Los diferentes parámetros de motilidad espermática de los espermatozoides de *J. multidentata* no mostraron diferencias significativas entre las temperaturas ensayadas (Tabla 2.1). A partir de lo registrado y teniendo en cuenta la temperatura utilizada en el laboratorio para la aclimatación, se eligió trabajar a  $21 \pm 2^{\circ}$ C.

Temperatura	VL	VCL	LIN	% Cél. Vivas
10 ± 2°C	81.89 ± 13.19	87.20 ± 14.10	94.00 ± 1.00	60.54 ± 8.49
16 ± 2°C	68.49 ± 15.85	72.22 ± 16.02	94.60 ± 1.70	52.21 ± 20.08
21 ± 2°C	76.21 ± 18.67	85.17 ± 22.07	95.50 ± 1.90	62.71 ± 20.00
26 ± 2°C	74.23 ± 21.53	78.12 ± 20.30	94.56 ± 2.70	57.27 ± 20.25
32 ± 2°C	50.21 ± 39.56	53.51 ± 41.77	70.00 ± 2.70	40.84 ± 12.14

**Tabla 2.1** Parámetros espermáticos de machos adultos de *J. multidentata* obtenidos a diferentes temperaturas del medio HAM F-10. Media ± D.E.;  $n = 4$ . Referencias: VL, velocidad lineal expresado en  $\mu\text{m/s}$ ; VCL, velocidad curvilínea expresado en  $\mu\text{m/s}$  y LIN- linealidad VL/VCL.

#### 2.2.5.1. Motilidad espermática.

Inmediatamente finalizada la extracción del espermatozoide se tomó una alícuota de 12  $\mu\text{l}$  de la muestra y se la colocó en un portaobjeto. La misma fue analizada a través de un sistema de videomicroscopía integrado por un microscopio de contraste de fase (Olympus® CX41) junto con una cámara digital (ICAM 1500; Labomed). Se registraron diferentes campos consecutivos de 5 segundos de duración. El tiempo total de filmación fue de 4 minutos. Cuando las muestras contenían una gran concentración de espermatozoides se realizó una dilución 1 en 100.

Los siguientes parámetros dinámicos fueron evaluados a través de videomicroscopía y análisis computarizado de imágenes (Fabro et al. 2002):

*Velocidad Lineal (VL)* ( $\mu\text{m/s}$ ): Distancia total que el espermatozoide recorrió, medida en línea recta desde el comienzo hasta el final de su trayectoria en el tiempo analizado.

*Velocidad Curvilínea (VCL)* ( $\mu\text{m/s}$ ): determinada como la longitud total de la trayectoria marcada por la célula en el tiempo de análisis.

*Linealidad (LIN)*: Representa el cociente entre la VL y la VCL. Este valor es adimensional y su rango varía de 0 y 1.

#### 2.2.5.2. Viabilidad espermática

La viabilidad de los espermatozoides fue analizada utilizando el test de tinción eosina-Y (WHO, 2010). En espermatozoides vivos, las cabezas se observan de color blanco/amarillento ya que por presentar sus membranas celulares íntegras no absorben el colorante.

Contrariamente, los muertos presentan una tonalidad rosada ya que absorben el colorante debido a la ruptura de sus membranas celulares. Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos 10  $\mu\text{l}$  de la muestra fueron colocados en un portaobjeto. Se le adicionó 1  $\mu\text{l}$  de eosina (0.5% peso/vol) y se mezcló suavemente para favorecer la distribución uniforme del colorante. Un minuto luego de la adición de la eosina la muestra fue cubierta con un cubreobjeto y examinado bajo microscopio óptico (100x). Se contaron 100 células al azar determinando el número de células vivas (móviles e inmóviles) y muertas.

#### 2.2.5.3. Recuento espermático

Se realizó una dilución 1:10 de la muestra con agua destilada con el fin de inhibir la motilidad de los espermatozoides y facilitar así su posterior contaje. Se determinó la concentración de los mismos en la cámara de Neubauer contando los espermatozoides en ambas grillas de la retícula de conteo. Los dos valores obtenidos fueron promediados. Se calculó la cantidad total de espermatozoides por microlitro de muestra. Debido a que en esta especie no se forman paquetes espermáticos se dificulta el cálculo del volumen final del eyaculado. Sin embargo, se determinó como volumen aproximado de semen obtenido en todas las muestras 2 $\mu\text{L}$ , marcando el nivel del fluido dentro del microcapilar.

#### 2.2.5.4. Morfometría de los espermatozoides

Veinte microlitros de cada muestra fueron fijados con formaldehído al 2% y luego teñidos con azul de Coomassie (220% peso/volumen) para posteriormente ser examinadas a 1000x bajo microscopio óptico (Olympus® CX31) y microfotografiadas utilizando una cámara digital (Moticam 2300). Se determinó longitud total de los espermatozoides (*LT*), de la cabeza (*LC*) y de la pieza media (*LPM*), mediante el software Image J (ver. 1.42q, NIH, USA). Se analizaron 20 espermatozoides por muestra y se obtuvo un valor promedio para cada individuo.

No fue posible realizar microscopía electrónica sobre las muestras de esperma debido al escaso volumen obtenido (aún realizando un pool con muestras de 5 individuos). Por consiguiente, para corroborar las mediciones a nivel ultraestructural, los gonopodios de 5 machos adultos fueron procesados de acuerdo a los protocolos de microscopía electrónica de la Universidad Nacional de Córdoba (detallado en la sección 2.2.3). De esta manera se asegura encontrar espermatozoides maduros. Se obtuvieron microfotografías de 10 espermatozoides



maduros por individuo, donde se registraron las medidas de LT, LC y LPM según lo descripto anteriormente. Para asegurar una adecuada medición, sólo se consideraron aquellos espermatozoides en los que se pudo observar una correcta inserción del flagelo en la cabeza.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

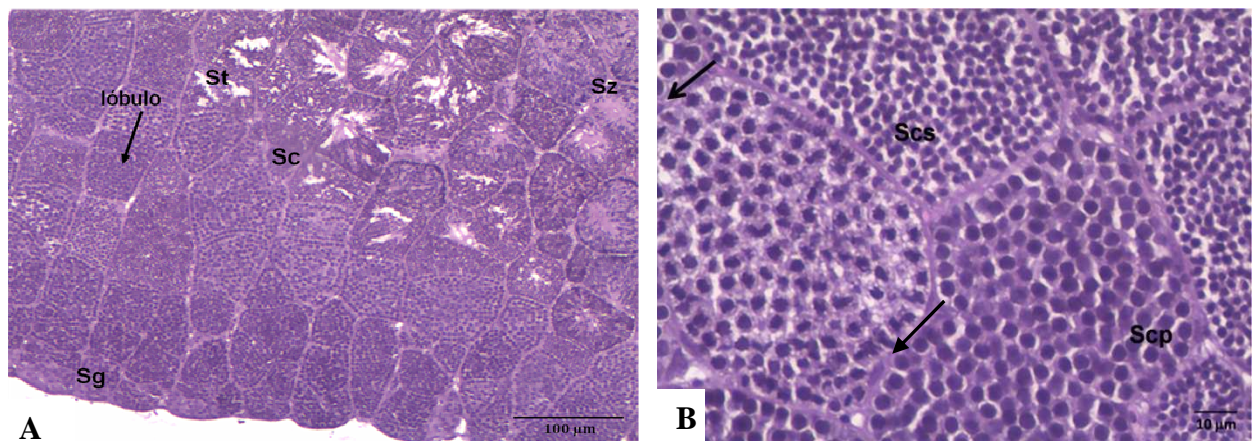
### 2.3.1. Histología del testículo de *J. multidentata*

La estructura histológica básica del testículo de *J. multidentata* ha sido descrita por Grier et al. (1980) y Parenti & Grier (2004). Estos autores señalan que el testículo en esta especie es un órgano bilobulado localizado en la región posterior de la cavidad corporal a dorsal del tubo digestivo rodeado del epitelio mesenterial. La pared está formada por una envoltura túnica albúginea de tejido conectivo, debajo de la cual se extiende el epitelio germinal. Este epitelio se compone de células madres gametogénicas y células de Sertoli primordiales. La espermatogénesis dentro de los testículos ocurre en el epitelio germinal, el cual se encuentra dividido en lóbulos compuestos de túbulos cerrados o sacos. Tal como se mencionó anteriormente, esta especie presenta un testículo lobular restringido, al igual que en otros Atherinomorpha, no hay lumen entre los lóbulos, y en su lugar se disponen las células de Sertoli encargadas de conformar los bordes de los espermatocitos, formando puentes entre los lóbulos. En este tipo de modelo, las células espermatogénicas se organizan en cistos periféricos (también denominados espermatocistos), los cuales subsecuentemente aumentan de tamaño y se extienden a lo largo del lumen del túbulo a medida que la espermatogénesis ocurre (Fig. 2.6 A-B). Cada cisto se halla formado por una célula de Sertoli que rodea a un clon de células germinales en el mismo estadio espermático y maduran de manera sincrónica mientras migran simultáneamente hacia el túbulo o conducto central. Es ampliamente conocido el papel clave de las células de Sertoli en el proceso de la espermatogénesis (Sharpe 1994, Griswold 1998).

En el presente estudio se evidenció una fuerte asociación epitelioide entre las células de Sertoli y las células germinales tal como ha sido registrado en otros Atherinomorfa incluidos los géneros *Anableps* y *Poecilidae* (Grier 2000, Grier & Lo Nostro 2000). Se sabe que estas células están unidas lateralmente por interdigitaciones citoplasmáticas (desmosomas) y uniones estrechas (Grier 1993, 2000). La función fagocítica por parte de las células de Sertoli denota una homología entre estas células en los diferentes taxa de vertebrados (Grier 1993). En

especies con testículos lobulares se ha visto que el número de células de Sertoli se incrementa a medida que progresa la espermatogénesis (Billard 1969) y dentro de los Atherinomorpha todas las células de Sertoli se transforman en las células del ducto eferente, convirtiéndose en células secretoras columnares (Grier 1993, Parenti 2004, Parenti & Grier 2004).

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 glándula pituitaria (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.

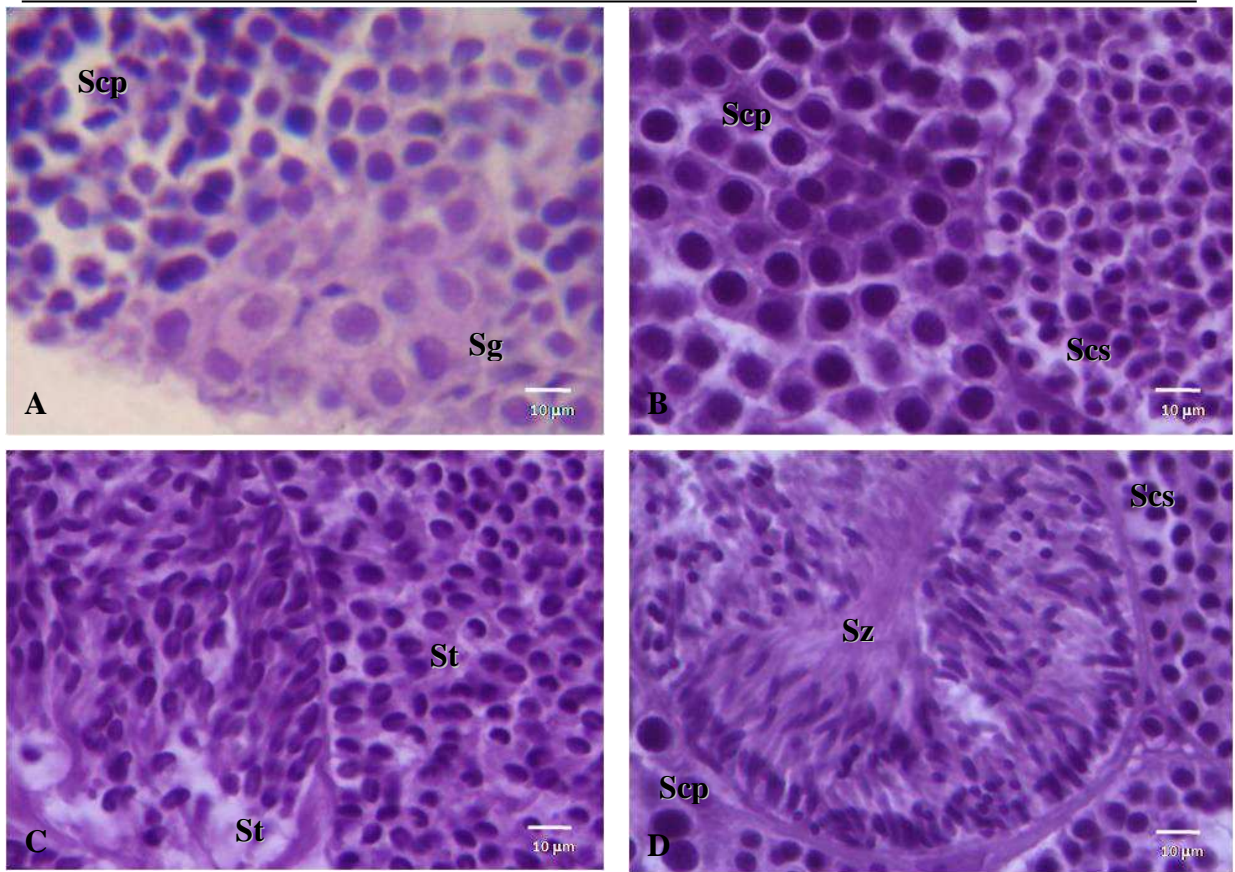


**Fig. 2.6.** Fotografía de testículo de *J. multidentata* teñido con H&E. **(A)** Organización del testículo en lóbulos (flecha) (40x) **(B)** Cistos con células en un mismo estadio espermatogénico. La flecha señala el núcleo de la célula de Sertoli (1000x).

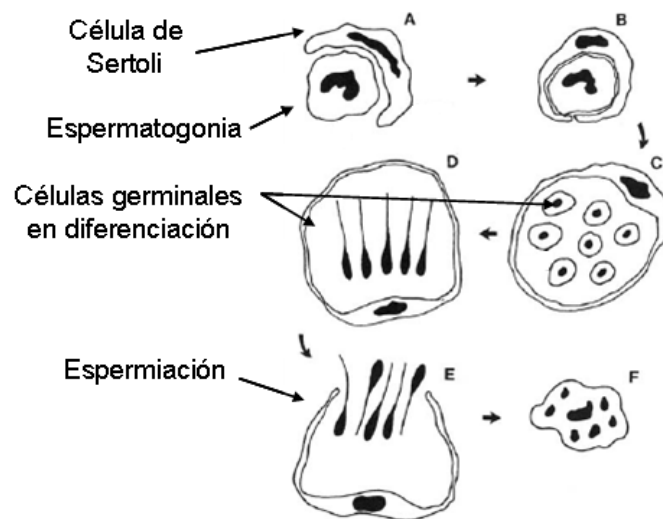
El epitelio germinal consiste en la asociación entre la membrana basal, las células germinales (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) y las células de Sertoli (Parenti & Grier 2004). Las espermatogonias A o primarias (SgA) se encuentran directamente por debajo de la túnica albugínea. Estas células germinales constituyen una

continua fuente de células espermatogénicas, lo que permite la renovación del tejido espermático. Se caracterizan por ser células grandes, con citoplasma eosinófilo y prominente núcleo hipocromático (Fig. 2.7A), rodeadas individualmente por una célula de Sertoli. Tras una serie de divisiones mitóticas originan grupos de espermatogonias B o secundarias (SgB) encapsuladas dentro de espermatocistos en grupos de dos, cuatro o más células. Las extensiones de las células de Sertoli forman la envoltura de los espermatocitos que rodean pequeños grupos de SgB. Las espermatogonias B (de menor tamaño y con núcleo más grande) dan origen a través de otra ronda de mitosis a los espermatocitos primarios (Scp), de menor tamaño, con escaso citoplasma y núcleo prominente y más basófilo (Fig. 2.7B). Los Scp, sufren la primera división meiótica para producir los espermatocitos secundarios (Scs), más pequeños aún y con núcleo basófilo más denso (Fig. 2.7B), los cuales tras la segunda meiosis darán como resultado las espermátidas haploides (St) (Fig. 2.7C). Éstas atraviesan eventos de maduración que incluyen cambios en la forma del núcleo, desarrollo de flagelo, pérdida de citoplasma previo a ser liberadas en el lumen del lóbulo como espermatozoides (Sz). Estos últimos difieren de las espermátidas porque se disponen con los flagelos apuntando hacia el lumen del cisto (Fig. 2.7D). Cabe destacar, que a diferencia de otras especies vivíparas, los espermatozoides no son empaquetados sino que se liberan inmersos en una matriz de glucopolisacáridos (Martinez & Monasterio Gonzo, 2002).

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. 2.8) (Parenti & Grier 2004). Hacia el lóbulo distal, cerca de los ductos eferentes, los espermatozoides maduros forman agrupaciones que luego se desplazarán hacia los ductos eferentes y luego al conducto central que desembocará en el gonopodio. Cerca de los espermatocitos los ductos presentan un diámetro pequeño con masas compactas de espermatozoides. Luego el diámetro comienza a aumentar en el ducto central, donde las células del mismo se observan hipertrofiadas (células cilíndricas o cúbicas). De cada testículo emergen dos ductos espermáticos que confluyen en un ducto simple que se extiende a lo largo del gonopodio.



**Fig 2.7.** Cortes histológicos de testículo de *J. multidentata* teñidos con H&E donde se observan los diferentes estadios espermátogénicos: (A) Espermatogonias B; (B) Cisto con espermatocitos primarios y cisto con espermatocitos secundarios, (C) Cistos conteniendo espermátides en diferentes grados de maduración y (D) Cisto con espermatozoides donde se observa como las cabezas se alinean en la pared del cisto. Cortes a 1000x



**Fig 2.8.** Representación gráfica del proceso de espermátogénesis y espermiación (extraído de Parenti & Grier, 1994).

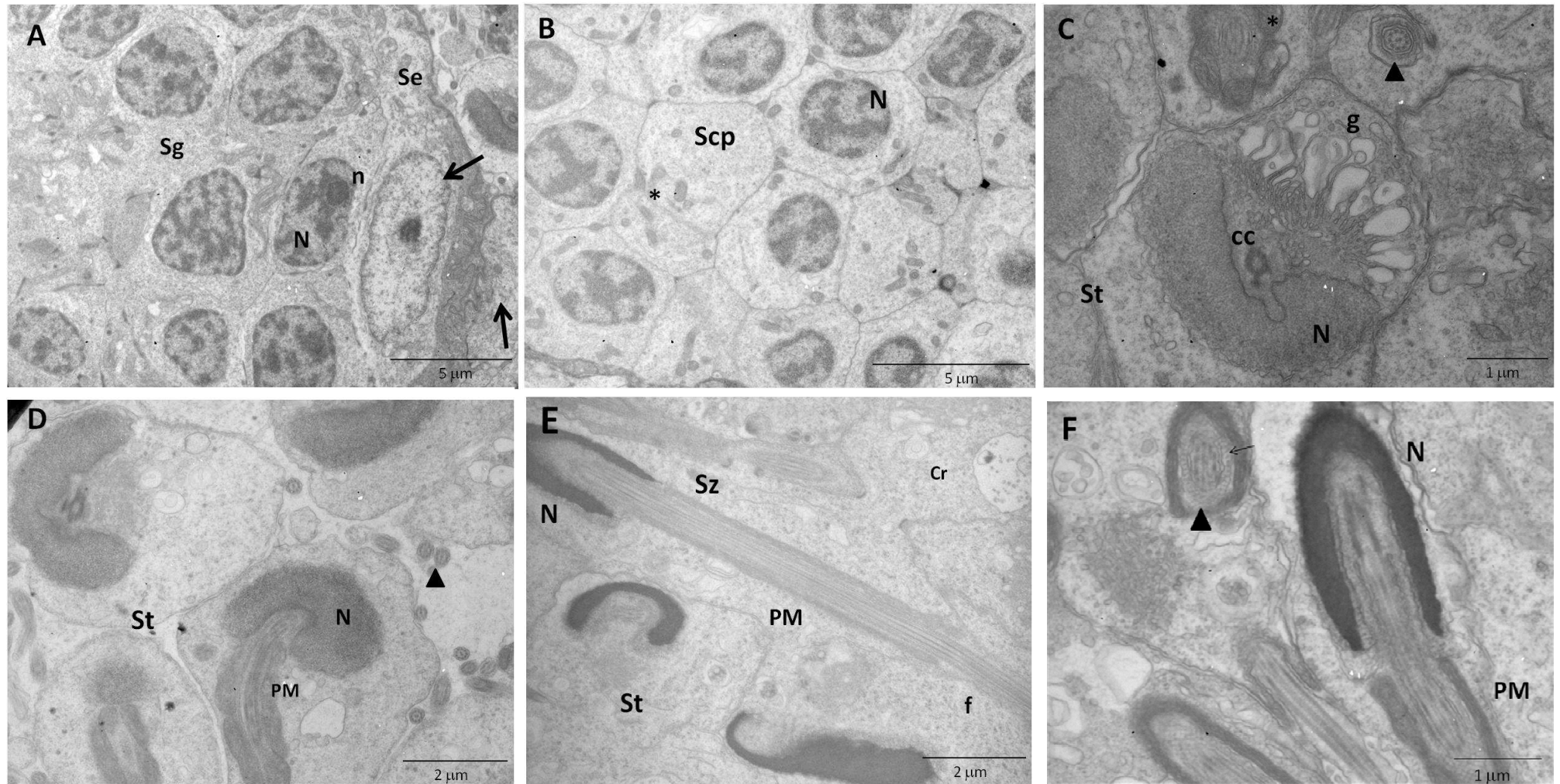
### 2.3.2 Ultraestructura del testículo

En la Fig. 2.9 se observa la ultraestructura del testículo de *J. multidentata*. Se describe a continuación las características principales de los diferentes estadios. Las espermatogonias presentan un diámetro que varía entre 5,5 - 6,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y se disponen solas o en pequeños grupos (Fig. 2.9A). Los Scp (4 - 4,5  $\mu\text{m}$  de diámetro) se caracterizan por presentar un núcleo central con diferentes estados de condensación de la cromatina, un centriolo cercano al núcleo y distribuidas de manera homogénea, se distinguen mitocondrias y pequeñas vesículas (Fig. 2.9B). Los Scs de menor tamaño (3-3.5  $\mu\text{m}$ ) muestran un gran núcleo con cromatina condensada, citoplasma con numerosas mitocondrias y estructuras vesiculares similares al aparato de Golgi. En estas células el complejo centriolar, constituido por dos centriolos se encuentra cercano al núcleo. En la diferenciación espermátida-espermatozoide se manifiesta una marcada modificación en la estructura del núcleo. Las espermátidas, con un diámetro aproximado de 3  $\mu\text{m}$ , presentan el complejo centriolar cercano al núcleo y en el lugar donde se insertará el flagelo se evidencian pequeñas vesículas. El axonema, formado por microtúbulos con el típico patrón de 9 + 2, se comienza a formar cercano al núcleo. Por otra parte, la condensación de la cromatina comienza con la rotación del núcleo. A media que éste rota 90° el eje flagelar se dispone de manera perpendicular a la base del núcleo. El centriolo próximo se localiza en la fosa nuclear, mientras que el centriolo distal se asocia con la membrana plasmática y forma el canal citoplasmático. El núcleo se arriñona, generando una profunda fosa central que contiene el complejo centriolar, donde se inserta el aparato flagelar en formación. Este último consiste en la fusión del al menos 5 mitocondrias que rodean el axonema (Fig. 2.9C-D).

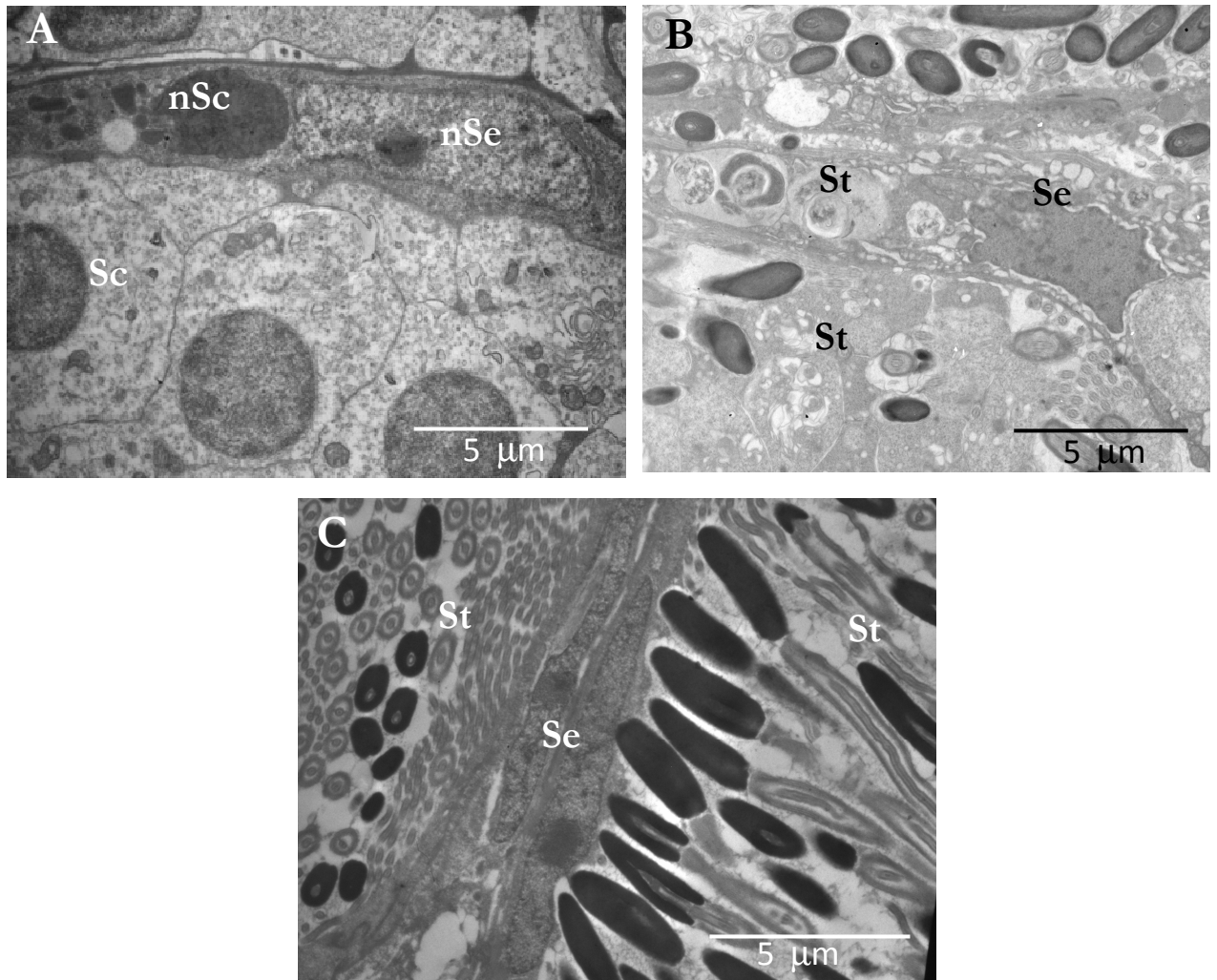
La ultraestructura del espermatozoide fue descrita en 1967 por Dadone & Narbaitz. En coincidencia con estos autores se observa que el espermatozoide carece de acrosoma, al igual que la mayoría de peces teleósteos, y es uniflagelar. Se destaca una gran pieza media. Rodeando el axonema, debajo de la mitocondrias, se observa un patrón de fibrillas electrodensas en forma de zig-zag (Fig. 2.9F), cuya función es desconocida. En relación con el tejido intersticial, entre los cistos se han identificado con frecuencia fibroblastos y células de Leydig donde claramente se distinguen del resto por la estructura de las mitocondrias (Fig. 2.9G).

Se sabe que la supervivencia y desarrollo de las células germinales son críticamente dependientes del contacto con las células de Sertoli. Éstas son además, las responsables de fagocitar el material citoplasmático producto de la maduración de las espermátidas, células

germinales degeneradas y espermatozoides envejecidos que no fueron liberados (Schulz & Miura 2002). Esta actividad fagocítica usualmente resulta en células de Sertoli con citoplasma repleto de lisosomas y vacuolas digestivas (Miles-Richardson et al. 1999). En los cortes ultraestructurales se observó como la célula de Sertoli se hipertrofia a medida que avanza la espermatogénesis, lo que refleja la marcada actividad fagocítica de las mismas (Fig. 2.10A-C). De acuerdo a lo observado en el presente trabajo y a lo descrito previamente en la bibliografía se destaca el papel clave de las células de Sertoli en el proceso de espermatogénesis de esta especie.



**Fig. 2.9** Microfotografías de testículo de *J. multidentata*. **(A)** Cisto con espermatogonias B donde se observa la célula de Sertoli formando el cisto (4600x); **(B)** Espermatocitos primarios (6000x), **(C-D)** diferenciación de espermatídes-espermatozoides donde se observa el arriñonamiento del núcleo con la consiguiente formación e inserción del aparato flagelar (16700x y 10000x), **(E)** espermatozoide donde se muestra una larga pieza media (10000x) y **(F)** se señalan la red de fibrillas electrodensas por debajo de las mitocondrias (16700x). Referencias: cc, complejo centriolar, f, flagelo; g, complejo de Golgi; N, núcleo; n, nucléolo; PM, pieza media; Se, célula de Sertoli, Scp, espermatocitos primarios; Sg, espermatogonias; St, espermatídes; Sz, espermatozoides. Flechas gruesas indican núcleo de células de Sertoli; flechas finas indican fibrillas electrodensas en forma de zig-zag; asterisco indica mitocondrias; triángulo corte transversal por pieza media.



**Fig. 2.10.** Microfotografías de testículo de *J. multidentata* que muestran las modificaciones en la estructura de la célula de Sertoli a medida que avanza el proceso espermatogénico. **(A)** Célula de Sertoli fagocitando un espermatocito 7750x; **(B)** Marcada hipertrofia de célula de Sertoli en cistos con células en avanzada etapa del ciclo espermatogénico, donde se evidencian numerosos restos celulares fagocitados 6000 x **(C)** Cisto conteniendo espermatozoides, donde se observa que la célula de Sertoli regresa a su morfología básica ya que ya ha fagocitado los remanentes celulares 6000x. Referencias: nSc, núcleo de espermatocito; nSe, núcleo de Sertoli; Se, célula de Sertoli, Sc, espermatocitos; St, espermátides; Sz, espermatozoides.



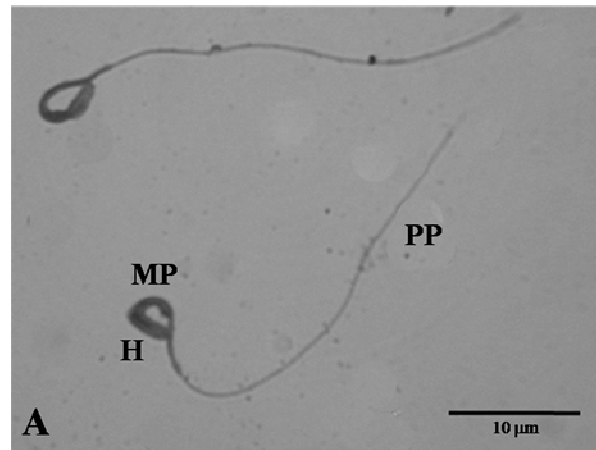
### 2.3.3. Parámetros espermáticos

En la figura 2.11 se muestran dos espermatozoides de *J. multidentata* teñidos con Azul de Coomassie, donde puede evidenciarse la gran pieza media que estos poseen. Los valores promedios de las medidas morfológicas registradas para los espermatozoides de esta especie se exponen en la Tabla 2.1, mientras que las frecuencias relativas de estos valores se representan en la figura 2.12. El 65% de los individuos presentó espermatozoides con una longitud total que varió entre 46 y 49  $\mu\text{m}$ . Cuando se compara con otras especies vivíparas dentro del mismo orden, el espermatozoide de *J. multidentata* es más largo que en *Anableps anableps* (40  $\mu\text{m}$ ) (Greven & Schmahl 2006), pero más corto que en *Poecilia reticulata* (54.56  $\mu\text{m}$ ) (Skinner & Watt 2007) y *Xiphophorus nigrensis* (57.7  $\mu\text{m}$ ) (Smith & Ryan 2010). Longitudes similares (cercanas a 50  $\mu\text{m}$ ) se han registrado en peces vivíparas de otros órdenes, como *Cymatogaster aggregata* (Perciformes, Embiotocidae) (Gardiner 1978). Por el contrario, en peces de fecundación externa se ha registrado una alta heterogeneidad, pero siempre con longitudes inferiores que van desde 18 a 30  $\mu\text{m}$  (Lahnsteiner & Patzner 2008). Estas diferencias pueden radicar en la menor longitud de la pieza media registrada en estos últimos.

De las partes constitutivas del espermatozoide de *J. multidentata*, el flagelo es la región de mayor longitud. En cuanto a la longitud de la cabeza, se registró un valor promedio de 3.5  $\mu\text{m}$  (tabla 2.1). Esto coincide con lo descrito para especies de fecundación interna (Lahnsteiner & Patzner 2008), ya que los peces con fertilización externa presentan longitudes de cabeza menores a 2  $\mu\text{m}$  (Hadi Alavi et al. 2009). Una cabeza alargada, proporciona ventajas al espermatozoide para poder desplazarse dentro del tracto reproductor femenino, permite la aglutinación de las células espermáticas de manera que puedan fluir juntos y promueve el aumento de la direccionalidad del movimiento celular (Ginzburg 1968, Gardiner 1978).

Longitudes de pieza media comprendidas entre 9 y 10  $\mu\text{m}$  fueron registradas en el 50% de los machos de *J. multidentata*. Esta longitud es similar a la de *X. nigrensis* (8.94  $\mu\text{m}$  aproximadamente) (Smith & Ryan 2010), pero mayor a los valores registrados para *P. reticulata* y *A. anableps* (4.79 y 3.9  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (Greven & Schmahl 2006, Skinner & Watt 2007). Sin embargo, es notable la diferencia cuando se compara con los peces de fertilización externa, donde la pieza media es menor que 2  $\mu\text{m}$  (Lahnsteiner & Patzner 2008, Hadi Alavi et al. 2009). Los peces vivíparas presentan una mayor pieza media en comparación con los peces de fertilización externa. Su longitud se relaciona de manera directa con la capacidad de generar energía por parte de los espermatozoides, facilitando la dispersión de estas células dentro de

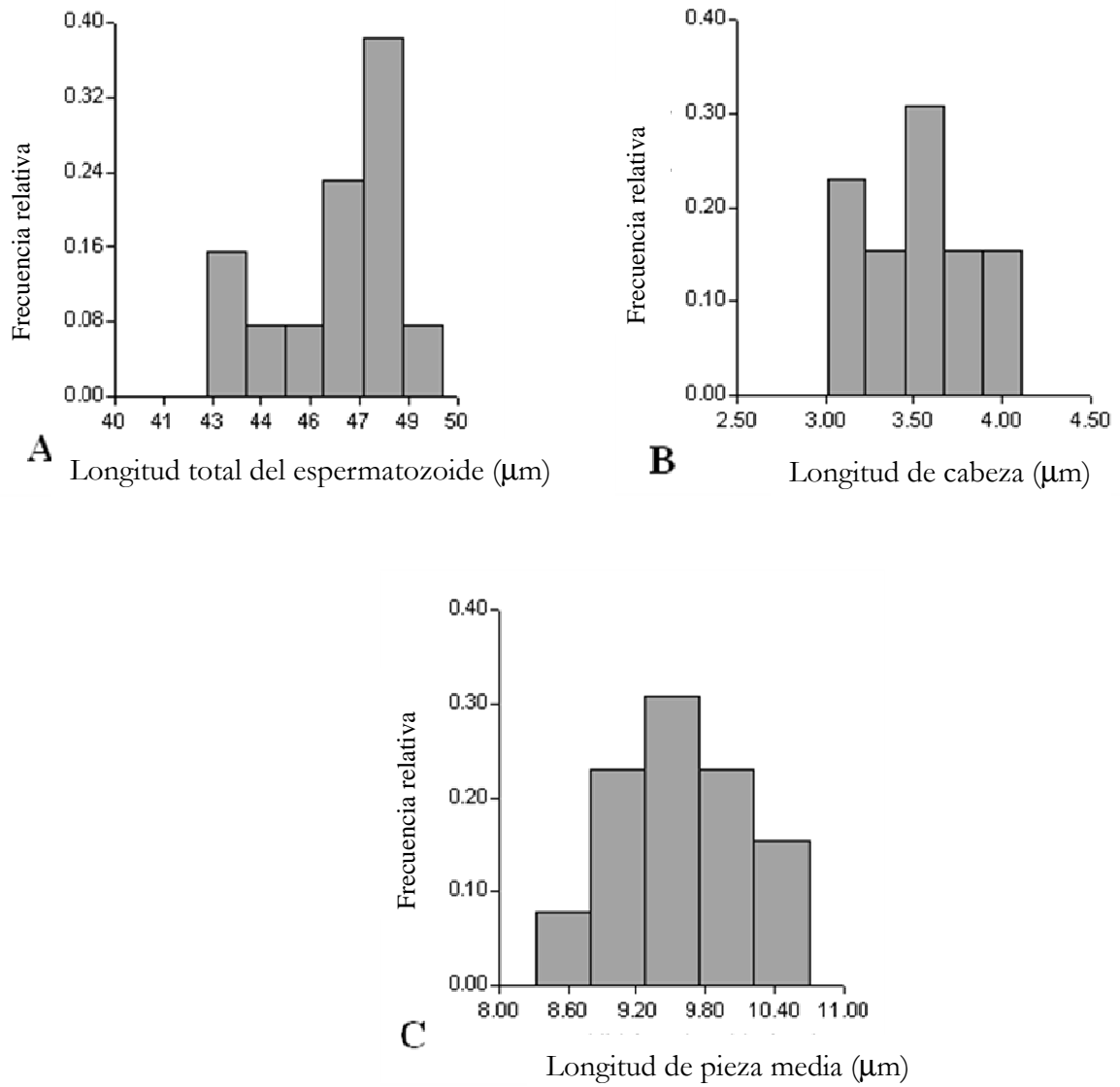
tracto reproductivo femenino y ayudando a prolongar la vida útil de las mismas durante el almacenamiento en el ovario (Fawcett 1970, Pecio & Rafirisky 1994, Yao et al. 1995).



**Fig. 2.11.** Microfotografía de espermatozoides de *J. multidentata* mostrando la cabeza, pieza media y pieza principal (tinción con azul de Coomassie) (1000x). Referencias: H, cabeza; MP, pieza media; PP pieza principal

Region	Media	E.E	Min	Max
LT ( $\mu\text{m}$ )	46.65	0.57	42.20	50.00
LC ( $\mu\text{m}$ )	3.46	0.09	2.32	4.59
LPM ( $\mu\text{m}$ )	9.71	0.18	8.08	11.98

**Tabla 2.1.** Medidas morfométricas de espermatozoides de *J. multidentata*. Se muestran los valores medios, error estándar, valores mínimos y máximos de las siguientes regiones de los espermatozoides de *J. multidentata*: LT: longitud total; LC: Longitud de cabeza y LPM: longitud de pieza media. Los datos derivan del análisis de 20 espermatozoides por individuo ( $n=45$ ).



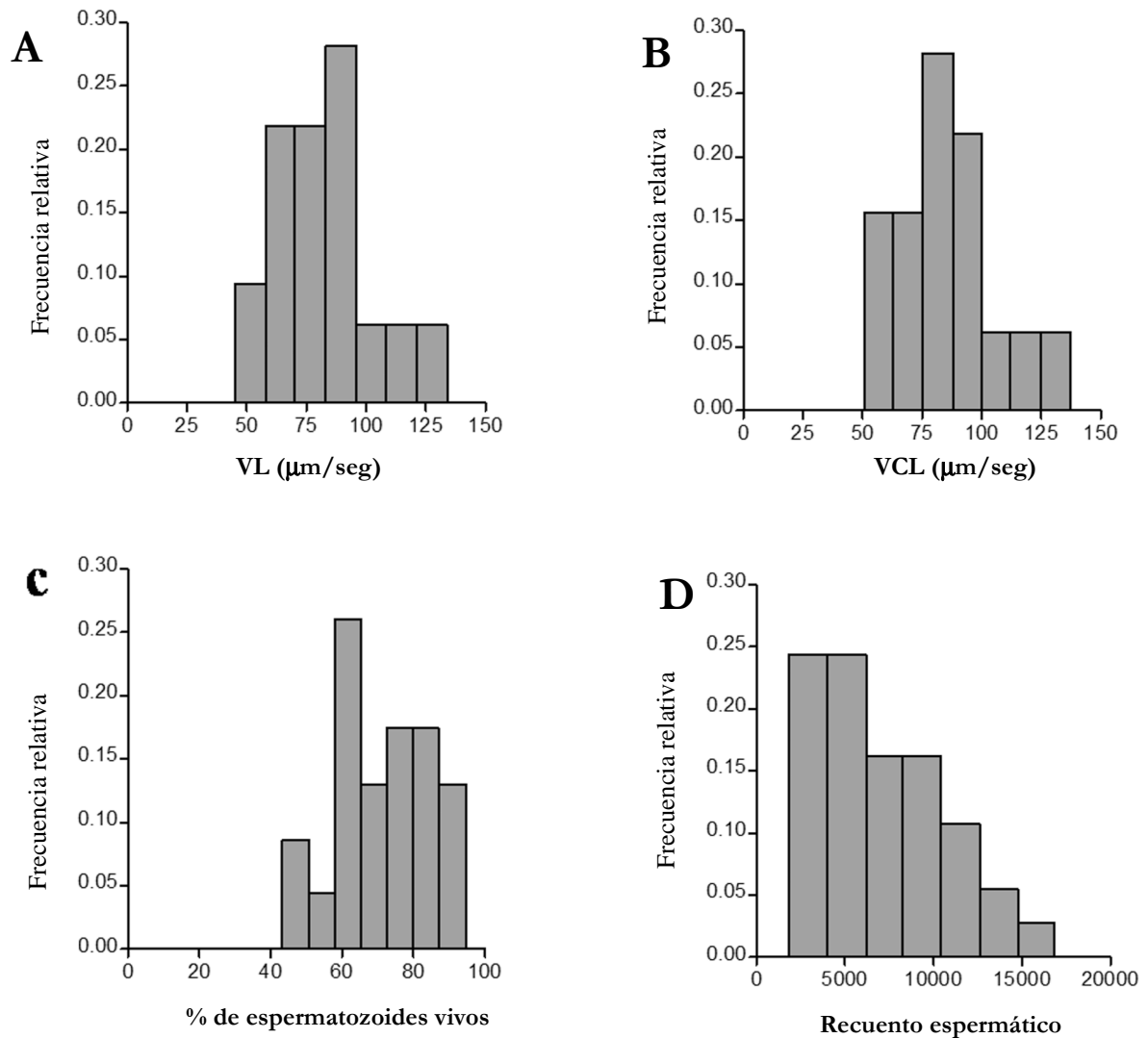
**Fig. 2.12.** Frecuencia relativa de distribución de (A) longitud total del espermatozoide ( $\mu\text{m}$ ); (B) longitud de cabeza ( $\mu\text{m}$ ) y (c) de pieza media ( $\mu\text{m}$ ). Los valores fueron obtenidos a partir de la medición de 20 espermatozoides por macho ( $n=45$ ).

Los valores promedios de VL y VCL registrados fueron de  $81.67\mu\text{m}/\text{s} \pm 3.53$  y  $85.73\mu\text{m}/\text{s} \pm 3.55$ , respectivamente. De todas las muestras analizadas el 89% presentó un patrón lineal de movimiento, registrándose en los espermatozoides una linealidad que varió entre 94 y 98% para 75% de las muestras (Fig. 2.13 A-B). La motilidad del esperma es un parámetro de calidad integral que combina la calidad de varios compartimentos celulares responsables de la activación de la motilidad y el movimiento progresivo sostenido (Bobe & Labbé 2010). La alta linealidad registrada en *J. multidentata* es similar a los valores registrados para otras especies de peces tanto con fertilización externa como interna (Lahnsteiner & Patzner 2008). Estos autores propusieron que la forma del complejo cabeza/pieza intermedia no tendría efecto sobre el patrón de natación de los espermatozoides, ya que al comparar el patrón de motilidad de muchas especies con una amplia diversidad de formas de los espermatozoides, éstos presentaron predominantemente un movimiento lineal. Cosson et al. (1999) postula que el patrón de motilidad es principalmente modulado por la simetría de la onda flagelar y el tamaño del flagelo es muy constante dentro de los peces. Lahnsteiner & Patzner (2008) postularon que el flagelo presenta en general un tamaño diez veces mayor que el complejo cabeza-pieza intermedia. En *J. multidentata* se ha registrado longitudes de flagelo de aproximadamente  $36\mu\text{m}$ , es decir una proporción 3 veces mayor al complejo cabeza-pieza media.

Una proporción de espermatozoides vivos mayor al 60% fue registrada en el 85% de los individuos analizados (Fig. 2.13C). El porcentaje promedio de espermatozoides móviles e inmóviles fue de  $68.28\% \pm 8.32\%$  y  $9.46\% \pm 4.56\%$  respectivamente. El porcentaje de viabilidad varía de acuerdo al medio utilizado para los análisis. En Poecílidos se han registrado valores de viabilidad superiores de alrededor del 89% en un medio de NaCl utilizando la misma tinción que en la presente tesis (Locatello et al. 2006).

El recuento espermático mostró una alta variabilidad entre los machos, presentando en promedio un valor de  $5524 \pm 728$  células/ $\mu\text{l}$  de muestra. En la figura 2.13D se detalla la distribución de frecuencia del recuento espermático. Esta alta heterogeneidad registrada concuerda con lo reportado por Rurangwa et al. (2004), quienes postulan que la concentración puede variar mucho dentro de una misma especie de pez y a lo largo de toda la temporada reproductiva. Birkhead & Moller (2005) han señalado que en los poecílidos, donde la cópula es rápida ( $<1$  s) y no implica montaje o sujeción por parte del macho, no existe un control por parte de este último sobre la transferencia del esperma, sino que serían las hembras las que limitan el tamaño del eyaculado transferido. El comportamiento de cópula ha sido descrito para *J. multidentata*. (Bisazza 2000) y corroborado en este estudio, destacando la similitud

observada con los poecílidos. Smith & Ryan (2010) postulan que evolutivamente, en aquellas especies donde los machos tienen bajo control sobre la cantidad de espermia eyaculado, se habrían favorecido los parámetros que aumentan la calidad del espermia y no la cantidad del mismo. Entre estos parámetros se puede mencionar la viabilidad del espermia, y la velocidad.



**Fig 2.13.** Frecuencias relativas de VL (velocidad lineal), VCL (velocidad curvilínea), porcentaje de espermatozoides vivos y recuento espermático (número de espermatozoides/  $\mu\text{l}$ ) caracterizadas en 45 machos de *J. multidentata* recolectados en Río Yuspe y aclimatados una semana en laboratorio a 21°C y 12:12 horas luz:oscuridad. VL: velocidad lineal, VCL: velocidad curvilínea.

En el presente capítulo se caracterizó la estructura del testículo y parámetros dinámicos y morfológicos de espermatozoides de *J. multidentata* a través de un simple protocolo de recolección de espermia. El mismo no es invasivo, no provoca estrés al animal debido a que previamente es anestesiado y evita la contaminación del eyaculado con materia fecal.



## *CAPÍTULO III*

*Análisis de biomarcadores de efecto en machos de *J. multidentata*  
expuestos xenoestrógenos*

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas una creciente evidencia científica demuestra que las poblaciones silvestres de animales acuáticos están siendo expuestas a compuestos químicos que afectan la homeostasis de las hormonas naturales y por lo tanto alteran severamente la fisiología de los organismos. Esto impacta no solo a nivel individual sino también a escala poblacional. Como fue mencionado en el capítulo I, diversos compuestos químicos son conocidos como “perturbadores endocrinos” (PEs). Hasta el momento, el grupo mejor caracterizado de PEs son los estrógenos ambientales y xenoestrógenos. Estos últimos pueden imitar los efectos de los estrógenos endógenos, en particular de la hormona  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), y por lo tanto son capaces de unirse a receptores de estrógenos produciendo efectos similares a ellos (Korner et al. 2000).

Los organismos acuáticos son importantes especies receptoras de compuestos con actividad estrogénica y para poder establecer la influencia de los mismos sobre la biota, los ensayos en laboratorio cobran una notable importancia, ya que permiten establecer una relación causa-efecto directa (Safe 2000). Los peces han demostrado ser modelos útiles en ensayos de laboratorio, ya que son sensibles al impacto de xenobióticos. Además, tienen una función ecológica importante como transportadores de energía de niveles inferiores a superiores en la cadena trófica (van der Oost et al. 2003).

El riesgo de toxicidad aguda para la biota acuática por xenoestrógenos es bajo, pero sí se conocen efectos subletales en condiciones crónicas de exposición a los mismos. En la bibliografía existente se han evaluado cambios en biomarcadores a diferentes niveles de organización, en organismos expuestos a diversas sustancias con actividad estrogénica, entre los que se destacan biomarcadores comportamentales, y aquellos que evalúan índices somáticos y estructura de gónadas (Jobling et al. 1996, Gray & Metcalfe 1997, Baatrup & Junge 2001, Kinnberg et al. 2000, Bjerselius et al. 2001, Bayley et al. 2002, Metcalfe et al. 2001, Schweer 2002, Van den Ven et al. 2003, Weber et al. 2003, Pawlowsky et al. 2004). Los biomarcadores y su relevancia fueron descritos en Capítulo I. (Sección 1.1.3). Debido a la especificidad con que responden las diferentes especies de peces, al ser expuestos a diferentes tóxicos, es de fundamental importancia establecer los efectos que estas sustancias causan sobre representantes de la fauna nativa.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en la presente tesis se propone evaluar los efectos de diversos compuestos xenostrogénicos sobre (a) el comportamiento reproductivo,

(b) parámetros espermáticos, (c) índices somáticos e (d) histología y ultraestructura del testículo de machos adultos de la especie íctica autóctona *J. multidentata*.

### 3.2. HIPÓTESIS

Como hipótesis general del presente capítulo se plantea que machos de la especie autóctona *J. multidentata* expuestos en laboratorio a diversos compuestos con actividad estrogénica manifiestan alteraciones en el comportamiento reproductivo, tales como una disminución en el interés hacia la hembra y un menor número de intentos de cópula y cópulas. Además, la exposición a estos compuestos provoca una menor viabilidad y recuento espermático, una disminución en el IGS y diversas alteraciones en la histología y ultraestructura de los testículos, principalmente en los estadios primordiales y en células de Sertoli.

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Recolección de peces y aclimatación

Para cada ensayo de exposición se recolectaron 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 durante los meses de diciembre-enero durante los años 2010 y 2011, utilizando un equipo de pesca eléctrica (Coffelt, Model Mark 10), transportados al laboratorio en tanques de 15 L y aclimatados durante 14 días a condiciones controladas de temperatura (21±1 °C) y fotoperíodo (12:12 horas luz/oscuridad). Se les suministró alimento deshidratado en escamas (TetraMin®) dos veces al día.

#### 3.3.2. Compuestos químicos

Se detallan a continuación los compuestos seleccionados para evaluar el efecto sobre diversos biomarcadores reproductivos.

- ❖ **17β-estradiol (E<sub>2</sub>)** (98% de pureza).
- ❖ **17α-etinilestradiol (EE<sub>2</sub>)** (99.1% de pureza).
- ❖ **4*n*-nonilfenol (4*n*-NP)** (99.9% de pureza).
- ❖ **17α-metiltestosterona (MT)**.



### 3.3.3. Condiciones de Exposición

Se realizaron bioensayos semi-estáticos y crónicos, de 28 días de duración. Teniendo en cuenta la vida media de cada compuesto, el medio de cada pecera fue totalmente renovado cada 24 o 48 horas.

Las concentraciones de los diferentes xenoestrógenos utilizados en los bioensayos fueron seleccionadas de acuerdo a lo registrado en ambientes naturales. Las mismas se detallarán a lo largo de cada sección. Para cada tratamiento, se expusieron 20 individuos en cada concentración ensayada. Cinco individuos seleccionados al azar fueron colocados en peceras de 5 L, (Fig. 3.1). Se realizaron 4 réplicas para cada tóxico.



**Fig. 3.1.** Fotografía donde se muestra un ensayo de exposición.

### 3.3.4. Biomarcadores

#### 3.3.4.1. Comportamiento reproductivo

Transcurridos los 28 días de exposición, la mitad de los individuos de cada concentración ( $n=10$ ) fueron seleccionados al azar con el fin de registrar su comportamiento reproductivo. Para ello cada macho fue colocado junto a una hembra no expuesta a los compuestos a evaluar en una pecera de 5 litros. Transcurridos 10 minutos (tiempo que se destinó para que el individuo se habitúe a la pecera y a la presencia de la hembra) se registró el comportamiento sexual durante 20 minutos a través de observaciones directas y filmaciones (utilizando una filmadora Sony CCD TR818). Cuando los machos no mostraron interés hacia la hembra, la misma fue removida y reemplazada por otra, realizando hasta un máximo de 4 reemplazos. Si el macho no manifestó interés hacia ninguna de estas hembras, se consideró que el mismo no presentó actividad sexual.

De acuerdo a la descripción del comportamiento sexual de *J. multidentata* realizada por Bisazza et al. (2000) se propuso evaluar las siguientes variables:

- *Tiempo total de persecución (TP)*: Tiempo (expresado en segundos) en que el macho persigue a la hembra, con el objetivo de hacer contacto con el gonoporo de la misma.
- *Número total de persecuciones (NP)*: Número de veces que los machos inician un comportamiento de persecución tras la hembra.
- *Intentos de cópula (IC)*: número de veces que los machos extienden su gonopodio para establecer contacto con el gonoporo de la hembra, logrando o no la cópula.
- *Cópulas (C)*: número de contactos directos entre el gonopodio del macho y el gonoporo de la hembra.
- *Cópulas sostenidas*: Contacto directo entre el gonopodio y gonoporo durante un lapso mayor a 5 segundos.

A partir de estas variables se calcularon los siguientes índices relativos:

- *Número de persecuciones en función al tiempo total de persecución (NP/TP)*.
- *Intentos de cópula en función al tiempo total de persecución (IC/TP)*.
- *Porcentaje de persecuciones que comprenden intentos de cópulas (IC/NP)*.
- *Cópulas en función al tiempo total de persecución (C/TP)*.
- *Porcentaje de persecuciones que finalizaron en cópulas (C/NP)*.
- *Proporción de cópulas en función del total de intentos de cópula (C/IC)*.

### 3.3.4.2. *Parámetros espermáticos*

Para la caracterización de los parámetros espermáticos se utilizó la metodología descrita en el capítulo II (apartado 2.2.4). Los parámetros espermáticos fueron analizados tanto en los individuos a los cuales se les registró el comportamiento reproductivo (CC;  $n=10$ ) (descrito en el apartado 3.3.4.1) como aquellos en los que no se evaluó dicho comportamiento (SC;  $n=10$ ).

### 3.3.4.3. *Índices somáticos*

Una vez analizado el comportamiento y obtenida la muestra de esperma los peces fueron sacrificados por inmersión en sobredosis de tricaina metanolsulfonato (MS222 500 mg/L). Se registró la longitud estándar (mm) y el peso de cada individuo (g) con el fin de evaluar su estado general mediante el Factor de Condición de Fulton ( $K=[W/L^3]*100.000$ , donde  $W$ =peso corporal y  $L$ =longitud) (Anderson & Newman 1996). El peso de las gónadas se utilizó para calcular el Índice Gonadosomático ( $IGS= [W_{\text{gónada}}/W_{\text{peso total}}]*100$ ). Los hígados también fueron removidos y pesados con el fin de calcular el Índice Hepatosomático ( $IHS= [W_{\text{hígado}}/W_{\text{peso total}}]*100$ ) (Goede & Barton 1990, Strange 1996).

### 3.3.4.4. *Análisis histológico del testículo*

De cada tóxico evaluado se fijaron por concentración cinco gónadas en formaldehído al 4%, las cuales fueron procesadas tal como se describió en el capítulo II. Debido a la baja proporción de cistos con espermatogonias (< 5%) sumado a la dificultad de diferenciar al microscopio óptico espermátidas, en estadio avanzado de desarrollo, de espermatozoides maduros; para la cuantificación de las proporciones de estadios celulares se consideraron dos grandes grupos: cistos con estadios primordiales de desarrollo (espermatogonias y espermatocitos) y cistos conteniendo células maduras (espermátides y espermatozoides). Además se evaluó la organización tisular de cada gónada. Se identificaron diversas alteraciones histológicas a través de microscopía óptica. Se utilizó el término células vacuolares propuesto por Wolf et al. (2004), en aquellos casos en que las células presentaron un gran tamaño y con cantidades variables de vacuolización citoplasmática, no pudiéndose identificar en detalle la alteración subcelular.

### 3.3.4.5. Análisis ultraestructural del testículo

Para la caracterización de la ultraestructura del testículo se utilizó la metodología descrita en el capítulo II, apartado 2.2.3. Se analizó un individuo por concentración para cada tóxico.

### 3.3.4.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media y desvío estándar. Para establecer si los parámetros estimados se diferenciaron entre los tratamientos, se aplicó análisis de varianza a una vía (ANOVA), utilizando el test a posteriori DGC. Previamente se analizó si los datos presentaban distribución normal mediante el test de Shapiro Willks, mientras que el test de Levene se utilizó para probar la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad se realizó análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. La significancia fue aceptada para valores de  $p < 0.05$ . Los datos expresados en porcentaje fueron comparados a través del Test de diferencias de proporciones.

Dado que el comportamiento reproductivo fue registrado sólo en el 50% de los machos expuestos a cada tratamiento, se evaluó si este comportamiento influyó sobre los parámetros espermáticos. Para ello se realizó un análisis de varianza con interacción, tomando como factor a cada tratamiento y el registro o no del comportamiento reproductivo. De esta manera se analizó la posible existencia de interacciones entre ambos factores.

Con el fin de discriminar si cada tóxico genera respuestas diferentes en la especie estudiada, se procedió a realizar un Análisis Discriminante Lineal para cada compuesto, utilizando como variables de agrupamiento a los diferentes tratamientos. Este análisis multivariado clasifica a todos los individuos basándose en combinaciones lineales de las variables discriminantes, que maximizan la separación entre grupos, mientras se minimiza la variación dentro del grupo. Debido a que el comportamiento reproductivo solo fue analizado en la mitad de los individuos de cada tratamiento ( $n=10$  por tratamiento), el análisis discriminante se realizó sólo considerando esos individuos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el Infostat Software Package (Infostat, 2003).

## 3.4.Sección A

### *17 $\beta$ - estradiol (E<sub>2</sub>)*

#### 3.4.A.1. INTRODUCCIÓN

Los esteroides sexuales, como la hormona natural 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), están involucrados en el control de una gran cantidad de funciones fisiológicas. Esta hormona, es el estrógeno natural más importante en los vertebrados y, aunque es llamado comúnmente “hormona femenina”, juega un rol central en numerosos procesos fisiológicos, tanto de hembras como de machos, incluyendo ovogénesis, vitelogénesis, producción de gonadotrofina, desarrollo testicular y otros aspectos de la reproducción, crecimiento y homeostasis (Arcand-Hoy & Benson 1998, Zhang & Trudeau 2006, Martyniuk et al. 2006). Debido a que esta hormona es un compuesto lipofílico difunde dentro de la célula y se une a receptores intracelulares (RE) para inducir la transcripción de genes específicos (Hall et al. 2002). La distribución específica en los tejidos de dichos receptores para el estradiol (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) sugiere que estos pueden regular subconjuntos específicos de genes sensibles a estrógenos en diferentes compartimentos celulares, causando de esta manera una amplia gama de efectos (Loven et al. 2001). La unión a su ligando, 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, modulan la transcripción a través de interacciones con otros factores de transcripción (Hall et al. 2002). Este tipo de mecanismo genómico requiere desde horas hasta días para llevarse a cabo. Sin embargo, además de unirse a receptores nucleares, las hormonas interactúan con receptores transmembrana para ejercer efectos inmediatos, ya sean bioquímicos y/o fisiológicos, en algunas células (Levin 2001, Zhang & Trudeau 2006). En peces se ha comprobado la expresión de este receptor en los testículos, en las células de Sertoli (Miura et al. 1999, Amer et al. 2001, Wu et al. 2001), lo que sugiere que los estrógenos juegan un rol importante en la espermatogénesis.

La hormona 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (Fig 3.2). El anillo fenólico A es la principal característica estructural,

de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos (Jordan et al. 1985, Duax et al. 1988). Los estrógenos esteroideos se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos. La reacción comprende aromatización del anillo A, catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como sustratos (Miller 1988) (Fig. 3.3).

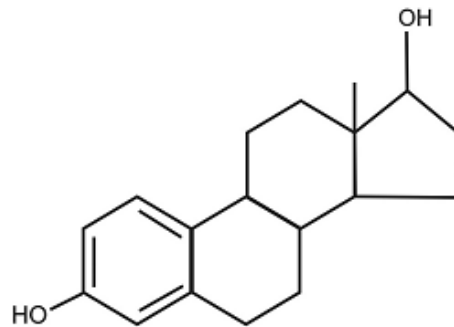


Fig. 3.2. Forma estructural del 17 $\beta$ -Estradiol.

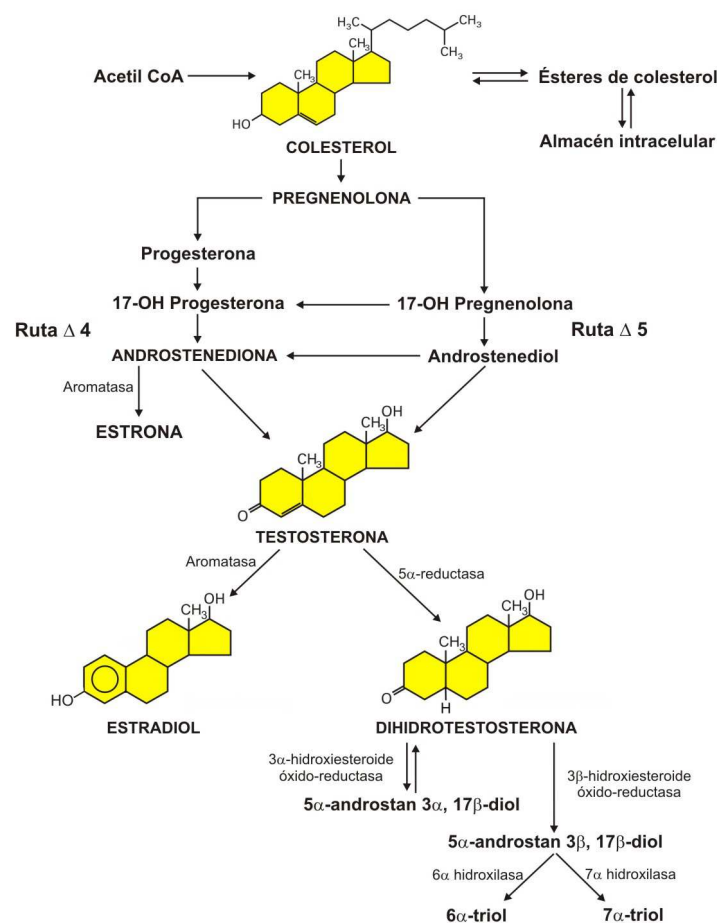


Fig. 3.3. Biosíntesis de hormonas esteroideas (adaptado de Bellido 1999).

La excreción de los estrógenos naturales por parte del hombre constituye el principal aporte de esta hormona en los ambientes acuáticos. En Europa y Norteamérica el E<sub>2</sub> ha sido detectado en ambientes acuáticos (ríos y lagos) en concentraciones que van desde los 10 a 80 ng/L (Desbrow et al. 1998, Lee & Peart 1998, Belfroid et al. 1999, Ternes et al. 1999, Rodgers-Gray et al. 2000) mientras que en Asia, se han registrado concentraciones mucho más elevadas (343 ng/L; Shore et al. 1993). En nuestro país existen pocos estudios que hayan registrado y cuantificado hormonas en cuerpos de agua. Valdés et al. (2015), cuantificaron en arroyos de la provincia de Buenos Aires concentraciones de hasta 362 ng/L, mientras que en efluentes cloacales se detectaron concentraciones de hasta 631 ng/L. Específicamente para la cuenca del río Suquía se detectó la presencia de estrona (E<sub>1</sub>), cuantificándose 6 ng/L (Valdés et al. 2014).

A pesar que las concentraciones ambientales se encuentran en el rango de ng/L, se conoce que dichas concentraciones afectan la fisiología reproductiva de peces (Halm et al. 2002, Kidd et al. 2007). Estudios a campo y en laboratorio han demostrado que exposiciones a bajas concentraciones de E<sub>2</sub> provocan alteraciones en el desarrollo sexual y comportamiento reproductivo de machos, así como alteraciones en la fertilidad y reversión sexual (Bayley et al. 1999, Bjerselius et al. 2001, Blázquez et al. 1998, Schoenfuss et al. 2002, Toft & Baatrup 2003, Blazquez et al. 1998, Gimeno et al. 1996). También se han registrado diversas alteraciones en testículo tales como disminución en los valores de IGS (Kinnberg et al. 2000, Zaroogian et al. 2001), alteraciones en las células de Sertoli (Christiansen et al. 1998, Kinnberg et al. 2000), interrupción en el proceso de espermatogénesis (Condeca-Canario et al. 1999, Zaroogian et al. 2001, Van der Ven et al. 2003), vacuolización y fibrosis (Gimeno et al. 1998b), e incluso desarrollo de ovocitos en el tejido testicular (Chang et al. 1995, Joon Kang et al. 2002).

#### 3.4.A.2. Condiciones de Exposición y determinación de E<sub>2</sub> en agua

Los peces utilizados en el ensayo fueron recolectados en los meses de enero y febrero de 2010. Los valores promedio de longitud estándar y peso de los individuos utilizados fue de:  $28.80 \pm 2.57$  mm y  $0.52 \pm 0.15$  g, respectivamente. Las concentraciones nominales utilizadas de E<sub>2</sub> (98% de pureza) fueron 50, 100 y 250 ng/L.

Durante el bioensayo se determinaron las concentraciones de E<sub>2</sub> en el agua de las peceras a través de inmunoquímica mediante detección por electroquimioluminiscencia (ECL) utilizando un analizador Cobas 4000 e411 (Roche Diagnostics, USA). Los porcentajes de recuperación fueron evaluados con muestras de agua de acuario a las que se les adicionó 25 y

100 ng E<sub>2</sub>/L. 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 E<sub>2</sub> en un rango de 5 a 4,000 ng/L, alcanzando un límite de cuantificación de 7.5 ng/L. Se recolectaron muestras de agua de las peceras para cuantificar la concentración de EE<sub>2</sub> antes y después del reemplazo de la misma.

### 3.4.A.3. Resultados

#### 3.4.A.3.1. Contenidos de E<sub>2</sub> en agua

La estabilidad del E<sub>2</sub> en solución fue independiente de la concentración ensayada, mostrando niveles residuales del  $44.7 \pm 6.2\%$  luego de 48 horas, por lo que el recambio del agua de las peceras se realizó cada 24 horas.

#### 3.4.A.3.2. Mortalidad e Índices somáticos

Finalizado el tiempo de exposición se registró solo un deceso en el grupo control, mientras que en los tratados con 50, 100 and 250 ng E<sub>2</sub>/L murieron dos, tres y un individuo respectivamente. Por lo tanto se asumió que la mortalidad observada no está relacionada con la exposición al E<sub>2</sub>. Los índices somáticos estimados no mostraron diferencias significativas con el grupo control ni entre los individuos tratados con E<sub>2</sub> (tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Valores medios y error estándar de los índices somáticos evaluados en machos adultos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 50, 100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L. Referencias: **K**: Factor de condición; **IHS**: Índice hepatosomático; **IGS**: Índice gonadosomático.

Índice	0 ng E <sub>2</sub> /L	50 ng E <sub>2</sub> /L	100 ng E <sub>2</sub> /L	250 ng E <sub>2</sub> /L	F	p
<b>K</b>	$1.94 \pm 0.14$	$2.14 \pm 0.06$	$2.09 \pm 0.03$	$2.09 \pm 0.03$	0.30	0.7810
<b>IHS</b>	$1.84 \pm 0.17$	$1.70 \pm 0.09$	$1.78 \pm 0.14$	$1.99 \pm 0.16$	0.55	0.6525
<b>IGS</b>	$2.56 \pm 0.22$	$3.12 \pm 0.18$	$3.04 \pm 0.21$	$3.30 \pm 0.15$	3.01	0.0572

#### 3.4.A.3.3. Comportamiento Reproductivo

Todos los individuos analizados para cada tratamiento mostraron comportamiento reproductivo. El 100% de los machos expuestos a 50 ng E<sub>2</sub>/L mostraron actividad sexual de manera inmediata ante la presencia de la primera hembra, siendo la diferencia significativa en



relación a los otros tratamientos ( $z = -2,58$   $p = 0.009$ ). Esta situación no fue observada en los otros tratamientos (incluyendo los controles), donde fue necesario, reemplazar al menos una vez a la hembra para incentivar el comportamiento sexual del macho (en los controles en un 50% de los casos fue necesario el reemplazo de la primera hembra, mientras que en un 60% en las demás concentraciones). Estos últimos porcentajes no muestran diferencias significativas entre ellos ( $z = -0.55$ ;  $p = 0.58$ ).

En la tabla 3.2 se muestran las diferentes variables comportamentales analizadas. Se registró un incremento significativo en las proporciones de diversas variables a la concentración más baja (50 ng E<sub>2</sub>/L). De las variables comportamentales registradas en las concentraciones más altas (100 y 250 ng/L), sólo la relación C/IC se diferenció significativamente del grupo control, mostrando una disminución significativa en sus valores.

Tanto en el grupo control como en los individuos tratados se registraron cópulas sostenidas. Esto fue observado en el 50% de los machos expuestos a 50 ng E<sub>2</sub>/L mientras que para los tratamientos restantes (incluido el grupo control) solo se registró este tipo de cópula en el 20% de los casos, siendo la diferencia significativa ( $z = -1.98$ ;  $p = 0.04$ ).

**Tabla 3.2.** Valores promedio y error estándar de las variables comportamentales registradas en machos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0, 50, 100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L. Referencias: **TP**: tiempo de persecución (seg), **P**: número de persecuciones, **IC**: intentos de cópula, **C**: cópulas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Variables	0 ng E <sub>2</sub> /L	50 ng E <sub>2</sub> /L	100 ng E <sub>2</sub> /L	250 ng E <sub>2</sub> /L	F	p
<b>TP</b>	110.42 ± 32.55	10.18 ± 69.74	15.74 ± 21.22	105.24 ± 27.19	0.82	0.5013
<b>NP</b>	32.38 ± 8.55	37.00 ± 7.94	37.38 ± 5.92	29.88 ± 4.94	1.45	0.2624
<b>IC</b>	61.13 ± 16.63	73.71 ± 11.94	59.13 ± 11.05	64.38 ± 19.98	0.51	0.6809
<b>C</b>	15.13 ± 5.50	16.00 ± 3.93	9.13 ± 2.89	8.00 ± 2.30	2.96	0.6809
<b>NP/TP</b>	0.40 ± 0.08	0.37 ± 0.08	0.37 ± 0.05	0.38 ± 0.04	0.16	0.9230
<b>IC/TP</b>	0.56 ± 0.04a	2.13 ± 1.07b	0.31 ± 0.19a	0.58 ± 0.15a	3.31	<b>0.0436</b>
<b>C/TP</b>	0.14 ± 0.06a	0.75 ± 0.39b	0.06 ± 0.0b4a	0.08 ± 0.05a	3.35	<b>0.0378</b>
<b>IC/NP</b>	1.60 ± 0.53a	4.79 ± 1.12b	1.73 ± 0.52a	1.66 ± 0.74a	4.76	<b>0.0129</b>
<b>C/NP</b>	0.37 ± 0.14a	1.66 ± 0.89b	0.30 ± 0.23a	0.21 ± 0.09a	4.84	<b>0.0122</b>
<b>C/IC</b>	0.24 ± 0.06a	0.30 ± 0.14a	0.16 ± 0.07b	0.12 ± 0.11b	2.11	<b>0.0133</b>

3.4.A.3.4. *Parámetros espermáticos*

Debido a que los parámetros espermáticos no fueron afectados por la actividad sexual previa del macho ( $F=1.45$ ;  $p=0.24$ ), se analizó de manera conjunta los datos provenientes de los individuos cuyo comportamiento reproductivo fue registrado previamente con los obtenidos a partir de aquellos cuyo comportamiento sexual no fue registrado. El recuento espermático fue el único parámetro afectado significativamente tras la exposición a  $E_2$ , observándose una disminución significativa solo en los individuos expuestos a 50 ng  $E_2/L$  (Tabla 3.3).

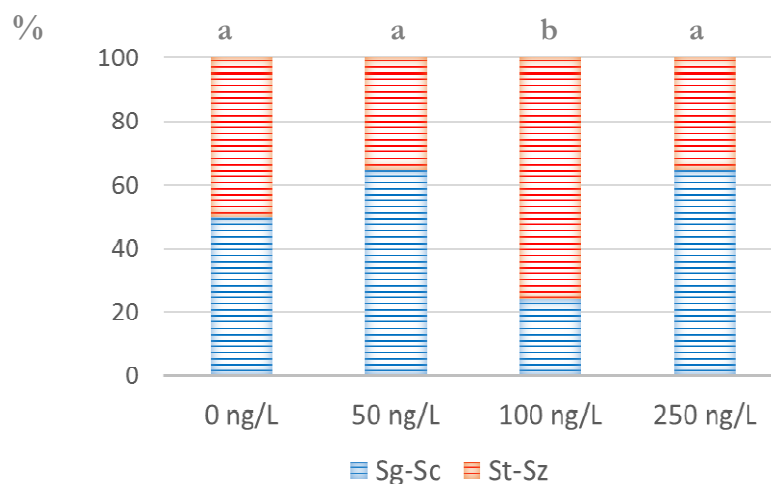
**Tabla 3.3.** Parámetros espermáticos registrados en machos de *J. multidentata* tras 28 días de exposición a 0 (control), 50, 100 y 250 ng/L de  $E_2$ . Referencias: **Parámetros de motilidad:** **VL:** Velocidad lineal ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **VCL:** Velocidad curvilineal ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **LIN:** porcentaje de linealidad; **Recuento espermático** (cel/ $\mu\text{l}$ ); **Viabilidad:** **VM:** porcentaje de células móviles; **VI:** porcentaje de células inmóviles y **M**=porcentaje de espermatozoides muertos. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos parámetros ( $p<0.05$ )

Parámetros	0 ng $E_2/L$	50 ng/L $E_2$	100 ng/L $E_2$	250 ng/L $E_2$	F	p
<b>VL</b>	110.10 $\pm$ 11.03	110.60 $\pm$ 12.12	111.12 $\pm$ 3.42	116.33 $\pm$ 32.29	0.45	0.6443
<b>VCL</b>	112.89 $\pm$ 12.29	114.56 $\pm$ 12.43	114.60 $\pm$ 1.60	118.43 $\pm$ 32.85	0.48	0.6532
<b>LIN</b>	98.00 $\pm$ 2.00	97.00 $\pm$ 2.00	97.00 $\pm$ 3.00	98.00 $\pm$ 1.00	0.54	0.4276
<b>VM</b>	79.24 $\pm$ 2.39	78.26 $\pm$ 8.27	69.94 $\pm$ 9.42	74.29 $\pm$ 2.54	1.67	0.1857
<b>VI</b>	16.04 $\pm$ 2.06	14.71 $\pm$ 5.68	24.53 $\pm$ 9.82	18.69 $\pm$ 2.58	1.77	1.1810
<b>M</b>	4.48 $\pm$ 1.22	5.85 $\pm$ 3.10	5.58 $\pm$ 0.82	8.42 $\pm$ 1.82	1.98	0.1292
<b>Recuento</b>	1714 $\pm$ 180 <b>a</b>	1369 $\pm$ 53 <b>b</b>	2098 $\pm$ 172 <b>a</b>	1932 $\pm$ 196 <b>a</b>	3.15	<b>0.0327</b>

3.4.A.3.5. *Análisis histológico del testículo*

En los testículos de individuos control se evidenciaron todos los estadios celulares de la espermatogénesis, registrándose una proporción similar de estadios espermatogénicos primarios (Sg-Sc) (50%) y tardíos (St y Sz) (50%). De la misma manera, en los individuos expuestos a las diferentes concentraciones de  $E_2$  se observaron todos los estadios celulares. Sin embargo, a 50 y 250 ng  $E_2/L$  se registró una disminución del 15% de cistos con estadios maduros con respecto al control, aunque la misma no fue significativa ( $z=-0.5697$ ;  $p=0.5688$ ); mientras que, por el contrario, a 100 ng  $E_2/L$  se registró un incremento significativo de estos cistos con respecto a las demás concentraciones de esta hormona (76 %) ( $z=-0.5697$ ;  $p=0.0338$ ). La proporción de cada estadio celular se visualiza en la figura 3.4.

En cuanto al análisis cualitativo de gónadas, los individuos control no evidenciaron alteraciones en la estructura tisular de los testículos y los cistos se encontraron bien definidos (Fig 3.5 A-B).



**Fig. 3.4.** Proporciones de cistos conteniendo estadios primarios: espermatogonias (Sg) y espermatocitos (Sc) (color azul) y estadios maduros: espermátides (St) y espermatozoides (Sz) color rojo, para cada concentración de E<sub>2</sub> y grupo control (0 ng/L)

En los individuos expuestos a 50 ng E<sub>2</sub>/L se evidenció desorganización del tejido testicular (mezcla de cistos en diferentes estadios) y presencia de vacualización en los diferentes estadios de espermatogénesis. Frecuentemente se registraron Sg alteradas, con diferente grado de vacuolización citoplasmática y cistos donde se evidenció pérdida de conexión entre Sc (Fig 3.5 C-D).

A 100 ng E<sub>2</sub>/L se registró una notable desorganización interna del tejido testicular, con pérdida de la estructura normal de los cistos y mezcla de los diferentes estadios espermatogénicos (Fig. 3.5 E-F). Además aquellos cistos que contenían estadios con Sg y Sc presentaron células con un mayor grado de vacuolización. En numerosos casos se evidenció una desincronización en la diferenciación de las espermátides, ya que se evidencia la formación de flagelo sin el correspondiente arriñonamiento del núcleo (Fig. 3.5 F).

Finalmente en los individuos expuestos a 250 ng E<sub>2</sub>/L se registraron alteraciones a lo largo de la espermatogénesis, principalmente pérdida de estructura de los cistos, desincronización dentro de los mismos (presencia de células en distinto estado de maduración) y una mayor cantidad de sistemas de vacuolas (Fig. 3.5 G-H).

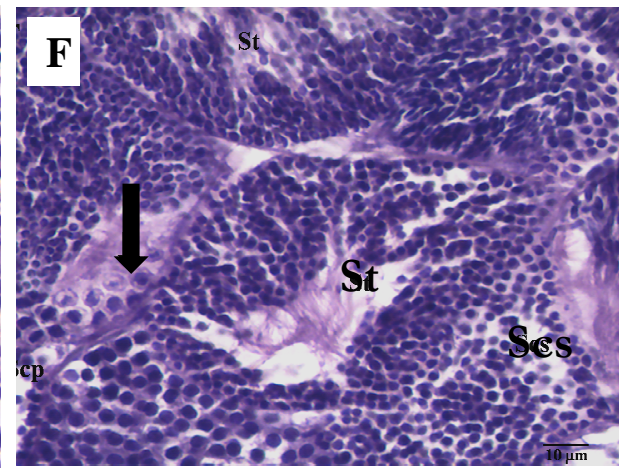
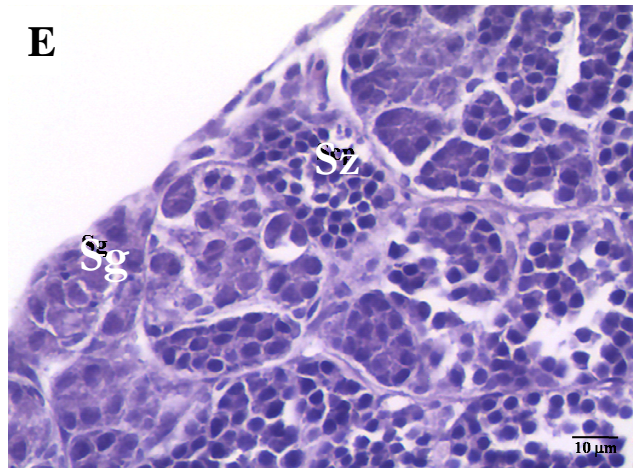
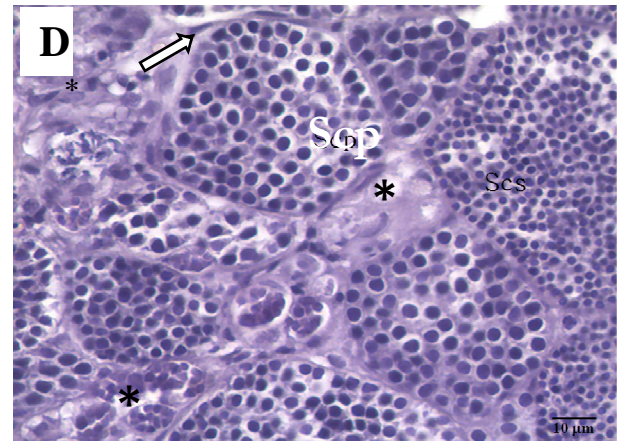
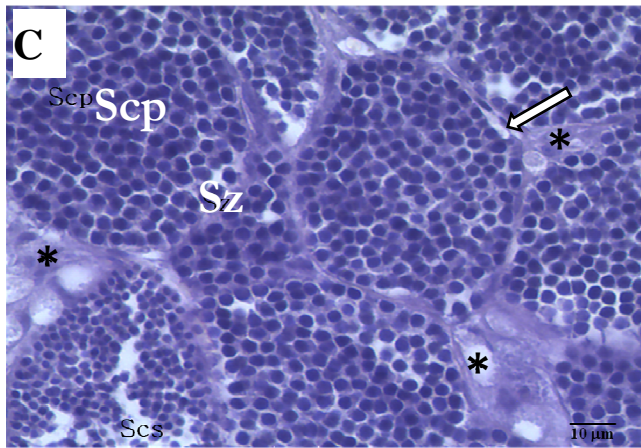
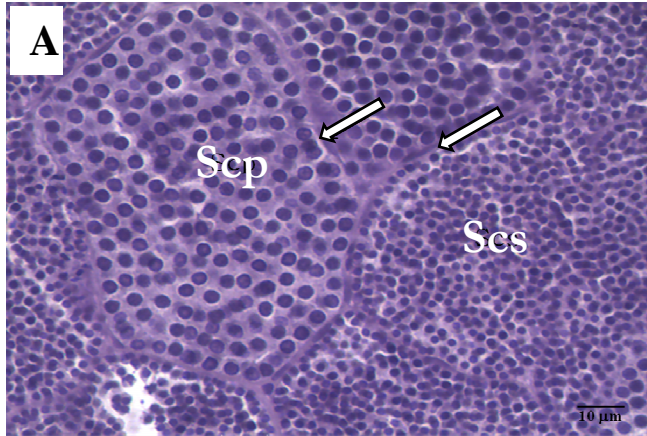
#### 3.4.A.3.6. Análisis ultraestructural del testículo

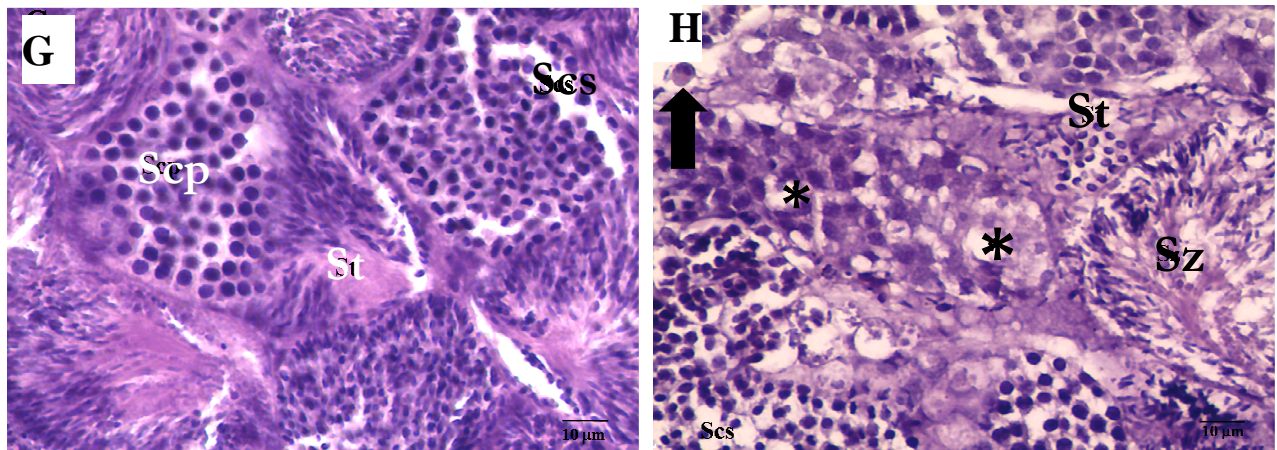
En los individuos controles la ultraestructura testicular responde a la descrita en el Capítulo 2, no registrándose alteraciones celulares.

En individuos expuestos a la concentración más baja (50 ng E<sub>2</sub>/L) se registró la presencia de cuerpos multivesiculares en regiones no asociadas al complejo de Golgi en el estadio de St, y numerosas mitocondrias alteradas, que en cortes transversales se evidencian engrosadas hacia los extremos (tomando una forma semejante a “auriculares”) (Fig 3.6 A). Además, se registró una gran hipertrofia de las células de Sertoli e incluso numerosos procesos de muerte celular en las mismas (Fig 3.6 B-C).

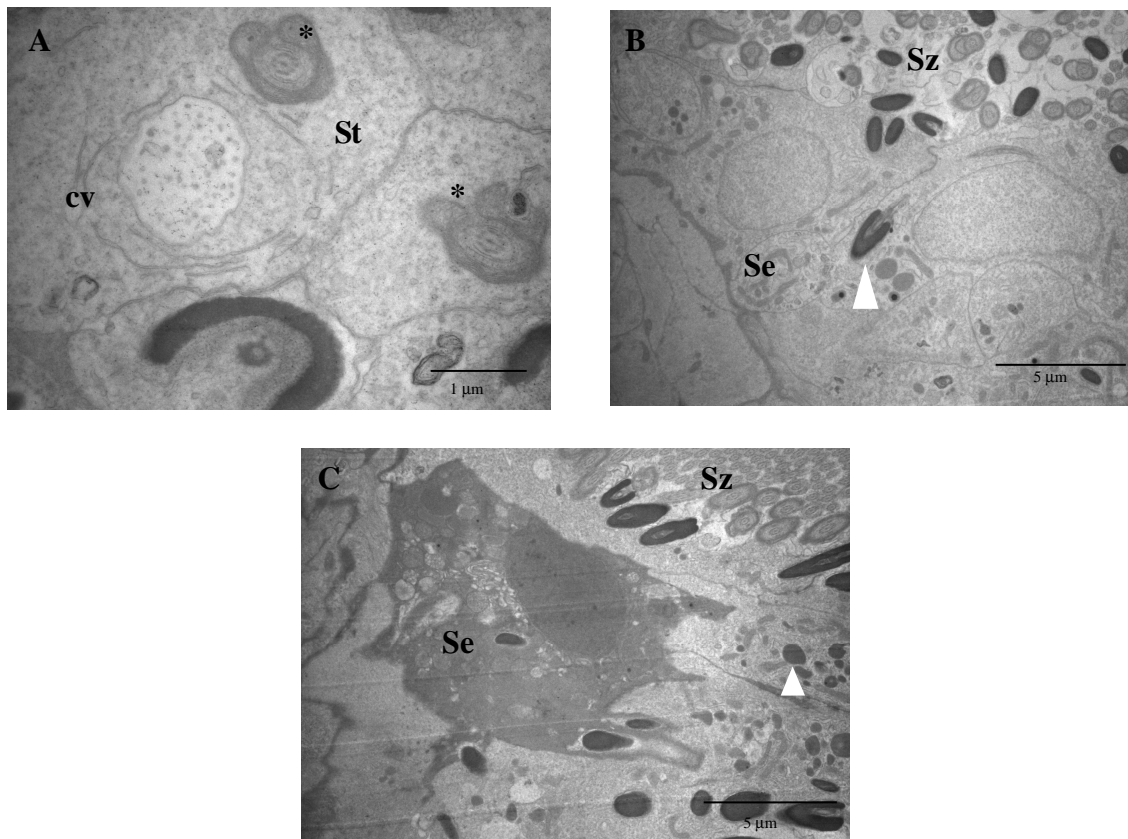
A 100 ng E<sub>2</sub>/L se evidenciaron mitocondrias con espacios dilatados entre crestas (Fig. 3.7 A) y una marcada hipertrofia de células de Sertoli, que a diferencia de la concentración más baja, se evidencia en cistos pertenecientes a estadios primordiales (Fig. 3.7 B). Por otro lado se observaron con frecuencia espermatogonias trinucleadas (Fig. 3.7 C), como así también apoptosis de estas células (Fig. 3.7 D). En cortes transversales y longitudinales de espermatozoides se observaron ondulaciones a nivel de la pieza media (Fig. 3.7 E).

A la concentración más alta de E<sub>2</sub> se observaron numerosos sincitios de células en estadios primordiales (Fig. 3.8 A). Además, se destacan numerosos cistos con St con núcleos fragmentados (cariorrexis) o bien con espermatozoides apoptóticos (Fig. 3.8 B-C). Se registró una marcada actividad fagocítica de las células de Sertoli en cistos maduros, en concordancia con numerosos espermatozoides que presentaron alteraciones morfológicas (principalmente a nivel de la pieza media).

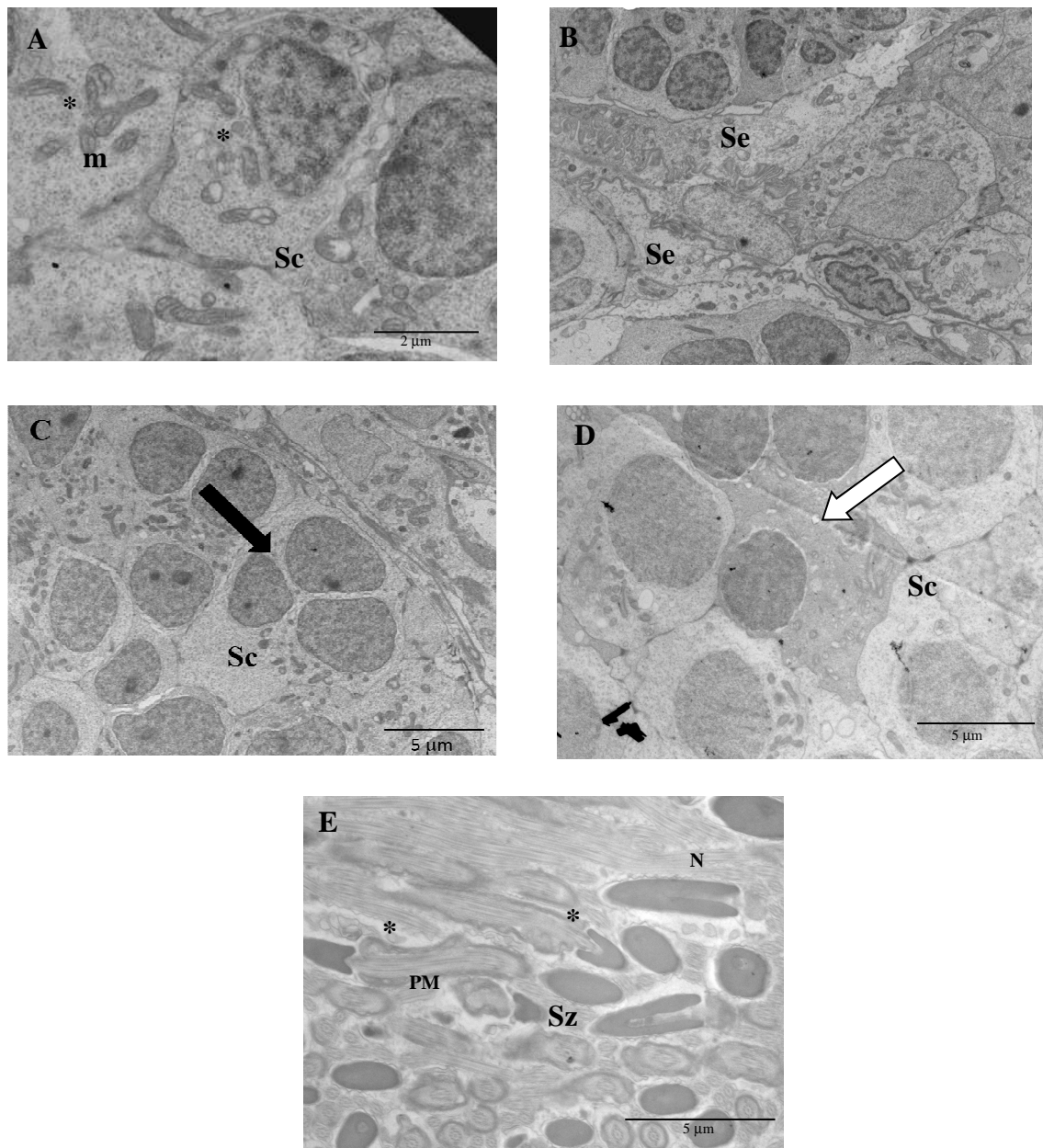




**Figura 3.4.** Histología de testículo de ejemplares adultos de *J. multidentata* pertenecientes a **(A-B)** grupo control donde puede observarse cistos en diferentes estadios espermatogénicos (magnificación 400x); **(C-D)** 50 ng E<sub>2</sub>/L donde puede observarse espermatogonias y espermatocitos con características anormales y presencia de vacuolares (magnificación 400x); **(E-F)** 100 ng E<sub>2</sub>/L donde puede observarse mezcla de cistos de diferentes estadios espermatogénicos y presencia de espermatogonias y espermatocitos con características anormales (magnificación 400x); **(G-H)** 250 ng E<sub>2</sub>/L donde se evidencia una desincronización en la división y diferenciación de células espermatogénicas y grandes procesos de vacuolización y apoptosis celular (H). Referencias: **Sc**: espermatocitos; **Sg**: espermatogonias; **St**: espermátidas; **Sz**: espermatozoides, **Asteriscos**: células vacuolares; **Flecha blanca**: Núcleo de célula de Sertoli; **Flecha negra**: célula apoptótica.

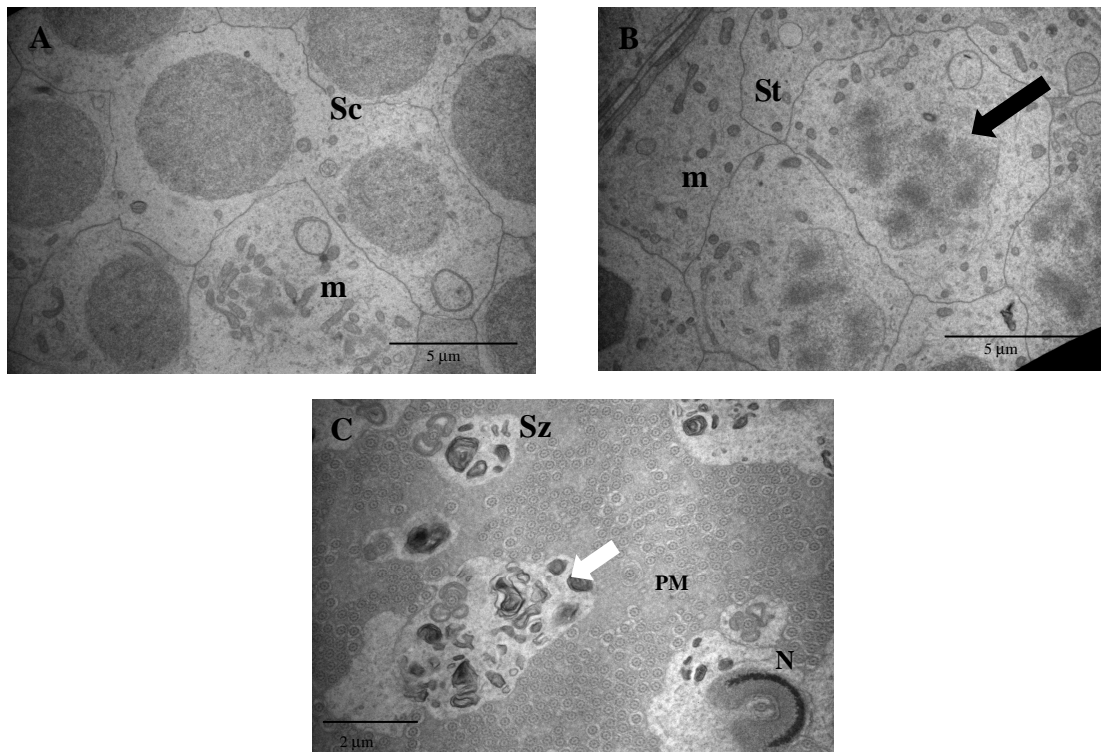


**Fig 3.6** Microfotografías del testículo de *J. multidentata* expuestos a 50 ng E<sub>2</sub>/L donde puede observarse: **(A)** cisto con espermatidas con presencia de cuerpos multivesiculares (cv), en regiones no asociadas al Golgi y alteraciones en la morfología de mitocondrias en forma de auriculares (asteriscos) (17000x); **(B)** marcada hipertrofia de células de Sertoli donde se evidencia fagocitosis de espermatozoides (4600x) y **(C)** célula de Sertoli que está sufriendo una muerte celular y presencia de una gran cantidad de espermatozoides fagocitados (triángulo blanco) (4600x). *Referencias:* cv: cuerpos multivesiculares; Se: Células de Seroli; St: espermatidas; Sz: espermatozoides. **Triángulo blanco** indica espermatozoides fagocitados.



**Fig 3.7.** Microfotografías de testículo de *J. multidentata* expuestos a 100 ng E<sub>2</sub>/L donde se observa: **(A)** Espermatoцитos con mitocondrias (m) con crestas dilatadas (asteriscos) (10000x); **(B)** Hipertrofia de células de Sertoli en estadios primordiales (3500x); **(C)** Espermatogonias trinucleadas (4600x) **(D)** Sincitio de espermatoцитos apoptóticos (4600x) y **(E)** alteraciones a nivel de la pieza media de espermatozoides donde se observan ondulaciones a nivel de la mitocondria (6000x) Referencias: **N:** núcleo; **PM:** pieza media; **m:** mitocondrias; **Se:** células de Sertoli; **Sg:** espermatogonias; **Sc:** espermatoцитos. **Asteriscos** indican alteraciones mitocondrias; **Flecha negra** indica células trinucleadas; **Flecha blanca** sincitio de Sc apoptóticos.





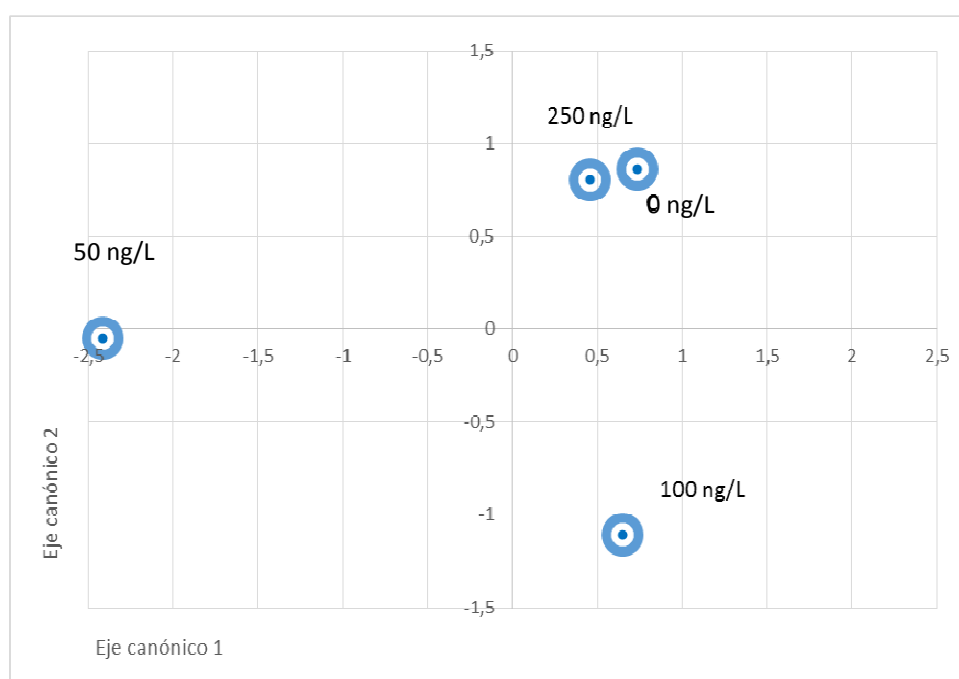
**Fig 3.8.** Microfotografías de testículo de *J. multidentata* expuestos a 250 ng E<sub>2</sub>/L donde se observa **(A)** Sincitios de espermatocitos debido a una citocinesis incompleta (4600x); **(B)** cariorrexis en espermatidas que indicarían procesos de necrosis o apoptosis (4600) y **(C)** cistos con espermatozoides muertos (7750x). Referencias: **N:** núcleo; **PM:** pieza media; **m:** mitocondrias; **Sc:** espermatocitos; **St:** espermatidas. Referencias: **Flecha negra** indica cariorrexis; **Flecha blanca:** espermatozoides muertos.

3.4.A.3.7 Análisis discriminante

El Análisis Discriminante arrojó un 77.5% de asignación correcta. En el procedimiento de validación cruzada, los individuos fueron asignados correctamente en su respectivo tratamiento en un 80% para el grupo control, 90% para la concentración de 50 ng E<sub>2</sub>/L y 70% para los tratamientos de 100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L (tabla 3.4). Se establecieron dos ejes canónicos que explicaron: el primero de ellos el 67% de la variabilidad total, mientras que el segundo el 33%. Las variables que mejor explicaron las diferencias entre grupos fueron para el 1° eje canónico IC/TP, mientras que para el 2° eje canónico fue C/NP. En la fig. 3.9 puede observarse que la concentración más baja de E<sub>2</sub> se diferencia del resto de los tratamientos.

**Tabla 3.4.** Matriz de clasificación cruzada de la variación la respuesta de biomarcadores de acuerdo a las distintas concentraciones de E<sub>2</sub> ensayadas.

Grupo	0 ng	50ng	100ng	250ng	Total	% de asignación correcta
0 ng	8	0	1	1	10	80
50ng	0	9	1	0	10	90
100ng	1	0	7	2	10	70
250ng	1	0	2	7	10	70
Porcentaje de asignación correcta						77.5



**Fig. 3.9.** Representación de distribución de centroides de los 4 tratamientos definidos a priori, en el espacio discriminante conformado por los ejes canónicos 1 y 2 .

#### 3.4.A.4. DISCUSION

Los biomarcadores utilizados para evaluar los efectos del E<sub>2</sub> sobre aspectos reproductivos de *J. multidentata* mostraron respuestas diferenciales de acuerdo a las concentraciones utilizadas.

En relación al comportamiento reproductivo, se registró una exacerbación en la actividad sexual de los machos expuestos a la concentración más baja utilizada (50 ng/L), ya que el 100% de los individuos comenzó su actividad sexual inmediatamente después de la introducción de la primera hembra, porcentaje superior al registrado en los individuos controles. Además, en estos individuos se observó un incremento significativo en la mayoría de los índices comportamentales. En las concentraciones más elevadas (100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L) sólo se registró una disminución significativa en la eficiencia de los intentos de cópula. La exacerbación en el comportamiento reproductivo observada a 50 ng/L, coincide con un incremento marcado en la expresión de la enzima esteroideogénica Citocromo P450 aromatasas cerebral en individuos machos de *J. multidentata* expuestos a las mismas concentraciones y condiciones que en este estudio (Guyón et al. 2012). Es ampliamente conocido que esta enzima regula el comportamiento reproductivo en peces (Pasmanik et al. 1988) y se expresa en áreas del cerebro relacionadas, entre otras funciones, con el control de la reproducción y el comportamiento sexual (Balthazart & Ball 1998, Menuet et al. 2005, Strobl-Mazzula et al. 2005). Por otra parte, la aromatasas participa en los procesos de olfacción procesando señales en partes del cerebro relacionadas con el comportamiento sexual de los machos (Hallgren et al. 2006). Schoenfuss et al. (2002) registraron en machos de *Carasius auratus* expuestos a 1  $\mu$ g/L del xenoestrógeno 4*n*-nonilfenol, un efecto aparentemente benéfico en su habilidad para defender el nido (respuesta excitatoria), mientras que aquellos expuestos a concentraciones más altas sufrieron efectos adversos. Se conoce que los machos son estimulados para desarrollar una performance reproductiva por las feromonas secretadas por las hembras inmediatamente antes y después de la ovulación (Sorensen & Stacey 1987). De esta manera, las bajas concentraciones de xenoestrógenos en el ambiente podrían actuar como un estímulo exógeno para el macho. Probablemente la concentración de (50 ng/L) evaluada en este trabajo esté actuando como un estímulo exógeno que promueve el comportamiento sexual en los machos de *J. multidentata* en conjunto con el aumento señalado en la aromatasas cerebral.

Sin embargo, otros estudios han documentado efectos adversos sobre el comportamiento reproductivo de los peces ante la exposición a compuestos con actividad estrogénica, mostrando en general una disminución de la performance reproductiva de los machos y una demasculinización comportamental (Bjerselius et al. 2001, Doyle & Lim 2005, Oshima et al.

2003). Reducciones en la actividad sexual han sido registradas o bien, en estudios a largo plazo (más de 10 semanas de exposición) en machos de *Carassius auratus* tras una exposición a 50 ng E<sub>2</sub>/L (Schoenfuss et al. 2002), en *P. reticulata* luego de la exposición a concentraciones elevadas de E<sub>2</sub> (10  $\mu$ g /L) (Bayley et al. 2002) y en *Gambusia affinis* expuestos a 20 ng E<sub>2</sub>/L (Doyle & Lim 2005) o a menor tiempo de exposición (28 días) pero a dosis mayores (0, 1 y 10  $\mu$ g E<sub>2</sub>/l) (Bjerselius et al. 2001). Las discrepancias en las respuestas comportamentales registradas por diferentes autores se relacionan con la sensibilidad de la especie en estudio, el tiempo de exposición y las dosis ensayadas.

En el presente trabajo solo se registró una disminución significativa del recuento espermático en los individuos expuestos a 50 ng/L. A pesar que estos machos fueron los que presentaron una mayor actividad sexual, el análisis estadístico no arrojó un efecto significativo del comportamiento sexual sobre el recuento espermático. Por tal motivo, la disminución en esta variable no estaría relacionada al mayor porcentaje de cópulas presentes en este tratamiento. Este resultado podría atribuirse a las alteraciones registradas en la célula de Sertoli (discutida posteriormente).

Los resultados registrados en la bibliografía sobre la relación entre la producción de esperma y la exposición a E<sub>2</sub> son diversos y contradictorios. Nielsen & Baatrup (2006) observaron una gran producción de esperma en peces expuestos a bajas concentraciones de E<sub>2</sub> (10 ng/L), la cual disminuía notablemente a concentraciones más altas (50 ng/L). Estos autores postularon que el aumento de los niveles de E<sub>2</sub> provoca un “feedback” positivo en la hipófisis ocasionando un incremento de la liberación de gonadotrofinas (GtH1 y GtH2), responsables de la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, lo cual ocasiona una mayor producción de esperma. Esta estimulación actúa hasta un cierto límite de exposición, sugiriendo un cambio en la función dependiendo de la concentración. Sin embargo, Doyle & Lim (2005), no registraron diferencias significativas en la cantidad de espermatozoides eyaculados en *G. affinis* expuestos a concentraciones de E<sub>2</sub> que van desde los 20 a 500 ng/L.

Por otra parte, la viabilidad y motilidad de los espermatozoides no se vio afectada por la exposición a E<sub>2</sub>. Cabe destacar que las alteraciones ultraestructurales registradas en las mitocondrias a nivel de la pieza podría sugerir alteraciones a nivel de la motilidad, pero esto no fue evidenciado. Estos resultados reflejarían que las concentraciones ensayadas o el tiempo de exposición no son suficientes para provocar efectos visibles sobre estos parámetros. Sin embargo puede señalarse un mayor porcentaje de espermatozoides muertos en los grupos tratados aunque este valor no fue significativo. La ausencia de efectos sobre estos parámetros espermáticos está en concordancia con lo registrado por Schoenfuss et al. (2002) en *P. promelas*

luego de 21 días de exposición a 50 ng E<sub>2</sub>/L y por Lahnsteiner et al. (2006) en individuos de *O. mykiss* expuestos durante 35 días a 0.5-2.5 ng E<sub>2</sub>/L. Estos autores consideran que el tiempo de exposición o las concentraciones ensayadas no son suficientes para evidenciar efectos sobre la motilidad.

Los índices somáticos K, IHS e IGS tampoco fueron afectados tras la exposición a E<sub>2</sub>. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en la misma especie, reflejó que exposiciones a concentraciones más elevadas de E<sub>2</sub> (1  $\mu$ g/L) por un período de 14 días, produjo un aumento significativo en el valor de K (Roggio et al. 2014). Estos autores mencionan que los individuos bajo este tratamiento evidenciaron, abundante tejido adiposo en la cavidad abdominal, lo cual podría deberse a una alteración en el metabolismo, estimulando la acumulación de lípidos y proteínas.

Diversos autores han demostrado que la exposición a estrógenos afecta la espermatogénesis en distintas especies de peces, a saber: disminuyendo el número de cistos con células espermatogénicas, alterando la morfología de células espermáticas, provocando alteraciones en células de Sertoli, etc. (Jobling et al. 1996, Gimeno et al. 1998, Kinnberg et al. 2000, Schoenfuss et al. 2002). En el presente trabajo se registraron numerosas alteraciones histológicas y ultraestructurales en las gónadas, pero ésto no se vio reflejado en una disminución en el valor del IGS. Esto no coincide con lo registrado en la bibliografía donde se evidenció una disminución en este índice en *Pimephales promelas* y *Carassius auratus* (Goldfish) expuestos durante tres semanas a altas concentraciones de E<sub>2</sub> (320 a 1000 ng/L y 1, 10  $\mu$ g/L respectivamente) (Panter et al. 1998, Bjerselius et al. 2001) y en guppies (*P. reticulata*), luego de 60 días de exposición a concentraciones de 30 a 100 ng/L (Toft & Baatrup 2001). De la misma manera, machos de *J. multidentata* expuestos durante 14 días a concentraciones elevadas de esta hormona (1000 ng E<sub>2</sub>/L) también mostraron una disminución en este índice (Roggio et al. 2012). La ausencia de efectos observada en el presente trabajo podría deberse a que las concentraciones utilizadas son inferiores a las reportadas en la bibliografía. Es importante también considerar el tiempo de exposición de los ejemplares al tóxico.

Se registraron numerosas alteraciones histológicas en los individuos expuestos a E<sub>2</sub> en todas las concentraciones estudiadas, evidenciando un aumento en la incidencia y gravedad de las mismas en relación con la concentración. Entre los cambios histológicos observados en esta tesis se menciona la presencia de cuerpos vacuolares, desorganización del tejido testicular y pérdida de la estructura de los cistos. En particular, las espermatogonias presentaron el mayor grado de alteración, registrándose procesos apoptóticos en ellas. Los daños observados podrían estar relacionados a alteraciones en las células de Sertoli, tal como fue demostrado a

través de los análisis ultraestructurales. Diversos autores han señalado que exposiciones a E<sub>2</sub> afectan a las células de Sertoli, produciendo hipertrofia e hiperplasia de las mismas (Christiansen et al. 1998; Kinnberg et al. 2000). La falla en la función de estas células es crítica durante la espermatogénesis, dado que uno de los roles más importantes que ellas cumplen es la regulación de este proceso. La identificación de los receptores estrogénicos en estas células las convierte en células blanco de compuestos xenoestrogénicos (Callard & Mak 1985, Ho et al. 1987).

Los análisis a nivel ultraestructural mostraron alteraciones comunes a todas las concentraciones aunque se evidencia un incremento en severidad de las mismas de manera concentración-dependiente. En las concentraciones de 50 y 100 ng E<sub>2</sub>/L se registraron ondulaciones a nivel de la pieza media que reflejan alteraciones a nivel de las mitocondrias, que podrían relacionarse con procesos de oxidación y/o muerte celular (Stevens & Lowe 2001). Por otra parte, la presencia de Sg trinucleadas con la consiguiente formación de sincitios, observadas en individuos expuestos a 100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L podría deberse a una citocinesis incompleta, indicando alteraciones a nivel de la meiosis. El registro de vacuolas citoplasmáticas reflejan procesos degenerativos, los cuales sumado a la observación de procesos de muerte celular (apoptosis y necrosis) a 100 y 250 ng E<sub>2</sub>/L, indicarían un claro efecto del E<sub>2</sub> sobre la espermatogénesis.

La marcada hipertrofia que se registró en las células de Sertoli, que indica una gran actividad fagocítica, concuerda con lo señalado por otros autores (Christiansen et al. 1998). Esta exacerbación de la actividad fagocítica es un indicador indirecto de alteraciones en las células espermatogénicas, ya sea durante los procesos de división/diferenciación o por efectos directos del E<sub>2</sub> sobre dichas células. Se cree que el registro de apoptosis en células de Sertoli en la concentración más baja de E<sub>2</sub> podría deberse a que estas se ven sobrepasadas ante una excesiva actividad fagocítica.

El análisis multivariado discriminante arrojó a las variables comportamentales como aquellas que mejor explican la variabilidad observada en el presente ensayo. Este análisis, además, reafirma que los individuos expuestos a 50 ng/L respondieron diferencialmente en comparación con los demás tratamientos.

Por otro lado, si bien no se incluyeron a las variables histológicas y ultraestructurales de los testículos dentro de este análisis, éstas respondieron de manera sensible aún a las concentraciones más bajas ensayadas.

## 3.5. Sección B

### *17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE<sub>2</sub>)*

#### **3.5.B.1. INTRODUCCIÓN**

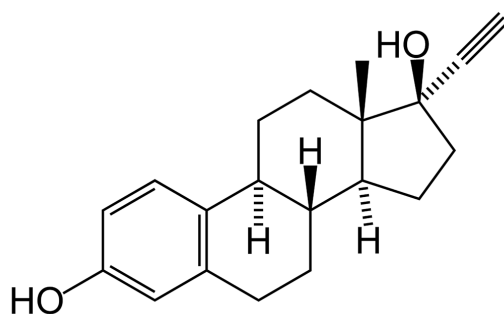
Los estrógenos sintéticos han sido utilizados durante años en animales y humanos para una amplia variedad de propósitos. Se los utiliza principalmente en píldoras anticonceptivas, terapia de reemplazo hormonal durante la menopausia y en tratamientos contra el cáncer. Dentro de estos compuestos podemos citar al grupo de los estrógenos (*17 $\alpha$ -etinilestradiol* y su éster 3-metilo, mestronal) y los progestágenos (como el levonorgestrel) (Flórez 2003).

El *17 $\alpha$ -etinilestradiol* (EE<sub>2</sub>) (Fig. 3.10) ha sido seleccionado como modelo de PEs en bioensayos, dada su relevancia ambiental así como también por sus efectos confirmados sobre el sistema reproductivo a través de las vías mediadas por receptores de estrógeno (Turan 1995, Ankley et al. 2001, Metcalfe et al. 2001, MacLatchy et al. 2003).

En general las hormonas sintéticas se metabolizan en los organismos más lentamente que las hormonas naturales ya que, el grupo *17 $\alpha$ -etinil* o el grupo metilo están diseñados específicamente para evitar la conversión metabólica a estrona o androstenediona respectivamente, siendo éstos menos activos (Kime 1998). En los humanos la afinidad de unión del EE<sub>2</sub> a los receptores de estrógenos (RE) es 1 a 2 veces mayor que la de la hormona natural E<sub>2</sub> (Flórez 2003), y se ha demostrado que en algunas especies de peces puede ser de 10 a 50 veces más potente que el E<sub>2</sub> (Thorpe et al. 2003, Nash et al. 2004, Tilton et al. 2005, Zhang et al. 2009, Segner et al. 2010). Esta gran afinidad por los RE indica que el EE<sub>2</sub> posee una mayor potencia estrogénica para ejercer una respuesta con respecto a la hormona endógena (Nash et al. 2004). Las vías de excreción de estas hormonas es a través de la orina o las heces.

Luego de ser excretado por los humanos, el EE<sub>2</sub> ingresa a las plantas de tratamientos cloacales donde permanece relativamente estable durante los procesos de tratamiento de aguas residuales (Ternes et al. 1999). Este compuesto es más persistente que los esteroides naturales en aguas superficiales y su potencial para adsorberse a los sedimentos es mayor. Se

encuentra ampliamente distribuido en los cursos de agua, en concentraciones que generalmente van desde 0.05 a 15 ng/L, sin embargo en algunos casos se ha llegado a detectar concentraciones excepcionalmente altas (831 ng/L) (Desbrow et al. 1998, Ternes et al. 1999, Kolpin et al. 2002, Yin et al. 2002, Cargouët et al. 2004, Zuo et al. 2006). En Argentina, Valdés et al. (2015) registraron en el Río de la Plata y zona aledañas concentraciones de EE<sub>2</sub> que oscilaron entre 65 a 187 ng/L.



**Fig. 3.10** Forma estructural del 17 $\alpha$ - etinilestradiol.

La potencia estrogénica de este esteroide, su persistencia ambiental y la habilidad para bioconcentrarse en los tejidos de los peces, convierten al EE<sub>2</sub> en un riesgo potencial para éstos y otros organismos acuáticos (Lange et al. 2001, Schultz et al. 2001, Nash et al. 2004). En la bibliografía se evalúan los efectos de altas dosis de este compuesto en cortos períodos de tiempo (2-7 días), o de bajas concentraciones pero en períodos prolongados (generalmente desde el nacimiento hasta el estadio adulto). En estos trabajos se citan los efectos negativos de la exposición a EE<sub>2</sub> sobre la expresión y actividad de la enzima aromatasa (Kazeto et al. 2004, Lyssimachou et al. 2006, Vosges et al. 2010, 2011), sobre el comportamiento reproductivo (Kristensen et al. 2005, Colman et al. 2009, Saaristo et al. 2009), histología de gónadas (Weber et al. 2003, Velazco-Santamaría et al. 2010), fecundidad y éxito reproductivo (Balch et al. 200, Parrott & Blunt 2005) e incluso reversión sexual (Lange et al. 2009) y alteraciones a nivel de las poblaciones de peces (Kidd et al. 2007).

De acuerdo a los antecedentes expuestos el objetivo principal que se desarrolla en esta sección fue evaluar los efectos de concentraciones ambientalmente relevantes de EE<sub>2</sub> sobre el comportamiento reproductivo, variables espermáticas, índices somáticos, histología y ultraestructura de gónadas en machos de la especie autóctona *J. multidentata* expuestos durante 14 días.



### 3.5.B.2. *Condiciones de Exposición y determinación de EE<sub>2</sub> en agua*

Los peces utilizados en el ensayo fueron recolectados durante el mes de febrero de 2011. Los valores promedio de longitud estándar y peso de los mismos fueron:  $29.01 \pm 2.33$  mm y  $0.49 \pm 0.13$  g, respectivamente. Las concentraciones nominales de EE<sub>2</sub> (99.1% de pureza) utilizadas fueron: 10, 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L. Se contó con un grupo control sin EE<sub>2</sub>.

Se utilizó el compuesto 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE<sub>2</sub>) (99,1 % de pureza) marca Sigma- Aldrich. La solución madre EE<sub>2</sub> ( $6,7 \times 10^{-4}$  M) se preparó en acetona (Merck Químico). Teniendo en cuenta que la vida media del EE<sub>2</sub> es de  $33 \pm 13$  h (Nagpal & Meays 2009), las soluciones se renovaron cada 24 horas. La concentración de EE<sub>2</sub> en las peceras se verificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas usando un triple cuadrupolo analizador, con una fuente de ionización por electrospray que opera en modo positivo (HPLC-ESI-MS/MS) después de la extracción de muestra (Yan et al. 2009; Vulliet et al. 2008). El porcentaje de recuperación fue evaluado en muestras de agua de acuario a las que se les adicionó 50 ng/L EE<sub>2</sub>, registrando un valor de recuperación del 59%, siendo el límite de cuantificación de 5 ng/L. Se recolectó muestras de agua de las peceras para cuantificar la concentración de EE<sub>2</sub> antes y después del reemplazo del agua

### 3.5.B.3. RESULTADOS

#### 3.5.B.3.1 *Contenido de EE<sub>2</sub> en agua*

A tiempo 0 h, los niveles residuales de EE<sub>2</sub> registrados para cada concentración fueron:  $5 \pm 6$  ng para la concentración más baja de EE<sub>2</sub>,  $64 \pm 8$  para 75ng/L y  $127 \pm 15$  para la concentración más alta de este compuesto. Luego de 24 h de exposición, los niveles de EE<sub>2</sub> residuales fueron entre 15 y 55% para las concentraciones más altas ensayadas (75 y 150 ng/L). Sin embargo, los niveles residuales de EE<sub>2</sub> (10 ng /L) estuvieron por debajo del límite de detección.

#### 3.5.B.3.2. *Mortalidad e Índices somáticos*

Luego de la exposición de ejemplares de *J. multidentata* a EE<sub>2</sub> no se registró ningún deceso en el grupo control, mientras que en los grupos tratados con 10, 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L murieron

uno, tres y dos individuos, respectivamente. Por lo tanto se asume que la mortalidad observada no está relacionada con la exposición al tóxico.

No se observaron cambios significativos en el factor de condición (K) e índice hepatosomático (IHS) entre tratamientos, incluido el grupo control (tabla 3.5). Por otra parte, el índice gonadosomático (IGS) se diferenció significativamente de manera dependiente de la concentración. Los machos expuestos a 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L mostraron una disminución significativa del índice con respecto a la concentración más baja (10 ng/L) y al grupo control.

**Tabla 3.5.** Índices somáticos evaluados en machos adultos de *J. multidentata* tras 28 días de exposición a 0 (control), 10, 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L. Referencias: **K**: Factor de condición; **IHS**: Índice hepatosomático; **IGS**: Índice gonadosomático. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Índices	0 ng EE <sub>2</sub> /L	10 ng EE <sub>2</sub> /L	75 ng EE <sub>2</sub> /L	150 ng EE <sub>2</sub> /L	F	p
<b>K</b>	1.95 $\pm$ 0.14	1.98 $\pm$ 0.03	1.99 $\pm$ 0.03	1.89 $\pm$ 0.04	1.40	0.2529
<b>IHS</b>	2.47 $\pm$ 0.64	2.59 $\pm$ 0.20	2.39 $\pm$ 0.13	2.53 $\pm$ 0.25	0.17	0.9179
<b>IGS</b>	2.74 $\pm$ 0.76a	2.55 $\pm$ 17a	1.90 $\pm$ 0.12b	1.18 $\pm$ 0.17c	17.01	<0.0001

### 3.5.B.3.3. *Comportamiento Reproductivo*

El 100% de los machos del grupo control tuvo un comportamiento sexual ante la presencia de la hembra, disminuyendo este porcentaje significativamente en los individuos expuestos a todas las concentraciones de EE<sub>2</sub>. A la menor concentración ensayada, un 60% de individuos tuvo actividad sexual ( $z=-2.58$ ;  $p=0.009$ ), mientras que esto fue observado en un 70% a 75 ng EE<sub>2</sub>/L ( $z=-2.07$ ;  $p=0.038$ ), y en un 50% a la concentración más alta evaluada ( $z=-3.16$ ;  $p=0.002$ ).

Al considerar solo los individuos que mostraron comportamiento reproductivo, se registró que el 80% de los machos control inició su actividad sexual ante la primera hembra, mientras que este porcentaje disminuyó en las otras concentraciones, registrándose valores de 50% a 10 ng EE<sub>2</sub>/L ( $z=-1.362$ ;  $p=0.173$ ), 43% para 75 ng EE<sub>2</sub>/L ( $z=-1.98$ ,  $p=0.047$ ) y 40% para la concentración más alta ( $z=-1.70$ ;  $p=0.088$ ). En cuanto a número de machos en los que se registró al menos una cópula sostenida fue de 6 para el grupo control, 1 para 10 ng EE<sub>2</sub>/L y ninguno en las concentraciones más altas.

En todas las concentraciones de EE<sub>2</sub> se observó una disminución significativa de las variables TP, IC y C con respecto al grupo control (tabla 3.6). Teniendo en cuenta la relación

entre estas variables se registró una disminución significativa en las proporciones C/TP, IC/P y C/P para todas las concentraciones de EE<sub>2</sub> ensayadas. A 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L la efectividad de los intentos de cópulas (C/IC) disminuyó de manera significativa en más del 50% respecto a 10 ng EE<sub>2</sub>/L y el grupo control.

**Tabla 3.6.** Variables de comportamiento reproductivo registradas en machos de *J. multidentata* tras 28 días de exposición a 0, 10, 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L. Referencias: **TP**: tiempo de persecución (seg), **P**: número de persecuciones, **IC**: intentos de cópula, **C** = cópulas. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos parámetros ( $p < 0.05$ ).

Variables	0 ng EE <sub>2</sub> /L	10 ng EE <sub>2</sub> /L	75 ng EE <sub>2</sub> /L	150 ng EE <sub>2</sub> /L	F	p
<b>TP</b>	72.40 $\pm$ 6.80 <b>a</b>	36.80 $\pm$ 10.89 <b>b</b>	20.80 $\pm$ 9.04 <b>b</b>	42.2 $\pm$ 11.34 <b>b</b>	3.80	<b>0.0273</b>
<b>P</b>	23.83 $\pm$ 1.96	18.60 $\pm$ 5.53	10.80 $\pm$ 4.22	17.60 $\pm$ 3.97	1.66	0.2082
<b>IC</b>	45.60 $\pm$ 8.78 <b>a</b>	18.00 $\pm$ 16.35 <b>b</b>	5.40 $\pm$ 0.81 <b>c</b>	18.20 $\pm$ 6.76 <b>b</b>	5.81	<b>0.0054</b>
<b>C</b>	17.60 $\pm$ 5.0 <b>a</b>	3.25 $\pm$ 1.31 <b>b</b>	0.80 $\pm$ 0.37 <b>b</b>	2.80 $\pm$ 1.59 <b>b</b>	4.91	<b>&lt;0.0001</b>
<b>P/TP</b>	0.34 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.04	2.09	0.1367
<b>IC/TP</b>	0.62 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.07	2.73	0.0745
<b>C/TP</b>	0.24 $\pm$ 0.05 <b>a</b>	0.14 $\pm$ 0.05 <b>b</b>	0.07 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	0.05 $\pm$ 0.02 <b>b</b>	3.53	<b>0.0360</b>
<b>IC/P</b>	1.98 $\pm$ 0.51 <b>a</b>	0.85 $\pm$ 0.22 <b>b</b>	0.58 $\pm$ 0.14 <b>b</b>	0.87 $\pm$ 0.20 <b>b</b>	3.73	<b>0.0471</b>
<b>C/P</b>	0.80 $\pm$ 0.30 <b>a</b>	0.32 $\pm$ 0.16 <b>b</b>	0.11 $\pm$ 0.04 <b>b</b>	0.13 $\pm$ 0.06 <b>b</b>	2.61	0.0833
<b>C/IC</b>	0.37 $\pm$ 0.04 <b>a</b>	0.33 $\pm$ 0.19 <b>a</b>	0.15 $\pm$ 0.06 <b>b</b>	0.13 $\pm$ 0.05 <b>b</b>	3.81	0.0400

#### 3.5.B.3.4. *Parámetros espermáticos*

El comportamiento sexual previo no afectó a la motilidad ( $F = 2.90$ ,  $p = 0.124$ ) ni a la viabilidad espermática ( $F = 2.50$ ,  $p = 0.072$ ). Por este motivo el análisis estadístico se realizó de manera conjunta entre los individuos CC y SC. Sin embargo, el comportamiento sexual influyó el recuento espermático ( $F = 2.86$ ,  $p = 0.011$ ), por lo que dichos datos se analizaron de manera independiente (tabla 3.7)

Los individuos controles, a los cuales se les registró el comportamiento reproductivo (CC), mostraron un menor número de espermatozoides que aquellos a los que no (SC). Esto se correlacionaría con el alto porcentaje de cópulas registrado para este grupo ( $p = 0.003$ ;  $r^2 = -0.75$ ). Sin embargo, en los individuos tratados con EE<sub>2</sub> no se evidenciaron diferencias significativas en el recuento entre los ejemplares con CC y SC, aunque para la concentración más baja, se registró un menor recuento en los individuos con actividad sexual. No se evidenció tampoco, una correlación entre el porcentaje de cópulas y el recuento en las diferentes concentraciones de EE<sub>2</sub> ensayadas ( $p = 0.18$ ,  $r^2 = -0.46$  (10 ng/L);  $p = 0.91$ ,  $r^2 = -0.0575$

(75ng/L);  $p=0.22$ ,  $r^2=0,67$  (150 ng/L). En cuanto a los parámetros dinámicos, no se registraron diferencias significativas en los valores de VL, VCL y linealidad en las diferentes concentraciones. Sin embargo si se observó un efecto negativo del EE<sub>2</sub> sobre la viabilidad espermática a la concentración más alta de EE<sub>2</sub> (150 ng/L) ( $F= 3.75$ ;  $p=0.0258$ ), evidenciándose un menor porcentaje de espermatozoides móviles y un consecuente incremento en el porcentaje de espermatozoides inmóviles y muertos con respecto a los demás tratamientos.

**Tabla 3.7.** Parámetros espermáticos registrados en machos de *J. multidentata* tras 28 días de exposición a 0 (control), 10, 75 y 150 ng/L de E<sub>2</sub>. Referencias: **Parámetros de motilidad:** **VL:** Velocidad lineal ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **VCL:** Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **LIN:** porcentaje de linealidad; **Recuento espermático** (cel/ $\mu\text{l}$ ) **SC:** sin comportamiento reproductivo previo, **CC:** con comportamiento reproductivo previo; **Viabilidad:** **VM:** porcentaje de células móviles; **VI:** porcentaje de células inmóviles y **M=**porcentaje de espermatozoides muertos. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos parámetros ( $p<0.05$ ).

Parámetros	0 ng EE <sub>2</sub> /L	10 ng EE <sub>2</sub> /L	75 ng EE <sub>2</sub> /L	150 ng EE <sub>2</sub> /L	F	p
<b>VL</b>	100.81 $\pm$ 4.32	105.42 $\pm$ 3.57	102.54 $\pm$ 3.87	109.37 $\pm$ 2.88	1.15	0.3125
<b>VCL</b>	102.97 $\pm$ 4.54	108.50 $\pm$ 3.57	106.94 $\pm$ 4.44	106.11 $\pm$ 7.79	1.31	0.2954
<b>LIN</b>	99.00 $\pm$ 0.05	99.00 $\pm$ 0.21	98.00 $\pm$ 0.54	99.00 $\pm$ 0.35	0.54	0.8453
<b>VM</b>	82.09 $\pm$ 2.66a	75.35 $\pm$ 4.34a	76.16 $\pm$ 4.55a	65.34 $\pm$ 3.77b	4.36	<b>0.0265</b>
<b>VI</b>	12.11 $\pm$ 2.61a	18.85 $\pm$ 3.06a	17.31 $\pm$ 3.20a	24.09 $\pm$ 3.99b	4.30	<b>0.0288</b>
<b>M</b>	5.84 $\pm$ 0.74a	6.15 $\pm$ 1.23a	6.53 $\pm$ 2.49a	10.57 $\pm$ 1.56b	5.52	<b>0.0227</b>
<b>Recuento SC</b>	2387 $\pm$ 564a	2199 $\pm$ 744a	2221 $\pm$ 78 a	1983 $\pm$ 629 a	3.86	<b>0.0434</b>
<b>Recuento CC</b>	893 $\pm$ 101b	1290 $\pm$ 187a	1904 $\pm$ 782 a	1704 $\pm$ 595 a		

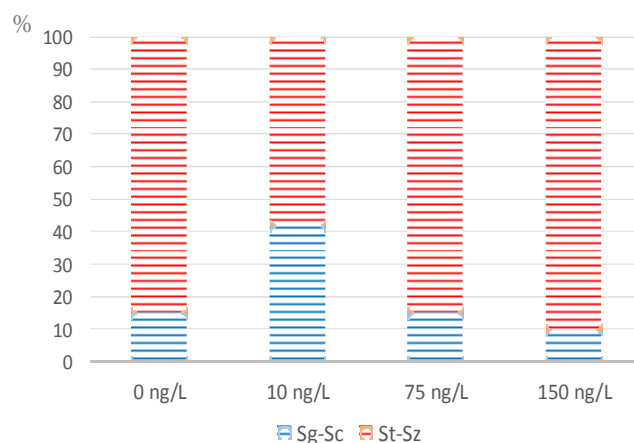
#### 3.5.B.3.4. Análisis histológico del testículo

Todos los estadios celulares de la espermatogénesis estuvieron representados tanto en el grupo control como en los individuos expuestos a EE<sub>2</sub>. En el grupo control se registró un promedio de 85% de cistos conteniendo estadios maduros de desarrollo (St-Sz). Al comparar este resultado con lo observado en los individuos expuestos, si bien en ninguno de los casos arrojó diferencias significativas, en la concentración más baja ensayada se observó una tendencia a un menor porcentaje de cistos maduros ( 58%;  $Z=-1.09$ ,  $p= 0.049$ ), mientras que entre las concentraciones más altas de EE<sub>2</sub> el porcentaje fue similar al grupo control,

registrándose para 75 ng EE<sub>2</sub>/L un promedio de 84% ( $Z=-0.05$ ,  $p= 0.95$ ), mientras que para 150 ng EE<sub>2</sub>/L un 90% ( $Z=0.28$ ,  $p= 0.77$ ) (Fig. 3.11).

El análisis histológico de gónadas reveló que los testículos de los individuos control presentaron una estructura tisular normal, sin alteraciones evidentes (Fig. 3.12 A-B). A la concentración más baja ensayada se registraron las siguientes alteraciones histológicas: vacuolización celular, principalmente a nivel de las Sg donde además se observaron que en muchos casos éstas que pierden la conexión con células vecinas modificándose también su morfología. Se han evidenciado numerosos cistos con Sc alterados y desorganización del tejido testicular donde se mezclan cistos pertenecientes a distintos estadios celulares. Por otro lado, se observó con frecuencia una desincronización en los procesos de división y/o diferenciación dentro de los cistos, principalmente a nivel de las St, donde se divisa la formación del flagelo pero no el arriñonamiento del núcleo (Fig. 3.12 C-D).

Los individuos expuestos a 75 ng EE<sub>2</sub>/L presentaron frecuentemente Sg y Sc muy alteradas, con diferente grado de vacuolización, pérdida de conexión entre células, formación de sincitios y necrosis; presencia de cistos con células inmaduras en la región donde se encuentran St-Sz y desincronización dentro de cistos maduros (St con flagelo pero núcleo no arriñonado) (Fig. 3.12 E-F). Finalmente, los individuos expuestos a la concentración más alta (150 ng EE<sub>2</sub>/L) registraron todas las alteraciones halladas en las concentraciones inferiores, pero la extensión y frecuencia de las lesiones fue mayor. Además se observó vacuolización y fagocitosis de cistos completos por parte de las células de Sertoli (Fig. 3.12 F-G).



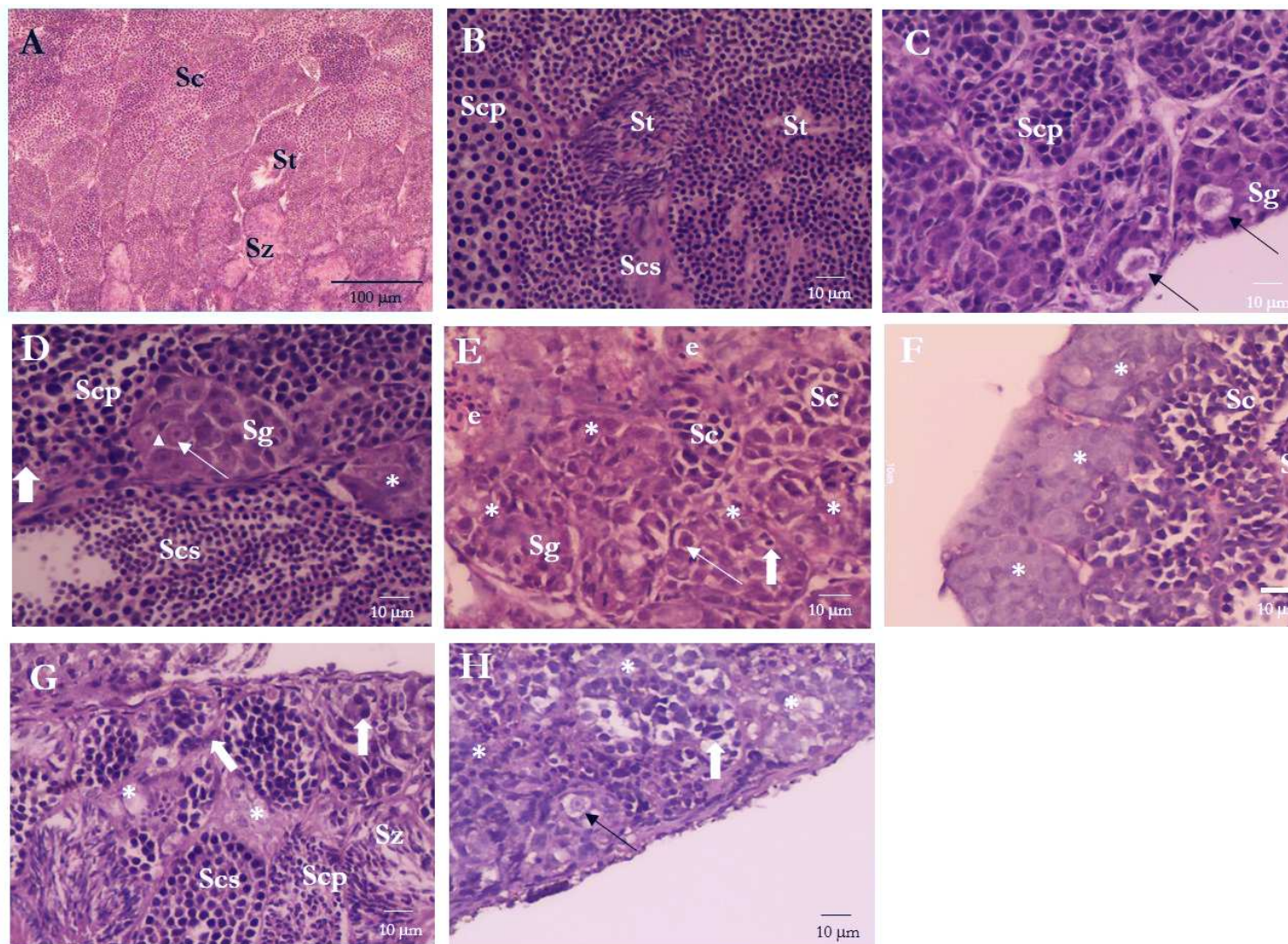
**Fig. 3.11.** Proporciones de cistos conteniendo estadios primordiales de desarrollo: espermatogonias (Sg) y espermatocitos (Sc) (color azul) y estadios maduros: espermátides (St) y espermatozoides (Sz) (color rojo), para cada concentración de E<sub>2</sub> y grupo control (0 ng/L).

*3.5.B.3.5 Ultraestructura del testículo*

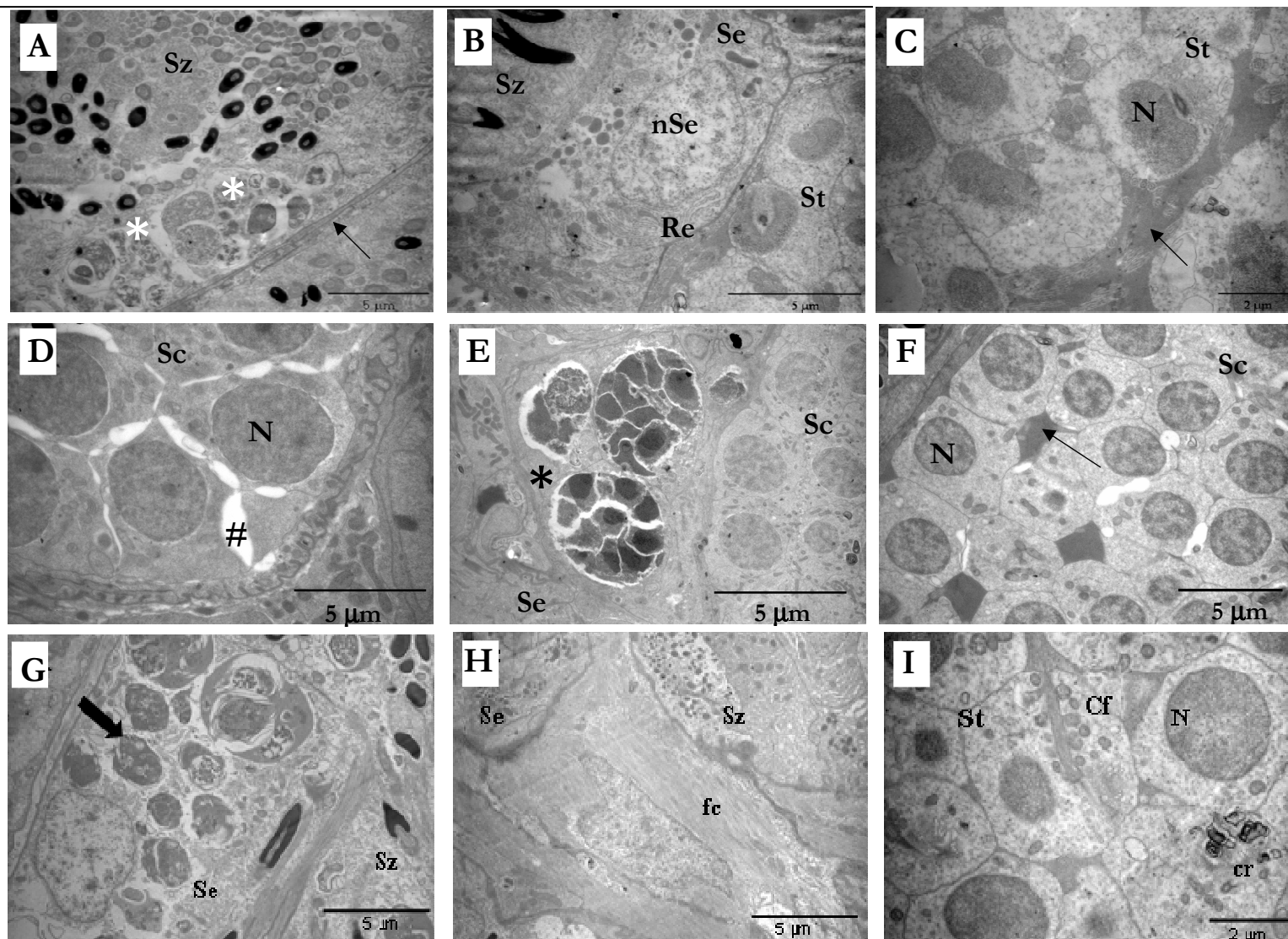
En los individuos controles la ultraestructura testicular responde a la descrita en el Cap. 2., donde no se registraron alteraciones celulares. En cambio, individuos expuestos a la concentración más baja de EE<sub>2</sub> mostraron una marcada actividad fagocítica por parte de las células de Sertoli (Fig. 3.13A) y desincronización en el proceso espermatogénico, ya que se observan cistos conteniendo células en diferentes estadios espermatogénicos. Se observaron además, células de Sertoli con una gran cantidad de retículo endoplásmico, (Fig. 3.13B) y la presencia de material dentro de los cistos que podría provenir de la desnaturalización de proteínas o ser secreciones provenientes de las células de Sertoli (Fig. 3.13C).

A 75 ng EE<sub>2</sub>/L se registró una marcada pérdida de conexión entre las células de un mismo cisto, numerosos cistos apoptóticos y, al igual que en la menor concentración de EE<sub>2</sub>, se registró la presencia de material dentro de los cistos, de naturaleza desconocida (Fig. 3.13 D-F).

A la concentración más alta (150 ng EE<sub>2</sub>/L) se evidenció con frecuencia fagocitosis de cistos enteros (Fig. 3.13G) y numerosas fibras de colágeno tipo I en el espacio intersticial. Esto denota injurias del tejido espermatogénico el cual es reemplazado por células estromales (Fig. 3.13H). Además se observó desincronización en la diferenciación celular especialmente a nivel de espermatidas, donde la formación del aparato flagelar carece del característico arriñonamiento del núcleo (Fig. 3.13I).



**Fig. 3.12.** Cortes histológicas de testículo de ejemplares adultos de *J. multidentata* pertenecientes a: **(A-B)** grupo control donde puede observarse cistos en diferentes estadios espermatogénicos; (A, 40x y B 400X); **(C-D)** 10 ng EE<sub>2</sub>/L donde puede observarse la presencia de espermatogonias alteradas (flechas delgadas) y células apoptóticas (flechas gruesas) (ambas magnificación 400x); **(E-F)** 75 ng EE<sub>2</sub>/L donde puede observarse pérdida de estructura de cistos, presencia de espermatogonias y espermatocitos con características anormales, células apoptóticas (flechas gruesas), vacuolización (asteriscos) y congestión vascular (e)(magnificación 400x); **(G-H)** 150 ng E<sub>2</sub>/L donde se evidencia cistos alterados principalmente en estadios primordiales y una marcada presencia de vacuolización (magnificación 400x). Referencias: e: eritrocitos, Sc: espermatocitos; Sg espermatogonias; St: espermátidas; Sz: espermatozoides; Asteriscos indican células vacuolares; Flecha delgada: espermatogonia alterada; Flecha gruesa: célula apoptótica; Triángulo: Célula de Sertoli.



**Fig. 3.13.** Microfotografías de testículo de *J. multidentata* expuestos a (A-C) 10 ng EE<sub>2</sub>/L; (D-F) 75 ng EE<sub>2</sub>/L y (G-I) 150 ng EE<sub>2</sub>/L. Magnificación de (A) 4600x (B) 6000x (C) 7750x (D) 6000x (E-F) 4600x (G) 4600x (H) 4600x (I) 7750x. Referencias: cf: complejo flagelar; cr: cuerpos residuales; fb: fibras de colágeno; núcleo; nSe: núcleo célula de Sertoli; Sc: espermatoцитos; Sg: espermatogonias; St: espermátidas; Sz: espermatozoides, Asteriscos: fagocitosis de células; numeral: pérdida de conexión de células; Flecha negra fina: material dentro del cisto; Flecha blanca fina: límite entre dos cistos; Flecha gruesa: fagocitosis de cisto enteros.

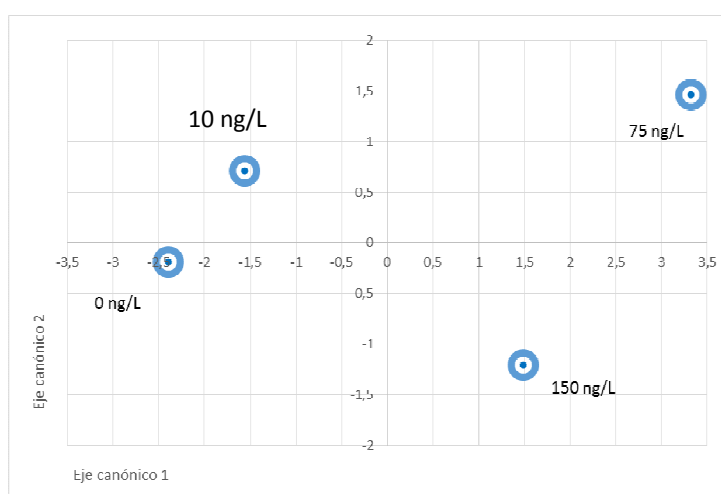


3.5.B.3.7 Análisis Discriminante

El Análisis Discriminante arrojó un 90 % de asignación correcta. En el procedimiento de validación cruzada, los individuos fueron asignados correctamente en su respectivo tratamiento en un 80% para el grupo control y la concentración más baja, y en un 100% para los tratamientos 75 y 150 ng EE<sub>2</sub>/L (tabla 3.8). Se establecieron dos ejes canónicos que explicaron, el primero de ellos, el 76.26% de la variabilidad total, mientras que el segundo el 23.74%. Las variables que mejor expresaron las diferencias entre grupos fueron para el primer eje canónico IC/NP, mientras que para el segundo eje fue C/TP, ambas variables comportamentales. En la fig. 3.14 puede observarse que las concentraciones más altas de EE<sub>2</sub> se diferencian del control y la concentración más baja de EE<sub>2</sub> (Fig. 3.9).

**Tabla 3.8.** Matriz de clasificación cruzada de la variación la respuesta de biomarcadores de acuerdo a las distintas concentraciones de EE<sub>2</sub> ensayadas.

Grupo	0 ng	10ng	75 ng	150ng	Total	% de asignación correcta
0 ng	8	2	0	0	10	80
50 ng	2	8	0	0	10	80
75 ng	0	0	10	0	10	100
150 ng	0	0	0	10	10	100
Porcentaje de asignación correcta						90



**Fig. 3.9.** Representación de distribución de centroides de los 4 tratamientos definidos a priori, en el espacio discriminante conformado por los ejes canónicos 1 y 2 .

### 3.5.4. DISCUSIÓN

A través del presente ensayo se observó que el compuesto sintético EE<sub>2</sub> (en las concentraciones utilizadas en este estudio) afectó negativamente diversos parámetros reproductivos de la especie íctica *J. multidentata*.

De las variables reproductivas analizadas, el comportamiento reproductivo fue el biomarcador más sensible ante la exposición a EE<sub>2</sub>. Una menor actividad sexual y una disminución significativa en la mayoría de las variables comportamentales, fueron registradas en todas las concentraciones de EE<sub>2</sub> ensayadas, observándose una notable falta de interés del macho hacia la hembra. Demski & Hallgren et al. (2006) postularon que la exposición a compuestos estrogénicos disminuye la capacidad de los machos para identificar señales olfativas femeninas lo que provocaría una reducción en el interés hacia las hembras. Este hecho podría ser una de las causas que incidiría en la falta de interés del macho hacia la hembra registrada en este estudio. Diversos autores además han comprobado que la exposición a compuestos estrogénicos provoca una reducción de las hormonas androgénicas circulantes, ya que alteran el proceso de esteroidogénesis, afectando aspectos de la conducta sexual masculina (Toft & Baatrup 2003, Martinovic et al. 2007).

Para la variable IC se registró un menor valor en la concentración de 75 ng/L. Si bien para las otras variables no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de EE<sub>2</sub>, se evidencia una tendencia a una disminución en el comportamiento reproductivo a la concentración mencionada. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado de manera paralela con *J. multidentata* en relación a la expresión de la aromatasa cerebral, donde se registró un pico de esta enzima a 75 ng/L (Guyón et al. 2014). Melo & Ramsdell (2001) han sugerido que la exposición a estrógenos produce en machos una feminización en el fenotipo del cerebro, que incluye una elevación de los niveles totales de actividad de aromatasa y un incremento de actividad de esta enzima en áreas en las cuales las hembras exhiben mayores niveles. Si bien algunos autores señalan que la función del proceso de aromatización en la regulación del comportamiento sexual en peces no está completamente dilucidado (Blázquez & Somoza 2010, Vizziano-Cantonnet et al. 2011), otros atribuyen cambios en el comportamiento sexual en individuos expuestos a EE<sub>2</sub>, a variaciones en la expresión de la aromatasa cerebral (Hallgren et al. 2006).

Al analizar la efectividad de los intentos de cópulas (C/IC), se evidenció que los individuos expuestos a las dos concentraciones más elevadas de EE<sub>2</sub> (75 y 150 ng/L) disminuyeron los valores a más del 50% respecto a la concentración de 10 ng EE<sub>2</sub>/L y al grupo control. La disminución en el número y efectividad de las cópulas registradas para las concentraciones más elevadas de EE<sub>2</sub> impactarían negativamente sobre la reproducción de esta especie ya que Bisazza et al. (1996) señalan que en los peces que presentan alta tasa de cópulas, entre los que se encuentra la especie en estudio, sólo una pequeña proporción de las cópulas tienen éxito en la transferencia de esperma.

Las alteraciones comportamentales registradas tras la exposición a EE<sub>2</sub> coinciden con la bibliografía. Bell et al. (2001) demostraron que los machos de *Gasterosteus aculeatus* expuestos a concentraciones de 10 a 50 ng EE<sub>2</sub>/L durante un periodo de 8 a 32 días disminuyeron el comportamiento de cortejo y mostraron un menor interés por las hembras. Por otra parte, Larsen et al. (2008) indicaron que machos de *D. rerio* expuestos a concentraciones de 0.05 a 5 ng EE<sub>2</sub>/L durante 4 meses visitaron con menor frecuencia el área de desove y disminuyeron su comportamiento agresivo ante otros machos. Un estudio llevado a cabo por Kristensen et al. (2005) demostró que la exposición a EE<sub>2</sub>, desde el nacimiento hasta la madurez de machos de *P. reticulata*, provocó una disminución en la duración y frecuencia de determinados comportamientos sexuales y casi la total supresión de la reproducción cuando los peces tuvieron que competir con machos no expuestos para conseguir pareja.

Con respecto a los parámetros espermáticos, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides entre los diferentes grupos. Diversas investigaciones han evaluado los efectos del EE<sub>2</sub> sobre estas variables arrojando resultados contradictorios y, en general, corresponden a peces con fertilización externa. En coincidencia con nuestro estudio, Schultz et al. (2003) no registraron diferencias significativas en la velocidad de los espermatozoides de *O. mykiss* expuestos a diferentes concentraciones de EE<sub>2</sub> (10, 100 y 1000 ng /L) durante 28 días. En contraposición, Hashimoto et al. (2009) demostraron un incremento en las velocidades de los espermatozoides de *O. latipes* expuestos durante 3 semanas en concentraciones que van desde los 60 a 480 ng EE<sub>2</sub> /L. Por otra parte, diversos autores señalan una disminución de la motilidad en *Betta splendens* expuestos durante 4 semanas a 100 ng EE<sub>2</sub>/L (Montgomery et al. 2012), en estudios crónicos realizados desde el nacimiento en individuos de *Danio rerio* expuestos a 2 y 10 ng /L durante 180 d luego de la eclosión (Xu et al. 2008) y en ejemplares de *P. reticulata* expuestos desde el nacimiento hasta la edad adulta (108 días) a 112

ng/L (Kristensen et al. 2005). Estos resultados ponen de manifiesto que los efectos del EE<sub>2</sub> sobre la velocidad de natación de los espermatozoides serían dependientes de la especie en estudio y del tiempo de exposición.

El EE<sub>2</sub> afectó la viabilidad de los espermatozoides, registrándose una disminución significativa en el número de espermatozoides móviles, con un consecuente incremento en el porcentaje de espermatozoides inmóviles y muertos en la concentración más alta. Esta reducción implica que un menor porcentaje de espermatozoides se desplace hacia el oocito, lo que conduciría a que el éxito de la fertilización se reduzca. En cuanto al recuento de espermatozoides, es importante destacar el efecto que la actividad sexual tuvo en este parámetro. Machos pertenecientes al grupo control, a los cuales se les registró el comportamiento sexual, presentaron un menor número de espermatozoides que aquellos no expuestos ante las hembras, lo que se relaciona directamente con el mayor número de cópulas que estos individuos presentaron en relación a los expuestos a EE<sub>2</sub>. En los individuos a los cuales no se les registró actividad sexual, la exposición a EE<sub>2</sub> no produjo una reducción en el recuento del esperma. Sin embargo estudios llevados a cabo en *P. reticulata* a tiempos mayores de exposición (3 meses) revelaron una disminución en el recuento de espermatozoides en concentraciones de 200 ng EE<sub>2</sub>/L (Nielsen & Baatrup 2006).

En relación a los índices somáticos, no se registraron efectos de esta hormona sintética sobre el índice K, en concordancia con los resultados registrados para *D. rerio* expuestos durante 14 días a concentraciones de EE<sub>2</sub> similares a las utilizadas en nuestro estudio (Versonnen & Janssen 2004) y en *Z. viviparus* expuestos a 5 ng/L durante 21 días (Velasco- Santamaría et al. 2010). Con respecto al IHS tampoco se observó variación entre grupos controles y tratados coincidiendo con lo registrado por Versonnen & Janssen (2004) y Saaristo et al (2009), aunque otros autores han descrito un incremento en el valor de este índice en exposiciones más prolongadas a este compuesto (Van den Belt et al. 2002, Zha et al. 2007).

En cuanto al IGS en este estudio se registró una disminución significativa en individuos expuestos a las concentraciones más altas de EE<sub>2</sub> (75 y 150 ng/L), no así en la concentración más baja. Este resultado coincide con los observado por otros autores en *Oncorhynchus mykiss* (Schultz et al 2003); *Carassius auratus* (Martyniuk et al. 2006) y *P. reticulata* (Kristensen et al. 2005) a concentraciones similares. Por otra parte, Velasco-Santamaría et al. (2010), evidenciaron cambios incluso en concentraciones de hasta 2 ng/L. En todos los casos estos autores adjudican esta disminución a las alteraciones histológicas registradas tras la exposición a este compuesto.

A nivel histológico, se registró una disminución significativa en el porcentaje de estadios maduros a 10 ng EE<sub>2</sub>/L. Desconocemos porque esta disminución sólo fue registrada a la concentración mencionada. En las concentraciones mayores, nuestros resultados coinciden con diversos autores quienes señalan que la exposición a esta hormona sintética provoca inhibición de la espermatogénesis, con un consecuente aumento de los estadios espermatogénicos tempranos (Weber et al. 2003, Pawlowsky et al. 2004, Lin & Janz 2006). Martyniuk et al. (2006) señalaron que la exposición a EE<sub>2</sub> reduce significativamente los niveles circulantes de la hormona E<sub>2</sub>, siendo esta hormona clave en los proceso de espermatogénesis.

Las alteraciones histológicas más significativas (y presentes en todas las concentraciones ensayadas) fueron la presencia de células germinales apoptóticas (en Sg y Sc), la formación de acúmulos celulares y la aparición de sincitios celulares. Nuestros resultados concuerdan con el obtenido por Miller et al. (2012) quienes registraron apoptosis de espermatozonias y una disminución de estadios primordiales en individuos de *O. latipes* expuestos a 1 y 10 ng EE<sub>2</sub>/L durante 14 días, siendo esta respuesta dependiente de la concentración. Otra alteración registrada con alta frecuencia en todas las concentraciones de EE<sub>2</sub> fue la pérdida en la estructura de los cistos, que concuerda con lo registrado en el ensayo de exposición de E<sub>2</sub> y con lo hallado por otros autores luego de la exposición a estrógenos ambientales (Christiansen et al. 1998, Vazquez et al. 2009, Islinger 2003).

Las alteraciones ultraestructurales observadas corroboran lo observado al microscopio óptico. Se evidenció una exacerbación de los daños de manera dependiente de la concentración. Se observaron numerosas células de Sertoli con una gran cantidad de retículo endoplásmico, lo que evidenciaría una marcada actividad secretoria y la presencia de material amorfo dentro de los cistos que podría provenir de la desnaturalización de proteínas o bien ser una secreción de las propias células de Sertoli. La presencia de una marcada actividad fagocítica por parte de las células de Sertoli (principalmente de cistos enteros) y de numerosos cistos apoptóticos, reflejarían alteraciones en el proceso espermatogénico. Estas alteraciones concuerdan con las registradas por Islinger et al (2003) en machos de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a EE<sub>2</sub> durante 21 días. Estos autores observaron desorganización de cistos, hipertrofia de células de Sertoli y fagocitosis de cistos enteros conteniendo espermatozoides, y si bien no explican cual sería la causa de las alteraciones observadas, remarcan el claro efecto de este compuesto sobre las gónadas.

El análisis discriminante corroboró lo observado en los análisis de varianza, siendo las concentraciones más altas ensayadas las que se diferenciaron del grupo control y de 10 ng EE<sub>2</sub>/L.

Dichas diferencias, se deben a que los parámetros comportamentales fueron los biomarcadores más sensibles ante la exposición a este compuesto, ya que en muchos casos, aun en baja dosis, respondieron de manera diferencial.

## 3.6. Sección C

### 4*n*- Nonilfenol (4*n*-NP)

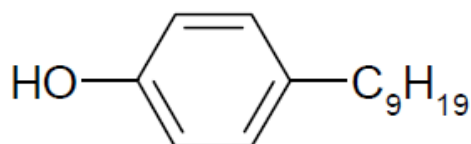
#### 3.6.C.1. INTRODUCCIÓN

Los Alquilfenoles (AP) son utilizados como materia prima para la producción de surfactantes tales como los alquilfenoles fosfitos o alquilfenoles etoxilados, agentes activos superficiales no iónicos de uso industrial. Como muchos otros PEs, los componentes alquilfenólicos son fuertemente lipofílicos por lo que pueden acumularse en los organismos con el riesgo ambiental que ello significa (Ahel et al. 1993). En particular se ha estimado que el 60% de los AP tienen como destino final los ambientes acuáticos (Naylor, 1992), ingresando principalmente a través de las plantas de efluentes cloacales.

La degradación microbiana de estos compuestos durante los tratamientos de efluentes cloacales produce alquilfenoles polietoxilatos (APEOs), entre ellos el 4*n*-nonilfenol (4*n*-NP) (Giger et al. 1984, informe EPA) (Fig. 3.15). Este compuesto es utilizado en la producción de agentes activos superficiales, estabilizadores de etil-celulosa, fenil-resinas solubles en aceites, ésteres, así como también en la producción de detergentes, barnices aceitosos, caucho, aceleradores de vulcanización, antioxidantes e inhibidores de corrosión para productos de petróleo, entre otros (Vazquez-Duhalt et al. 2005, Soares et al. 2008). En agua, puede encontrarse en forma disuelta o absorbido en la materia en suspensión. La bibliografía señala que de la totalidad de 4*n*-NP liberado en los ambientes acuáticos, entre un 58 a un 73% se distribuye en agua, 27 a 41% queda en el sedimento y sólo un 1% en el suelo ribereño y aire (EPA, 2002).

En cursos de agua de distintas partes del mundo se han detectado concentraciones de 4*n*-NP que van desde los 0.11 a los 185 µg/L (Tanghe & Verstraete 2001, Petrovic et al. 2002, Loos et al. 2007, Shue et al 2009) alcanzando valores de 644 µg/L en sitios cercanos a PTE (Solé et al 2000). Sin embargo, en nuestro país, se han mencionado valores de 35 µg/L en efluentes de una PTE ubicada en los alrededores de la capital de la provincia de Buenos Aires,

y 27  $\mu\text{g/L}$  en el arroyo Morón, que recibe la descarga de dichos efluentes (Babay et al. 2008). En la cuenca del Río Suquía se ha detectado la presencia de este compuesto, aunque hasta el momento no ha sido cuantificado (Bonansea et al. 2010).



**Fig. 3.15.** Forma estructural del 4(o *p*)-nonilfenol.

El 4*n*-NP ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ) es considerado uno de los metabolitos más perjudiciales para la biota debido a su alta toxicidad, difícil biodegradación y capacidad de bioacumularse en los organismos acuáticos (EPA 2002). En los seres humanos, este compuesto ingresa principalmente al organismo a través de la ingesta de alimentos, especialmente a partir de dietas ricas en pescado, y de agua. El contacto de los alimentos con plásticos de embalaje también son una importante fuente de contaminación (Guenther et al. 2002).

Si bien la exposición a este compuesto puede tener efectos letales directos, las consecuencias ambientales más extendidas de la exposición al 4*n*-NP están relacionadas con la actividad estrogénica que posee (Ahel et al. 1993, Tsuda et al. 2001, Cardinali et al. 2004, Soares et al. 2008). El 4*n*-NP compite con el estrógeno por la unión a su receptor (Danzo 1997, Flouriot et al. 1995), afectando de esta manera la reproducción y desarrollo de los organismos (Christiansen et al. 1998, Colborn et al. 1993). Sin embargo, este compuesto exhibe una potencia estrogénica débil en comparación con el  $\text{E}_2$  o  $\text{EE}_2$ , (Legler et al. 2002) ejerciendo efectos negativos en el rango de  $\mu\text{g/L}$  (Jobling & Sumpter 1993, Ackermann et al. 2002).

El objetivo principal de esta sección fue evaluar los efectos que concentraciones ambientalmente relevantes del 4*n*-NP producen en machos de *J. multidentata* a través del uso de biomarcadores a diferente nivel biológico (índices somáticos, comportamiento reproductivo, variables espermáticas, histología y ultraestructura de gónadas).



### *3.6.C.2. Condiciones de Exposición y determinación de 4n-NP en agua*

Los peces fueron recolectados durante los meses de enero y febrero de 2012. Los valores promedio de la longitud estándar y el peso de los individuos utilizados para este ensayo fueron:  $27.09 \pm 2.54$  mm y  $0.48 \pm 0.10$  g, respectivamente. Las concentraciones nominales utilizadas de 4n-NP (99.9% de pureza; marca Sigma- Aldrich) fueron: 1 y 10  $\mu\text{g/L}$ . El agua de las peceras fue renovada de manera completa cada 48 horas.

Se determinaron las concentraciones de 4n-NP en el agua de las peceras mediante microextracción en fase sólida acoplada a Cromatografía gaseosa en tándem con espectrometría de masas (SPME-GC-MS). Se utilizó una fibra compuesta de Divinilbenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) en contacto con distintas diluciones de 4n-NP por 40 minutos a  $60^\circ\text{C}$  y agitación (250 rpm) usando un muestreador automático (Varian Combi Pal). El 4n-NP absorbido en la fibra fue luego desorbido en el inyector del GC durante 3 min a  $280^\circ\text{C}$ ; 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 4n-NP (Bonansea et al. 2010). Se recolectaron muestras de agua de las peceras para cuantificar la concentración del 4n-NP antes y después del reemplazo de la misma.

### **3.6.C.3. RESULTADOS**

#### *3.6.C.3.1 Contenido de 4n-NP en agua*

A tiempo 0 h, los niveles de de 4n-NP registrados para cada concentración fueron:  $0.8 \pm 0.2$   $\mu\text{g}$  para la concentración más baja de 4n-NP y  $9.0 \pm 2.0$   $\mu\text{g}$  para la concentración más alta de este compuesto. Se obtuvieron niveles residuales del 85% y 72% de la concentración nominal a las 24 y 48 horas respectivamente.

#### *3.6.C.3.2. Mortalidad e Índices somáticos*

Durante los 28 días de exposición murió un pez del grupo control y dos individuos expuestos a la concentración más alta de 4n-NP, por lo que los decesos no son adjudicados a la presencia del tóxico. Los valores registrados para el índice K no mostraron diferencias

significativas entre los tratamientos (Tabla 3.9). En cuanto al IHS, sólo se registró un incremento significativo a la concentración más baja ensayada, mientras que el IGS disminuyó significativamente en los individuos expuestos a ambas concentraciones de 4*n*-NP con respecto al grupo control.

**Tabla 3.9.** Índices somáticos evaluados en machos adultos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 1 y 10  $\mu\text{g}$  4*n*-NP /L. Referencias: **K**: Factor de condición; **IHS**: Índice hepatosomático; **IGS**: Índice gonadosomático. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar

	0 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP/L	1 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP/L	10 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP /L	H	<i>p</i>
<b>K</b>	2.14 $\pm$ 0.05	2.34 $\pm$ 0.14	2.09 $\pm$ 0.04	2.64	0.071
<b>IHS</b>	1.52 $\pm$ 0.30 <b>a</b>	2.04 $\pm$ 0.17 <b>b</b>	1.59 $\pm$ 0.24 <b>a</b>	2.15	0.045
<b>IGS</b>	2.79 $\pm$ 0.90 <b>a</b>	1.26 $\pm$ 0.28 <b>b</b>	1.22 $\pm$ 0.29 <b>b</b>	3.62	0.039

### 3.6.C.3.3. *Comportamiento Reproductivo*

Si bien no se registraron diferencias significativas en el porcentaje de individuos que inició un comportamiento sexual ante una hembra (100% para machos controles y 90% para los expuestos ( $z = -1.05$ ;  $p = 0.29$ ), es de destacar que la mayoría de las variables comportamentales registradas en los individuos tratados con 4*n*-NP disminuyeron significativamente con respecto al grupo control (tabla 3.10).

Las variables número de intentos de cópula, cópulas, eficiencia de persecuciones (C/NP) y eficiencia de intentos de cópula (C/IC) disminuyeron alrededor del 50% en los individuos expuestos en comparación con los controles. Cabe destacar que se evidenció además una tendencia hacia la disminución en el número de cópulas sostenidas de manera dependiente de la concentración, siendo para el grupo control de  $3.83 \pm 1.56$  cópulas; para la concentración más baja de  $2.40 \pm 1.14$  y para 10  $\mu\text{g}$  4*n*-NP/L de  $1.00 \pm 1.26$  ( $F = 3.66$ ,  $p = 0.0526$ ).

**Tabla 3.10.** Variables comportamentales registradas en machos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 1 y 10  $\mu\text{g}$  4*n*-NP /L. Referencias: **TP**: tiempo de persecución, **P**: número de persecuciones, **IC**: intentos de cópula, **C**: cópulas. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos parámetros ( $p < 0.05$ ).

Variable	0 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP/L	1 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP /L	10 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP/L	F	<i>p</i>
<b>TP</b>	52.50 $\pm$ 13.74 <b>a</b>	34.83 $\pm$ 11.46 <b>b</b>	40.00 $\pm$ 7.74 <b>a</b>	4.05	<b>0.0454</b>
<b>NP</b>	35.89 $\pm$ 10.18	29.20 $\pm$ 21.47	27.27 $\pm$ 24.29	2.02	0.0561
<b>IC</b>	60.00 $\pm$ 5.60 <b>a</b>	45.40 $\pm$ 5.60 <b>b</b>	32.50 $\pm$ 7.47 <b>b</b>	4.89	<b>0.0437</b>
<b>C</b>	18.75 $\pm$ 5.42 <b>a</b>	6.00 $\pm$ 1.31 <b>b</b>	3.40 $\pm$ 2.52 <b>b</b>	6.46	<b>0.0395</b>
<b>NP/TP</b>	0.45 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.03	2.77	0.1026
<b>IC/TP</b>	0.51 $\pm$ 0.13	0.65 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.08	1.24	0.3233
<b>C/TP</b>	0.16 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	0.46 $\pm$ 0.18 <b>b</b>	0.13 $\pm$ 0.03 <b>a</b>	4.56	<b>0.0337</b>
<b>IC/NP</b>	1.85 $\pm$ 0.21 <b>a</b>	1.27 $\pm$ 0.28 <b>b</b>	1.08 $\pm$ 0.22 <b>b</b>	4.33	<b>0.0395</b>
<b>C/NP</b>	0.40 $\pm$ 0.27 <b>a</b>	0.15 $\pm$ 0.36 <b>b</b>	0.12 $\pm$ 0.20 <b>b</b>	3.86	<b>0.0493</b>
<b>C/IC</b>	0.24 $\pm$ 0.08 <b>a</b>	0.10 $\pm$ 0.68 <b>b</b>	0.07 $\pm$ 0.08 <b>b</b>	5.37	<b>0.0482</b>

+++

#### 3.6.C.3.4. *Parámetros espermáticos*

Debido a que no se registró interacción entre el comportamiento reproductivo y las variables espermáticas ( $F = 4.38$ ;  $p = 0.65$ ) los datos fueron analizados de manera conjunta (tabla 3.11). La motilidad varió de acuerdo a los tratamientos, observándose un incremento significativo en los valores de VL y VCL en ambas concentraciones en comparación a los individuos control. En cuanto a la viabilidad, si bien no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos móviles ( $F = 3.42$ ,  $p = 0.5347$ ) y vivos inmóviles ( $F = 0.98$ ,  $p = 0.6943$ ), si se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides muertos en los individuos expuestos a ambas concentraciones de 4*n*-NP ( $F = 0.82$ ,  $p = 0.0461$ ). Finalmente para la concentración más elevada se registró una disminución significativa en el número de espermatozoides por microlitro de muestra.

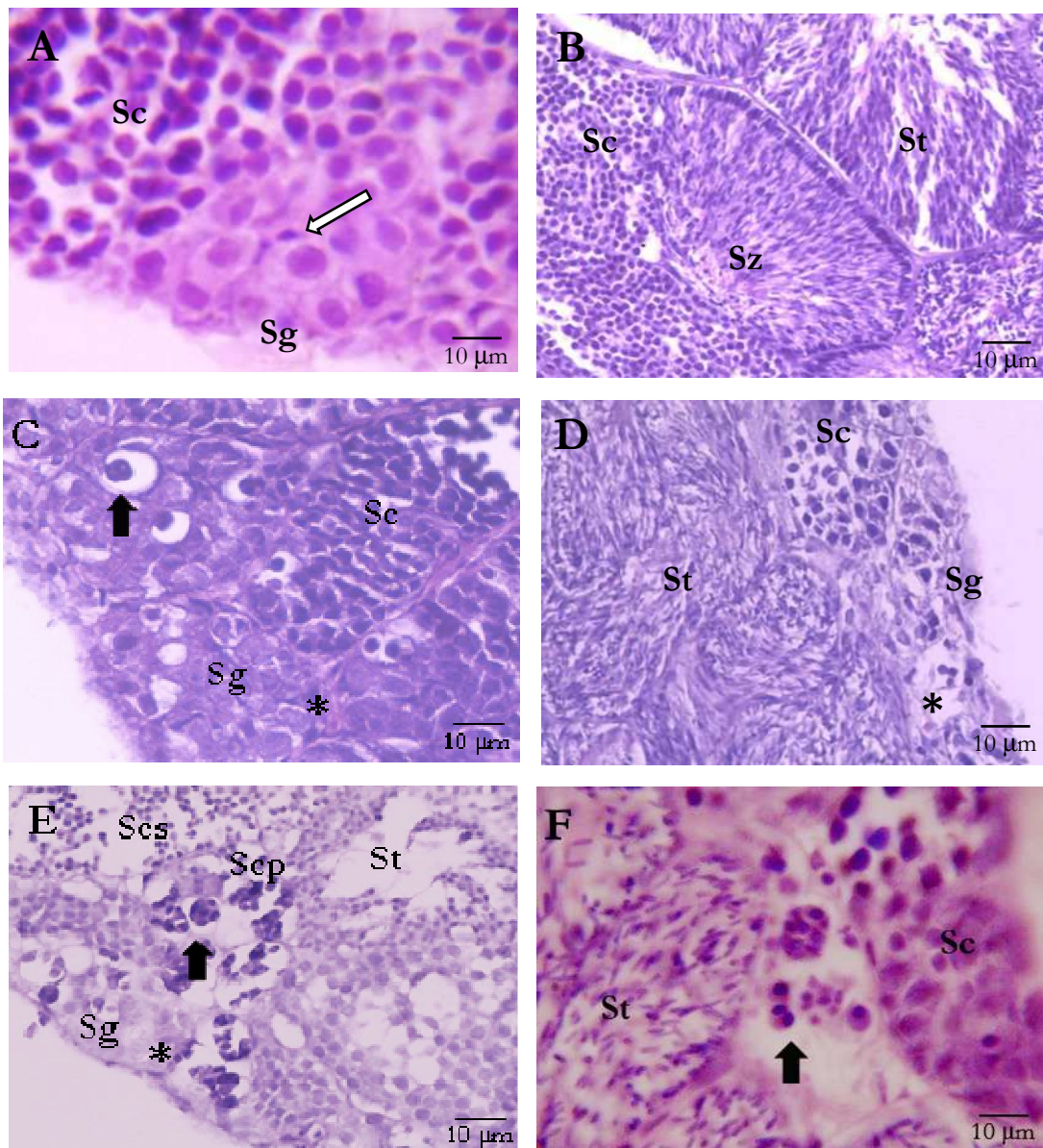
**Tabla 3.11.** Parámetros espermáticos registrados en machos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 1 y 10  $\mu\text{g}$  4*n*-NP /L. Referencias: **VL:** Velocidad lineal ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **VCL:** Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); **LIN:** linealidad; Recuento espermático (cel/ $\mu\text{l}$ ); VM= porcentaje de células móviles; VI= porcentaje de células inmóviles y M=porcentaje de espermatozoides muertos. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar.

Parámetros	Control	1 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP /L	10 $\mu\text{g}$ 4 <i>n</i> -NP /L <sub>2</sub>	F	<i>p</i>
<b>VL</b>	100.25 $\pm$ 0.47 <b>a</b>	102.83 $\pm$ 0.22 <b>b</b>	102.65 $\pm$ 0.43 <b>b</b>	12.61	<b>&lt;0.0001</b>
<b>VCL</b>	102.92 $\pm$ 0.50 <b>a</b>	105.76 $\pm$ 0.24 <b>b</b>	105.61 $\pm$ 0.46 <b>b</b>	13.23	<b>&lt;0.0001</b>
<b>LIN</b>	99.70 $\pm$ 0.50	98.40 $\pm$ 0.40	98.20 $\pm$ 0.50	4.51	0.0571
<b>VM</b>	71.24 $\pm$ 2.39	62.37 $\pm$ 8.37	69.37 $\pm$ 6.42	2.50	0.1058
<b>VI</b>	22.03 $\pm$ 2.06	22.30 $\pm$ 5.68	18.21 $\pm$ 9.82	1.14	0.3400
<b>M</b>	6.52 $\pm$ 3.22 <b>a</b>	15.06 $\pm$ 4.10 <b>b</b>	12.46 $\pm$ 0.82 <b>b</b>	5.62	<b>0.0256</b>
<b>Recuento</b>	1443 $\pm$ 180 <b>a</b>	1404 $\pm$ 153 <b>a</b>	959 $\pm$ 272 <b>b</b>	11.02	<b>0.0116</b>

### 3.6.C.3.5 Análisis histológico del testículo

Los testículos en el grupo control presentaron cistos con una estructura bien definida y un 85% de estadios maduros (St y Sz). (Fig 3.16 A-B). Si bien los ejemplares expuestos a 4*n*-NP presentaron el mismo porcentaje de estadios maduros, en ambas concentraciones se registraron alteraciones histológicas tales como pérdida de estructura de los cistos, con límites poco definidos y una falta de conexión entre las células dentro del cisto.

En los peces expuestos a la concentración más baja de 4*n*-NP (1  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) se observaron numerosas Sg alteradas, con diferentes grados de vacuolización citoplasmática, y presencia de cistos inmaduros (conteniendo Sc) con numerosas células apoptóticas (Fig 3.16 C-D). A la concentración más elevada (10  $\mu\text{g}$  de 4*n*-NP/L) tanto las Sg como los Sc presentaron características anormales. La pérdida de estructura de los cistos se vio acompañada de una marcada desincronización en el proceso de espermatogénesis dentro de ellos, observándose células en distintos estadios espermatogénicos y presencia de numerosas células apoptóticas (Fig. 3.16 E-F).

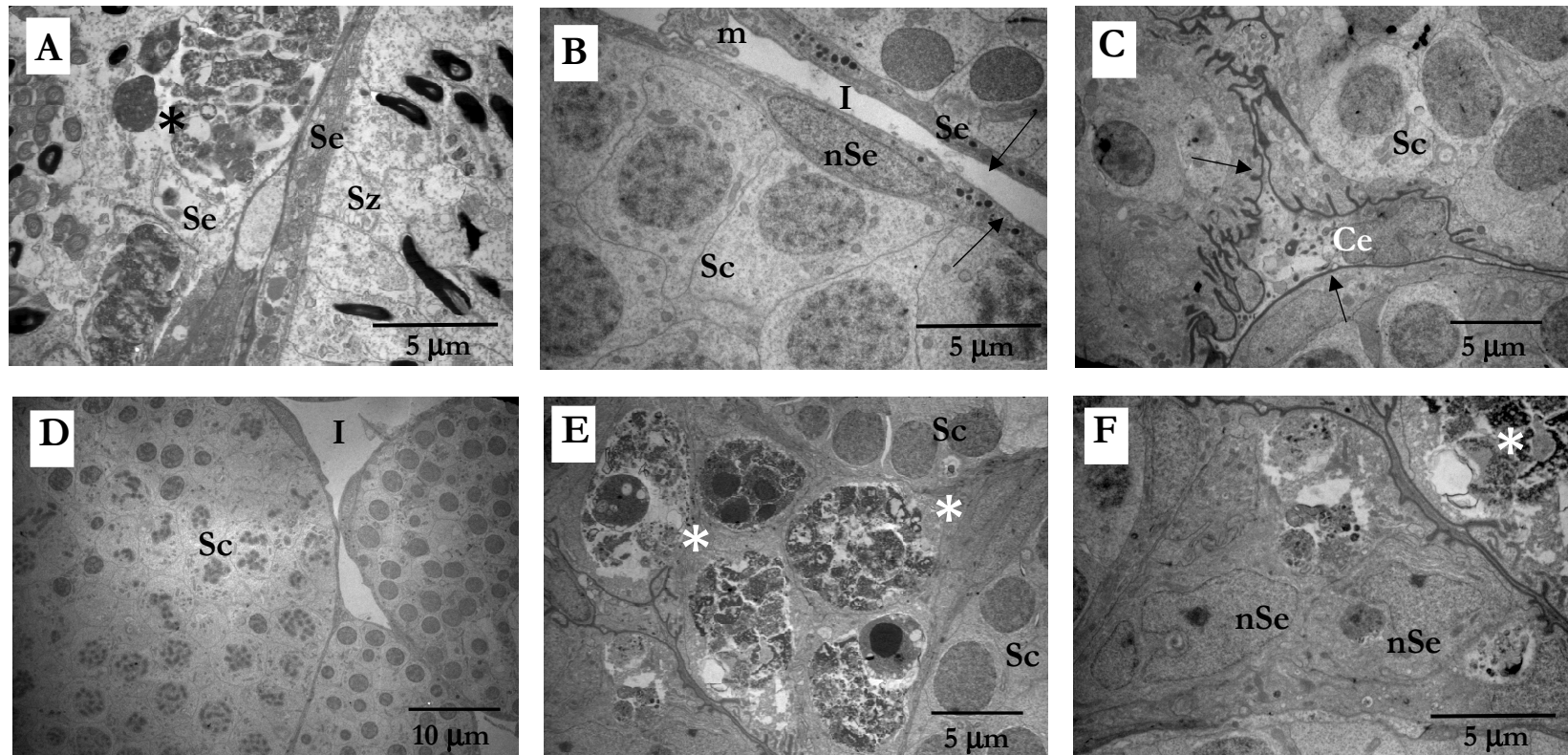


**Figura 3.16.** Cortes histológicos de testículo de ejemplares adultos de *J. multidentata* pertenecientes al **(A-B)** grupo control donde puede observarse cistos en diferentes estadios espermatogénicos con una estructura normal; **(C-D)** 1 µg 4n-NP/L **(E-F)** 10 µg 4n-NP/L. Todas las fotografías fueron tomadas a 400x. *Referencias:* Sc: espermatoцитos; Sps: espermatoцитos primarios; Scs: espermatoцитos secundarios; Sg: espermatoгонias; St: espermátidas; Sz: espermatozoides, Asteriscos: pérdida de estructura de cistos y/o vacuolización; Flechas negras: células apoptóticas; Flechas blancas: células de Sertoli.

*3.6.C.3.6 Análisis ultraestructural del testículo*

En los individuos controles la ultraestructura testicular responde a la descrita en el Cap. 2. No se registraron alteraciones celulares. Los individuos expuestos a 4*n*-NP manifestaron diversas alteraciones en la ultraestructura del testículo. En la concentración más baja (1 µg 4*n*-NP /L) se observó una marcada desorganización de la estructura del testículo, donde numerosos cistos se evidenciaron amorfos. Se registraron además, numerosas células de Sertoli necróticas (ya que presentaban pérdida de nucléolo, tumefacción de mitocondrias y ribosomas, y ruptura de membranas) y en muchos casos ausencia de las mismas. Además, fue notable la presencia de células intersticiales alteradas. En su reemplazo, se observaron numerosos fibroblastos y abundantes células inflamatorias relacionadas con los procesos necróticos. Por otro lado, se evidenciaron numerosos eventos de apoptosis en cistos primordiales (Fig. 3.17 A-C).

En la concentración más elevada (10 µg 4*n*-NP/L) se observaron numerosos cistos inmaduros con células apoptóticas. Se evidencia una pérdida de conexión entre las Sg y entre éstas con la pared del cisto. En las áreas analizadas se registró edema y ausencia total de las células intersticiales, reemplazándose a veces por fibroblastos. Se observaron además, numerosos cistos en el estadio Sc con tres células (que reflejaría problemas en la división meiótica y/mitótica) y la presencia de numerosos macrófagos en el intersticio (Fig. 3.17 D-F).



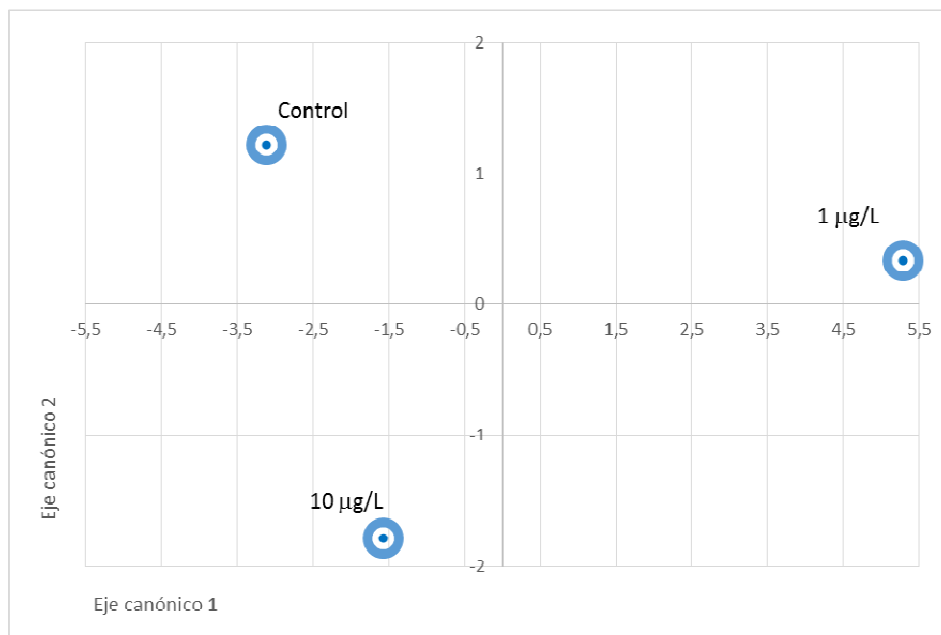
**Fig 3.17** Microfotografías del testículo de *J. multidentata* expuestos a 4n-NP/L (**A-C**) 1 µg 4n-NP/L y (**D-F**) 10 µg 4n-NP/L. (**A**) Cistos con células apoptóticas (4600 x); (**B**) ausencia de células intersticiales y presencia de macrófago (4600X); (**C**) Cistos con espermatocitos donde puede evidenciarse la alteración del espacio intersticial, donde la célula estromal está por desaparecer (3600x); (**D**) cistos conteniendo espermatocitos donde se observa ausencia de tejido intersticial (1200 x); (**E**) Cistos apoptóticos (3600X) y (**F**) células de Sertoli rodeando cistos apoptóticos (4600x)

3.6.C.3.7. *Análisis Discriminante*

El Análisis Discriminante arrojó un 100 % de asignación correcta. En el procedimiento de validación cruzada, el 100% de los individuos fueron asignados correctamente en su respectivo tratamiento (tabla 3.12). Se establecieron dos ejes canónicos que explicaron: el primero de ellos el 89.22% de la variabilidad total, mientras que el segundo el porcentaje restante. Las variables que mejor explicaron las diferencias entre grupos fueron para el 1° eje canónico C/NP, mientras que para el 2° eje canónico fueron el número de cópulas. En la fig. 3.18 puede observarse como las dos concentraciones de 4*n*-NP se diferencian del grupo control.

**Tabla 3.12.** Matriz de clasificación cruzada de la variación la respuesta de biomarcadores de acuerdo a las distintas concentraciones de 4*n*-NP ensayadas.

Grupo	0 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	Total	% de asignación correcta
0 $\mu\text{g/L}$	10	0	0	10	100
1 $\mu\text{g/L}$	0	10	0	10	100
10 $\mu\text{g/L}$	0	0	10	10	100
Porcentaje de asignación correcta					100



**Fig. 3.18.** Representación de distribución de centroides de los 3 tratamientos definidos a priori, en el espacio discriminante conformado por los ejes canónicos 1 y 2 .



### 3.6.C.4. DISCUSIÓN

El xenoestrógeno 4*n*-NP ejerció un marcado efecto negativo sobre diversos parámetros reproductivos de *J. multidentata*. En cuanto al comportamiento reproductivo se registró que la exposición a este alquilfenol provocó una disminución significativa en las variables relacionadas con la cópula. Si bien los machos expuestos a 4*n*-NP invertirían el mismo esfuerzo que los individuos normales en perseguir a las hembras (ya que el número de persecuciones es similar para todos los tratamientos), serían menos eficientes a la hora de copular. Esta alteración afecta directamente el éxito reproductivo, ya que se sabe que los machos deben copular activamente con las hembras, dado su comportamiento coercivo y promiscuo (Bisazza et al. 2000).

Una disminución o ausencia total de comportamiento sexual han sido registradas para otros alquilfenoles (Bayley et al. 1999, Gray et al. 1999), y para el 4*n*-NP en concentraciones más elevadas o ensayos de mayor tiempo de duración a este estudio. Schoenfuss et al. (2008) reportaron en la especie de fecundación externa *P. promelas* que la exposición a concentraciones de 4*n*-NP que van desde los 6 a 60 µg/L inhibieron diversas variables comportamentales. Por otro lado, estudios crónicos desde el nacimiento hasta 90 días, llevados a cabo en *P. reticulata* expuestos a 100 µg 4*n*-NP/L no manifestaron interés hacia las hembras ni desarrollaron un correcto comportamiento sexual (Cardinali et al. 2004).

Un estudio llevado a cabo por Guyón (2013), reflejó que la exposición de *J. multidentata* a las mismas concentraciones de 4*n*-NP indujo fuertemente la expresión de *cyp19a1b* en todas las concentraciones. Es probable que esta expresión aumentada esté relacionada con la inhibición del comportamiento reproductivo observada en este estudio. 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 estas hormonas y a un aumento en los niveles de estrógeno resultando así en la pérdida de rasgos masculinos (Meucci & Arukwe 2006). Por otra parte, Arukwe & Goksøyr (1998) han demostrado en peces una inhibición en la síntesis de esteroides debida a la exposición a 4*n*-NP, lo que claramente afecta el comportamiento reproductivo en peces.

De la misma manera, la exposición al 4*n*-NP produjo un claro efecto sobre todos los parámetros espermáticos analizados. En cuanto a los parámetros dinámicos, un leve incremento en los valores de VSL y VCL fue evidenciado en los espermatozoides de individuos expuestos a 4*n*-NP con respecto al grupo control. Estos resultados se contradicen con lo registrado por Kawana et al. (2003) donde, *O. latipes* expuestos a 20 and 100 µg 4*n*-

NP/L luego de 4 semanas, no mostraron diferencias en la velocidad luego de la exposición a 4*n*-NP, mientras que Hara et al. (2007) observaron *in vitro* una disminución significativa en la velocidad de espermatozoides de *O. latipes* expuesto a 100  $\mu\text{mol/L}$  durante 60 segundos.

Por otro lado, en el presente trabajo se evidenció un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos con respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con Hara et al. (2007), quienes adjudicaron este resultado a efectos no genómicos del 4*n*-NP, dada la rápida respuesta observada de los parámetros espermáticos en estudios *in vitro*, pudiendo ejercer este compuesto efectos tóxicos sobre las células. Sin embargo, otros autores mostraron que la exposición de *O. mykiss* a concentraciones menores de 0.75  $\mu\text{g/L}$  durante 60 días luego del nacimiento no afectaron la viabilidad de espermatozoides (Franz et al. 2005).

Finalmente, se registró una disminución significativa en el número de espermatozoides a la concentración más elevada de 4*n*-NP. Resultados similares fueron registrados tras la exposición al alquilfenol Bisfenol A (130  $\mu\text{g/L}$ ) en individuos de *O. mykiss* en tiempos de exposición similares al presente estudio (Lahnsteiner et al. 2005). Estos autores adjudicaron esta disminución a una inhibición en el proceso de espermiogénesis. Si bien en nuestro estudio, no se registraron diferencias a nivel histológico en relación a la proporción de cistos entre individuos controles y expuestos, se sugiere que la disminución del número de espermatozoides registrada, podría deberse a alguna alteración durante el proceso de espermatogénesis, dadas las diversas alteraciones histológicas registradas en testículos de individuos expuestos.

En ambas concentraciones se evidenció formación de sincitios de células germinales, degeneración celular, y necrosis de los diferentes estadios celulares, lo cual concuerda con el análisis ultraestructural del testículo y con lo registrado en diversas especies tales como *Z. viviparus* (Christiansen et al. 1998), *P. promelas* (Miles-Richardson et al., 1999) y *Xiphophorus helleri* (Kwak et al. 2001). La formación de acúmulos celulares en los estadios de Sc fue una alteración registrada con bastante frecuencia, que ha sido evidenciada por numerosos autores (Christiansen et al. 1998, Gimeno et al. 1998, Miles-Richardson et al. 1999, Kwak et al. 2001, Weber et al. 2002). A la concentración más alta de 4*n*-NP, se observaron cistos dilatados e incluso pérdida de la estructura de los mismos. Esta última alteración también ha sido observada en *Z. viviparus* y *Cichlasoma dimerus* luego de la exposición a este alquilfenol (Christiansen et al. 1998, Vázquez et al. 2009). Es de destacar que en el presente ensayo, si bien en general, las alteraciones registradas en ambas concentraciones no difirieron entre sí, la frecuencia y extensión de las lesiones en individuos expuestos a 10  $\mu\text{g/L}$  fue mayor. Estos resultados coincide con el de Miles-Richardson et al. (1999) y Kinnberg et al. (2000), en donde

los daños ocasionados por la exposición al 4*n*-NP en la histología del testículo de *Pimephales promelas* y *Xiphophorus maculatus* respectivamente, aumentaban de modo dependiente de la concentración.

El análisis ultraestructural del testículo evidenció una marcada presencia de células intersticiales alteradas con la consiguiente formación de edema. En los individuos control, en estadios maduros se observa con frecuencia la hipertrofia de las células de Sertoli, ya que éstas células fagocitan activamente los residuos celulares luego de la diferenciación St-Sz, característica que no fue registrada en individuos expuestos donde incluso se evidenció numerosas células de Sertoli necróticas o ausencia de ellas. Estas mismas alteraciones fueron registradas por El-Sayed Ali et al. (2014) quienes expusieron a *Oreochromis niloticus* a concentraciones elevadas de 4*n*-NP (60-100 µg/L). Se conoce el papel clave de estas células en la fagocitosis de cuerpos residuales en el proceso de diferenciación espermatide-espermatozoide, lo cual esta alteración podría estar reflejando una ausencia de esta función. En su reemplazo los fibroblastos pareciera que cumplen el papel de fagocitosis, ya que fueron observados con cuerpos residuales en su interior. El registro de numerosas células inflamatorias se relacionaría con los numerosos procesos necróticos evidenciados.

Diversos trabajos sugieren un efecto directo del 4*n*-NP sobre las células de Sertoli. Varias funciones han sido atribuidas a estas células, incluyendo la formación de cistos, en el que la espermatogénesis tiene lugar, y la fagocitosis de material de descarte (Grier, 1981). Christiansen et al. (1998) mostraron alteraciones ultraestructurales en las células de Sertoli de individuos de *Z. viviparous* expuestos a 4*n*-NP, y los cambios observados en la estructura de la gónadas fueron atribuidos a estas alteraciones. La presencia de apoptosis registrada en este estudio en los individuos expuestos a 4*n*-NP coincide con lo detallado por Mackenzie et al. (2003) y Weber et al. (2002), quienes encontraron que en individuos de *O. latipes* expuestos crónicamente a 4*n*-NP, el tóxico puede atravesar la barrera testicular e inducir la apoptosis de células germinales, de células de sostén e intersticiales. Es ampliamente conocido que los alquilfenoles pueden inducir apoptosis en una amplia variedad de células, vía receptores estrogénicos (Roy et al. 1997). En ratas la exposición a este alquilfenol provocó apoptosis en células testiculares, especialmente a nivel de las células de Sertoli debido a una inhibición en la bomba de calcio en el retículo endoplásmico (Roscoe et al. 2001).

Para un correcto desarrollo de la espermatogénesis se requiere la comunicación intercelular directa con las células de Sertoli, que está mediada por uniones comunicantes (Roscoe et al. 2001). En este sentido las uniones tipo Gap (GJIC “Gap junctional intercellular communications”, sus siglas en inglés) son unas de ellas y por lo tanto son críticas en el

testículo para la coordinación de la espermatogénesis. En mamíferos las uniones tipo Gap se componen de poros intercelulares que permiten el paso de pequeñas moléculas entre las células adyacentes (de 1 kDa). Estos poros están compuestos por conexinas hexaméricas de cada célula. La conexina 43 (Cx43) está presente en muchos tejidos, incluyendo el testículo, y está localizada entre células de Sertoli adyacentes, entre células de Sertoli y las células germinales y entre células de Leydig. Varios trabajos indican que la Cx43 es esencial para una función testicular normal (Risley et al. 1992, Tan et al. 1996, Batias et al. 1999, Juneja et al. 1999). Un estudio llevado a cabo por Aravindakshan & Cyr (2005) en ratones, evaluó los efectos de la exposición de 4*n*-NP en las GJIC y sus conexinas en células de Sertoli. Para ello expusieron in vitro a células de Sertoli durante 24 h a diferentes concentraciones (1 a 50  $\mu$ M) de 4*n*-NP. La exposición a este compuesto redujo en aproximadamente un 80% las GJIC y provocó la disminución drástica de la comunicación intercelular en todas las dosis ensayadas. Este efecto no estaría mediado por receptores de estrógeno, sino por un incremento en la producción de especies reactivas (ROS), ya que se ha visto que la expresión de Cx32 es sensible al incremento de ROS.

Estos mecanismos podrían explicar la falta de conexión de las células espermatogénicas entre sí y con las células de Sertoli, y las alteraciones en el espacio intersticial observados en nuestro trabajo.

Finalmente con respecto a los índices somáticos la exposición a 4*n*-NP no afectó el valor de K. Si en cambio se registró un incremento significativo en el valor de IHS a la concentración más baja ensayada (1  $\mu$ g 4*n*-NP/L). Los resultados obtenidos por otros autores son contradictorios. Un incremento en este índice fue registrado por Cardinali et al. (2004) quienes expusieron a 100  $\mu$ g/L durante 90 días a recién nacidos de *P. reticulata* mientras que Christiansen et al. (1998) no observaron cambios en dicho índice en machos adultos de *Zoares viviparus*, expuestos durante tres semanas a 33  $\mu$ g/L de 4*n*-NP. Un estudio previo realizado en la misma especie que la utilizada en esta tesis, evidenció que la exposición durante 14 días a 40  $\mu$ g 4*n*-NP/L produjo un incremento en este índice, resultado que se adjudicó a la presencia de un gran contenido graso en este órgano (Roggio et al. 2012). Por otra parte, la exposición al 4*n*-NP provocó una disminución significativa en el valor de IGS en individuos tratados con 4*n*-NP. Estos resultados concuerdan con lo observado por diversos autores, donde la exposición a este compuesto provocó una disminución en la masa de los testículos (Christiansen et al. 1998, Jobling et al. 1996, Kinnberg et al. 2000, Li & Wang 2005). Es de destacar que la exposición a otros alquilfenoles también provocó una disminución en este índice, en diversas especies de peces, a saber: en la Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) expuestos a

diversos alquilfenoles (54,3  $\mu\text{g/L}$ , durante tres semanas) (Jobling et al. 1996); en guppies (*P. reticulata*) expuestos al xenoestrógeno 4-*tert*-octilfenol (Toft & Baatrup 2001), en carpas (*Cyprinus carpio*) expuestas durante tres meses a concentraciones subletales de 4-*tert*-pentilfenol (Gimeno et al. 1998) y esta misma especie expuesta durante un mes a concentraciones subletales de 4-*tert*-butilfenol (Barse et al. 2006). Los resultados obtenidos en *J. multidentata* más los antecedentes mencionados reflejan claramente que este compuesto afecta el proceso de espermatogénesis normal del testículo, que se ve reflejado en las alteraciones registradas a nivel histológico y ultraestructural, principalmente en las células intersticiales.

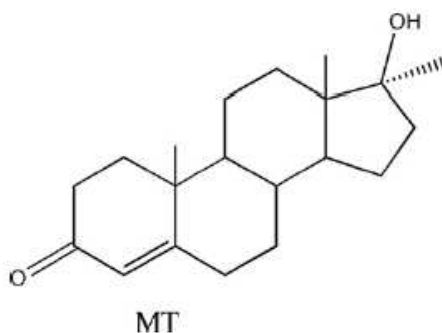
Los resultados arrojados en el análisis discriminante demostraron que la proporción de persecuciones exitosas y el número de cópulas serían los biomarcadores más sensibles ante la exposición a 4*n*-NP, en concordancia con los análisis de varianza. Nuestros resultados sugieren claramente que la exposición a este alquilfenol tiene una influencia negativa sobre la biología reproductiva de machos de *J. multidentata*, ya que todos los biomarcadores analizados fueron alterados tras la exposición a bajas dosis de este compuesto.

## 3.7. Sección D

### 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT)

#### 3.7.D.1. INTRODUCCIÓN

Un amplio número de andrógenos naturales y sintéticos se utilizan como promotores del crecimiento en terapias humanas y veterinarias, y pueden ser liberados en el ambiente acuático a través de los efluentes de las PTE (Chang et al. 2008). La 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) (Fig. 3.19), es un derivado sintético de la testosterona y es ampliamente utilizada en medicina para suplir la deficiencia de testosterona y para tratar síntomas de andropausia en hombres, mientras que en acuicultura su uso radica principalmente para la obtención de poblaciones monosexo de machos (Hunter & Donaldson 1983, Arslan & Phelps 2004, Blázquez et al. 1995, Greisy & Gamal 2012). Sin embargo, en la bibliografía se han citado efectos estrogénicos de esta hormona a concentraciones superiores al 1  $\mu$ g/L y mg/kg de peso corporal (Andersen et al. 2001, Ankley et al. 2001, Parrott & Wood 2002, Orn et al. 2003, Hornung et al. 2004, Pawlowski et al. 2004, Seki et al. 2004, Marjani et al. 2009).



**Figura 3.19.** Forma estructural del esteroide sintético 17 $\alpha$ - metiltestosterona

La combinación de efectos estrogénicos que posee la MT se debe a que esta hormona es aromatizada, a través de la enzima aromatasa, en un potente estrógeno, el 17 $\alpha$ -metilestradiol (ME<sub>2</sub>), con una afinidad por los receptores de estrógenos solo un poco menor que el E<sub>2</sub> (Piferrer & Donaldson 1991, Simpson et al. 1994, Hornung et al. 2004).

Los efectos estrogénicos ante la exposición de andrógenos aromatizables han sido registrados en ciertos trabajos, a saber: efectos sobre el desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas, principalmente a nivel del gonopodio en *Gambusia holbrooki* (Parques et al. 2001), testículos poco desarrollados de machos de la anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Olivereau & Olivereau 1985) y del pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Katsiadaki et al. 2002), disminución de la síntesis de testosterona en la carpita cabezona (*Pimephales promelas*) (Orlando et al. 2004) y cambios en la proporción de sexos, registrándose un mayor número de hembras en *Zoarces viviparus* (Larsson et al. 2000). En un estudio donde se evaluó el efecto de la MT sobre aspectos reproductivos, se demostró que la exposición de *P. promelas* durante 3 semanas a 1  $\mu$ g /L indujo la síntesis de vitelogenina (Pawlowski et al. 2004). El mismo efecto fue observado en *D. rerio* y *P. promelas* a concentraciones elevadas, desde los 10 a 100  $\mu$ g MT/L (Ankley et al. 2001, Zerulla et al. 2002, Hornung et al. 2004). La exposición a MT, provocó cambios histológicos en gónadas, registrándose incluso la presencia de folículos ováricos inmersos en el tejido testicular (individuos intersexo) en diversas especies tales como *D. labrax* (Blázquez et al. 2001), *D. rerio* (Andersen et al. 2001, Orn et al. 2003) *O. latipes* (Seki et al. 2004, Kang et al. 2008) y *G. aculeatus* (Halhbeck 2004).

Es de destacar que son escasos los trabajos que evalúan los efectos de esta hormona sobre aspectos reproductivos de peces, y en éstos además se utilizan concentraciones relativamente altas de MT (en el rango de los  $\mu$ g/L) a pesar de que el compuesto está presente en el ambiente en el rango de los ng/L. La bibliografía reporta en ambientes naturales desde 2 hasta 100 ng/L de MT (Durhan et al. 2002, Thomas et al. 2002). 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).

El objetivo del presente capítulo fue evaluar los efectos de concentraciones ambientalmente relevantes de MT sobre índices somáticos, comportamiento reproductivo, variables espermáticas, histología y ultraestructura de gónadas de machos de *J. multidentata*, y determinar si dichas concentraciones ejercen efectos estrogénicos sobre dicha especie.

3.7..D.2. *Condiciones de Exposición y determinación de MT en agua*

Los peces fueron recolectados durante los meses de febrero y marzo de 2011. La longitud estándar y peso promedio de los peces utilizados en los ensayos fueron de:  $28,56 \pm 3,31$  mm y  $0,48 \pm 0,17$  g, respectivamente. Las concentraciones nominales de 17  $\alpha$ -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 mediante 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 ion 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.

Los niveles residuales de MT obtenidos fueron de 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.

3.7..D.3. *Resultados*3.7..D.3.1. *Mortalidad e Índices somáticos*

No se registró mortalidad en el grupo control ni en ninguno de los tratamientos durante los 28 días de exposición. Los índices somáticos no se diferenciaron significativamente entre los tratamientos (incluyendo al grupo control) (*K*:  $F= 0.9463$ ,  $p=0.12$ ; *IHS*:  $F=0.4932$ ,  $p=0.81$ ; *IGS*:  $F= 0.4935$ ,  $p=0.81$  (Tabla 3.13).

**Tabla 3.13.** Índices somáticos evaluados en machos adultos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 10, 75 y 150 ng/L de MT. Referencias: **K**: Factor de condición; **IHS**: Índice hepatosomático; **IGS**: Índice gonadosomático. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar.

Índices Somáticos	0 ng MT/L	5 ng MT/L	50 ng MT /L	100 ng MT /L
<b>K</b>	$1.96 \pm 0.03$	$1.97 \pm 0.03$	$1.95 \pm 0.03$	$1.95 \pm 0.03$
<b>IHS</b>	$2.60 \pm 0.35$	$2.15 \pm 0.22$	$2.21 \pm 0.23$	$2.14 \pm 0.15$
<b>IGS</b>	$3.07 \pm 0.22$	$3.25 \pm 0.17$	$3.30 \pm 0.19$	$3.20 \pm 0.22$



3.7.D.3.2. *Comportamiento Reproductivo*

Tanto en el grupo control como en los individuos expuestos a MT el 100% de los individuos tuvo un comportamiento sexualmente activo ante la hembra. Sin embargo, se registró que el 80% de los controles inició su comportamiento sexual ante la primera hembra, mientras que en los expuestos a MT este porcentaje fue significativamente menor para las concentraciones más bajas ensayadas; un 40% de los individuos expuestos a las concentraciones de 5ng y 50 ng MT/L ( $Z = -2.51$ ;  $p=0.011$ ), mientras que para los ejemplares sometidos a la concentración más alta de MT fue del 50% ( $Z = -1.72$ ;  $p=0.08$ ). En cuanto a la proporción de machos en los que se registró al menos una cópula sostenida la diferencia obtenida entre los controles y expuestos a MT fue no significativa ( $Z=-0.344255$ ;  $p=0.73$ ).

No se registraron diferencias significativas en las diferentes variables comportamentales analizadas entre los tratamientos (incluyendo al control). En la tabla 3.14 se muestran los valores medios y error estándar para cada variable

**Tabla 3.14.** Variables comportamentales registradas en machos de *J. multidentata* luego de 28 días de exposición a 0, 5, 50 y 100 ng MT /L. Referencias: **TP:** tiempo de persecución, **P:** número de persecuciones, **IC:** intentos de cópula, **C:** cópulas. Se muestran los valores medios  $\pm$  E.E, valores de F y  $p$  para cada variable.

Variable	0 ng MT /L	5 ng MT /L	50 ng MT /L	100 ng MT/L	F	p
<b>TP</b>	27.75 $\pm$ 7.36	38.36 $\pm$ 9.76	30.00 $\pm$ 6.88	36.88 $\pm$ 9.12	1.12	0.3606
<b>NP</b>	13.80 $\pm$ 3.38	23.88 $\pm$ 5.05	16.14 $\pm$ 3.00	23.13 $\pm$ 3.96	1.36	0.2792
<b>IC</b>	13.60 $\pm$ 5.28	22.13 $\pm$ 7.33	16.00 $\pm$ 3.52	22.50 $\pm$ 6.49	0.48	0.7012
<b>C</b>	3.80 $\pm$ 1.46	4.50 $\pm$ 1.79	4.29 $\pm$ 1.23	8.00 $\pm$ 4.34	0.49	0.6933
<b>NP/TP</b>	0.89 $\pm$ 0.30	0.57 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.05	0.94	0.4372
<b>IC/TP</b>	0.70 $\pm$ 0.24	0.42 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.05	1.23	0.3208
<b>C/TP</b>	0.19 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05	1.20	0.3300
<b>IC/NP</b>	0.86 $\pm$ 0.14	0.81 $\pm$ 0.11	1.05 $\pm$ 0.15	0.92 $\pm$ 0.16	0.55	0.6510
<b>C/NP</b>	0.24 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.11	0.64	0.5991
<b>C/IC</b>	0.28 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.18	0.80	0.5050

3.7.D.3.3. *Parámetros espermáticos*

Debido a que no se registró interacción entre las variables espermáticas y el comportamiento reproductivo, los datos se analizaron de manera conjunta. Ninguno de los parámetros espermáticos evaluados mostró diferencias significativas luego de la exposición a MT (recuento:  $F = 0.30$ ,  $p=0.8281$ ; motilidad:  $F=0.77$ ;  $p=0.51$  y viabilidad), sin embargo se

observó una tendencia a la disminución de espermatozoides vivos móviles ( $F= 2.79, p=0.06$ ) y al incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos dependiente de la concentración ( $F=2.40, p= 0.07$ ) (tabla 3.15).

**Tabla 3.15.** Motilidad, viabilidad y recuento espermático (cel/ $\mu$ l de muestra), de machos adultos de *J. multiidentata* luego de 28 días de exposición a 0 (control), 5, 50 y 100 ng MT/L de MT. Referencias: **VL**: velocidad lineal ( $\mu$ m/seg); **VCL**: velocidad curvilínea ( $\mu$ m/seg); **LN**: linealidad; **VM**: porcentaje de espermatozoides móviles; **VI**: porcentaje de espermatozoides vivos inmóviles; **M**: porcentaje de espermatozoides muertos. Se muestran los valores medios  $\pm$  errores estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos parámetros ( $p<0.05$ ).

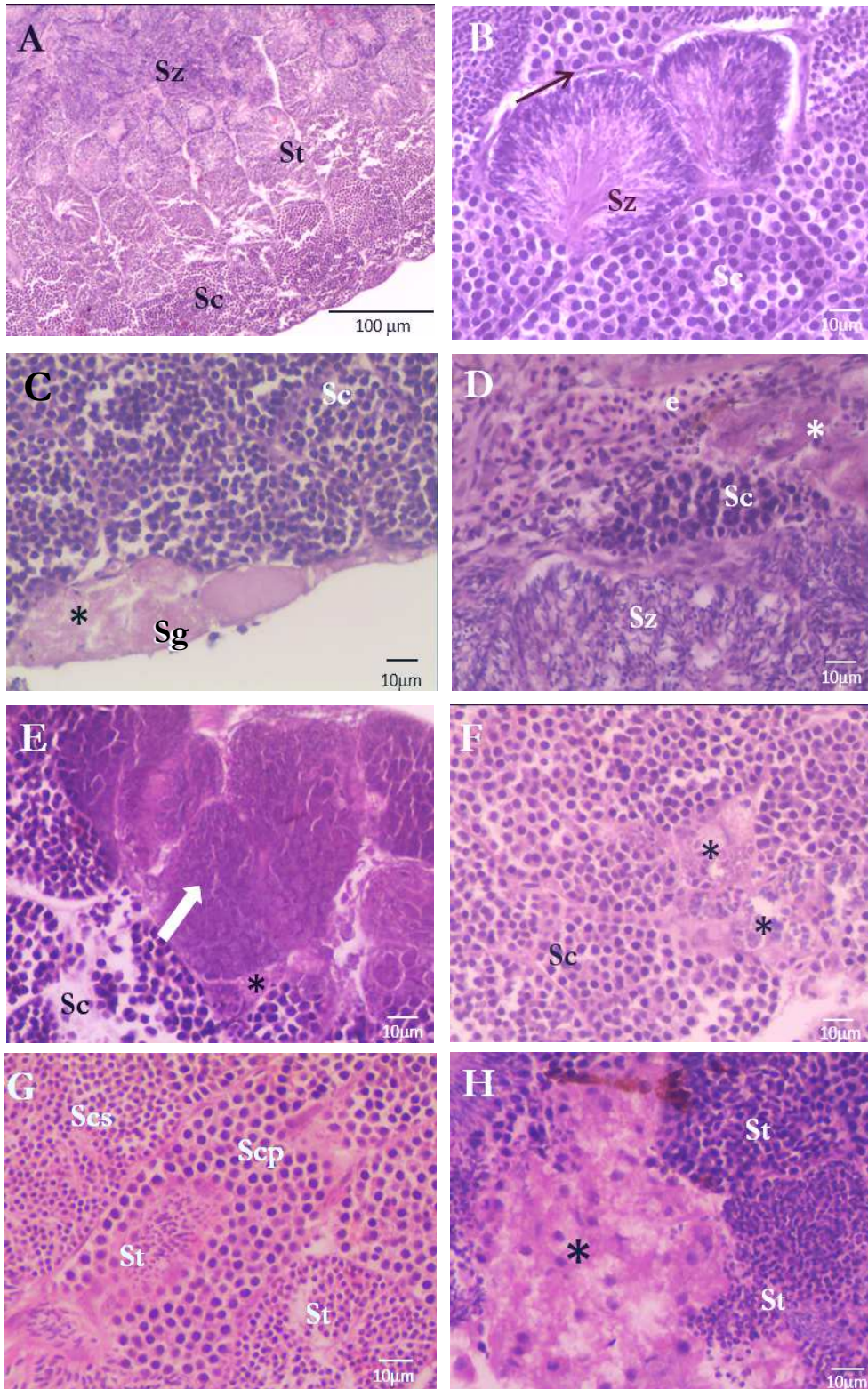
Parámetros	5 ng MT /L	5 ng/L de MT	50 ng/L de MT	100 ng/L de MT	F	p
<b>VL</b>	105.08 $\pm$ 8.31	105.98 $\pm$ 7.45	107.03 $\pm$ 6.44	112.06 $\pm$ 5.32	0.26	0.2443
<b>VCL</b>	107.05 $\pm$ 6.87	108.02 $\pm$ 6.42	110.05 $\pm$ 5.42	115.02 $\pm$ 6.51	0.28	0.1532
<b>LN</b>	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	97 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3	0.34	0.3286
<b>Recuento</b>	2404 $\pm$ 324	1964 $\pm$ 448	2336 $\pm$ 423	2237 $\pm$ 297	0.20	0.8980
<b>VM</b>	68.69 $\pm$ 3.65	73.22 $\pm$ 5.62	63.41 $\pm$ 6.54	63.36 $\pm$ 4.96	0.57	0.6390
<b>VI</b>	25.79 $\pm$ 3.74	20.29 $\pm$ 5.13	30.45 $\pm$ 5.99	27.29 $\pm$ 4.21	0.37	0.7744
<b>M</b>	5.52 $\pm$ 0.83	6.56 $\pm$ 1.86	7.27 $\pm$ 1.84	9.83 $\pm$ 1.60	1.61	0.1998

#### 3.7.D.3.4. Análisis histológico de testículo

Los testículos en el grupo control presentaron cistos con una estructura bien definida, y conteniendo entre un 75 y 85% de estadios maduros (St y Sz) (Fig. 3.20 A-B). En los individuos expuestos a las diferentes concentraciones de MT no se registró cambios en el porcentaje de estadios maduros aunque sí se evidenciaron alteraciones histológicas.

A 5 y 50 ng MT/L, se observaron numerosas Sg con pérdida de la estructura normal, evidenciándose la presencia de numerosas células vacuolares, formación de sincitios a nivel de Sc, desorganización del tejido testicular por mezcla de cistos en diferentes estadios espermatogénicos, pérdida de estructura de los cistos, necrosis en los estadios inmaduros y numerosos casos de congestión vascular (Fig. 3.20 C-F).

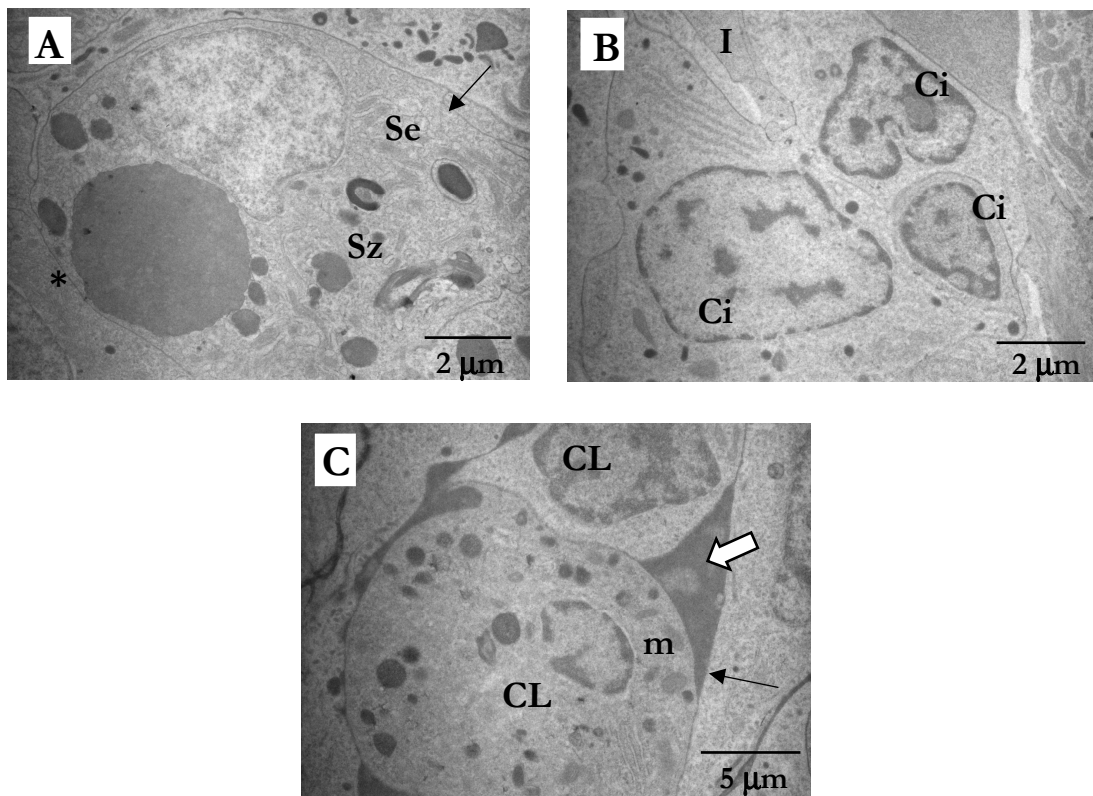
En la concentración más alta de MT (100 ng/L), si bien se registraron las mismas alteraciones histológicas que a las concentraciones más bajas, la frecuencia de las mismas fue mucho mayor. En todos los preparados analizados se registró pérdida de estructura de los cistos, marcada desorganización del tejido testicular y desincronización del proceso de espermiogénesis (St con formación del aparato flagelar pero sin el correspondiente arriñonamiento nuclear) (Fig. 3.20 G-H).



**Fig 3.20.** Corte histológico de testículo normal de ejemplares adultos de *J. multidentata* pertenecientes a (A-B) grupo control (magnificación 100x y 400x) y expuestos a: (C-E) 5 ng MT/L (magnificación 400x), (F) 50 ng MT/L (magnificación 400x), (G-H) a 100 ng MT/L (magnificación 400x). (A) Organización de los cistos dentro del testículo (magnificación 100x); (B) Detalle de los cistos espermatogénicos (magnificación 400x); (C) necrosis en estadios primordiales; (D) mezcla de cistos en diferentes estadios espermatogénicos; (E) degeneración de cistos; (F) vacuolización de cistos con Sc; (G) cisto conteniendo células en diferentes estadios espermatogénicos y (H) cisto totalmente vacuolizado. *Referencias:* **e:** eritrocitos; **Sc:** espermatozoides; **Sg:** espermatozonias; **St:** espermátidas; **Sz:** espermatozoides, **Asteriscos:** células vacuolares; **Flecha gruesa blanca:** degeneración de cistos; **flecha fina:** célula de Sertoli.

3.7.E.3.5. *Ultraestructura del testículo*

De acuerdo con la frecuencia en que se registraron las alteraciones histológicas descritas en el punto 3.3.5.D.3.4., sólo se procesaron gónadas provenientes de individuos expuestos a la concentración más alta (100 ng MT/L). Los individuos expuestos a esta concentración mostraron con frecuencia fagocitosis de cistos enteros, abundancia de leucocitos, lo que indica la presencia de procesos inflamatorios y un incremento en la proporción células de Leydig. Estas últimas presentaron una gran actividad secretoria, lo que condujo a una acumulación de material segregado en el espacio intersticial (Fig. 3.21A-C).



**Fig. 3.21.** Microfotografías de testículo de *J. multidentata* expuestos a 100 ng/L MT donde se muestra (A) Fagocitosis por parte de las células de Sertoli (magnificación 7750x); (B) Presencia de numerosas células inflamatorias (magnificación 7750x), (C) Células de Leydig donde se observan las mitocondrias características de este tipo celular. Se señala el material segregado por estas células (flecha blanca), que debido a su gran abundancia se ubica entre el espacio celular (magnificación 10000x). *Referencias:* Ci: células inflamatorias; CL: células de Leydig; I: intersticio; m: mitocondrias; Se: células de Sertoli; Sz: espermatozoide. Asteriscos indican material fagocitado, flechas finas: límite de un cisto.

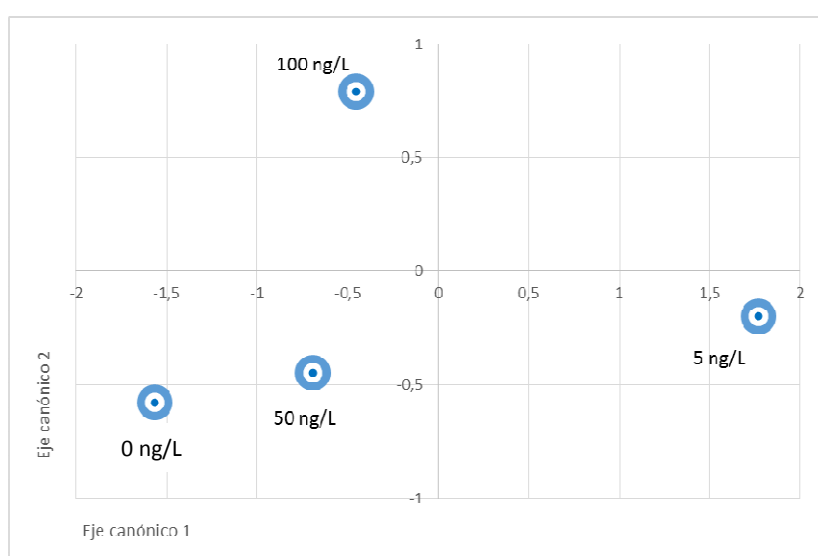
3.7.D.3.6 *Análisis Discriminante*

Debido a que en el presente ensayo no se registraron diferencias significativas en ninguna de las variables cuantitativas analizadas para la realización del Análisis Discriminante se seleccionaron las siguientes variables: IGS, porcentaje de espermatozoides VM y M, recuento espermático y las relaciones entre las distintas variables comportamentales.

El análisis discriminante arrojó un 70% de asignación correcta. En el procedimiento de validación cruzada, los individuos fueron asignados correctamente en su respectivo tratamiento en un 60% (grupo control), 90% (5 ng MT/L), 70% (50 ng MT/L) y 60 % (100 ng MT/L) (tabla 3.16). Se establecieron dos ejes canónicos que explicaron: el primero de ellos el 74.98% de la variabilidad total, mientras que el segundo el 15.47%. Las variables que mejor explicaron en ambos ejes las diferencias entre grupos fueron variables comportamentales, siendo para el 1° eje el IC/TP y C/TP, mientras que para el 2° eje fueron IC/NP y C/NC. En la figura 3.22 se muestran los centroides en el espacio discriminante para cada tratamiento.

**Tabla 3.16.** Matriz de clasificación cruzada de la variación la respuesta de biomarcadores de acuerdo a las distintas concentraciones de MT ensayadas.

Grupo	0 ng	5 ng	50 ng	100 ng	Total	Asignación correcta (%)
0 ng	6	0	2	2	10	60
5 ng MT/L	0	9	0	1	10	90
50ng MT/L	2	0	7	1	10	70
100 ng MT/L	2	1	1	6	10	60
Porcentaje de asignación correcta						70



**Fig. 3.22.** Representación de distribución de centroides de los 3 tratamientos y el grupo control definidos a priori, en el espacio discriminante conformado por los ejes canónicos 1 y 2.

### 3.7.D.4. DISCUSIÓN

La hormona MT ha sido registrada en diferentes ríos del mundo en bajas concentraciones (ng/L) y se ha probado su efecto estrogénico a concentraciones más elevadas ( $\mu$ g/L). En el presente estudio se evaluó el efecto que bajas concentraciones de esta hormona (semejantes a las ambientales) pueden ejercer en el comportamiento reproductivo de *J. multidentata*. A nivel comportamental sólo pudo registrarse un menor interés hacia la hembra en los individuos expuestos a MT, ya que hubo que reemplazar a la misma varias veces antes de que los machos mostraran un comportamiento reproductivo. Sin embargo, una vez comenzado el comportamiento sexual, las variables analizadas no evidenciaron cambios con respecto al control. Un estudio llevado a cabo por Guyón (2013) arrojó que la exposición a las mismas concentraciones de MT en machos de *J. multidentata* no produjo diferencias en la expresión de la enzima aromatasa cerebral. Ambos resultados reflejarían que las concentraciones ensayadas en el presente estudio no estarían ejerciendo efecto estrogénico en el comportamiento reproductivo a 28 días de exposición. Estos resultados coinciden con lo citado por Pawlowski et al. (2004) quienes no observaron efectos de la MT sobre el comportamiento reproductivo de machos de *P. promelas* aún a concentraciones mayores (0.1 a 50  $\mu$ g/L) luego de 21 días de exposición.

Si bien las variables espermáticas no se vieron alteradas en individuos tratados con MT, en el presente estudio se registró una tendencia hacia la disminución de espermatozoides vivos móviles y un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos. Los resultados registrados en la bibliografía a cerca del efecto de la MT sobre estas variables son dispares, debido a que los efectos de este compuesto dependen de la concentración ensayada y de la especie en estudio. Rivero-Wendt et al. (2003) registraron una reducción en el recuento espermático en *Astyanax bimaculatus* tratadas durante 28 días con alimento al que se le adicionó 60 mg/L MT, sin embargo, este efecto no fue observado en *Oreochromis niloticus* expuesto a las mismas dosis. Por otro lado, Lee et al (1996) observaron que la exposición a MT, si bien no produjo alteraciones en la espermatogénesis, si provocó una inhibición completa de la espermiación en *Chatos chanos* alimentados con alimento al cual se le adicionó MT (dosis 12 mg/Kg corporal). Viveiros et al. (2001) no observaron efectos en la viabilidad ni el recuento espermático en *Clarias gariepinus* expuestos durante 28 días a 50 mg/Kg MT a través de alimento. Como se mencionó anteriormente, estos trabajos evalúan el efecto de concentraciones muy elevadas (mg/L) lo cual dificulta la comparación con los resultados obtenidos en esta tesis a concentraciones marcadamente inferiores.

Por otra parte, estudios que utilizaron concentraciones de MT similares a las ensayadas en el presente trabajo, en períodos de exposición comprendidos entre 7 a 28 días tampoco registraron cambios en los índices somáticos en machos pertenecientes a diferentes especies, aunque si se vieron alterados en hembras (Pawlowski et al. 2004, Andersen et al. 2006, Kang et al. 2008).

A diferencia de los demás biomarcadores analizados, la exposición a MT produjo alteraciones histológicas en testículos a todas las concentraciones ensayadas. Las Sg evidenciaron severos procesos degenerativos y necrosis, resultados que concuerdan con lo informado por otros autores (Yamazaki 1972, Ankley et al. 2001). Frecuentemente se registró congestión vascular en zonas próximas a áreas alteradas, lo que indicaría la presencia de procesos inflamatorios, en concordancia con lo registrado a nivel ultraestructural donde se observaron numerosas células inflamatorias y procesos de fagocitosis. Cabe destacar que a pesar de las alteraciones histológicas que fueron registradas, éstas no se vieron reflejadas en variaciones en la cantidad y/o calidad de gametas ni en el IGS. La ausencia de efectos a nivel de las gametas puede deberse a que 28 días de exposición (duración del ensayo) no serían suficientes para visualizar efectos a este nivel, ya que para esta especie el tiempo en que se desarrolla la gametogénesis (desde la división de las espermatogonia hasta la formación de los espermatozoides) sería mayor a los 30 días, tal como fue descrito para otras especies vivíparas emparentadas (Grier, 1993)

El análisis ultraestructural del testículo arrojó una marcada actividad secretoria de las células de Leydig en coincidencia con otros autores, a concentraciones más elevadas (Borg et al. 1986, Hulak et al. 2008). Se sabe que si bien la síntesis de andrógenos por parte del testículo es estimulada por gonadotropinas (hormonas folículo estimulante y luteinizante), los esteroides sexuales (como la 11-ketosterona) pueden regular los mecanismos de retroalimentación que afectan la producción y/o liberación de estas hormonas (Schulz & Miura 2002). Es posible que la exposición a MT favorezca un mecanismo de retroalimentación positiva en la producción de andrógenos por las células de Leydig. Se sabe que la hormona 11-KT estimula los estadios tardíos de desarrollo durante la espermatogénesis, tales como la meiosis y la espermiogénesis, donde la hormona hipofisiaria LH toma un papel relevante.

Tal como se ha desarrollado anteriormente, la exposición durante 28 días a MT sólo produjo alteraciones a nivel de histología y ultraestructura gonadal. Si bien, luego de la exposición a MT, no se evidenciaron diferencias significativas en las diferentes variables cuantitativas analizadas, los resultados arrojados por el análisis discriminante demuestran que,

al considerar estas variables, las variables comportamentales responderían diferencialmente. Aunque se sabe que la MT en plasma es rápidamente metabolizada y excretada (Ahmad et al. 2002), se ha detectado que en peces expuestos durante 28 días a este compuesto aún presentan MT en plasma, incluso hasta 5 meses después de finalizado el ensayo (Rizkalla et al. 2004). Por lo tanto es altamente probable que a concentraciones mayores o tiempos de exposición más prolongados, los biomarcadores medidos en el presente trabajo puedan verse afectados.





## *CAPÍTULO IV*

*Biomarcadores a campo en peces recolectados en dos sitios con diferente  
calidad de agua de la cuenca del Río Suquía*

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de agua dulce son esenciales para el desarrollo y el bienestar humano por los servicios que estos brindan, como el aporte de agua y alimentos, la reducción de los desechos generados por el hombre y la capacidad de actuar como reguladores del clima. La contaminación de estos recursos impacta negativamente sobre su integridad y la biota que forma parte de los mismos, afectando directamente a los servicios que prestan y por lo tanto al bienestar humano. Una correcta gestión de nuestros recursos hídricos de una manera sostenible y equitativa es fundamental para el sustento de la vida, la salud y la dignidad de los pueblos, y constituye una de las bases esenciales de nuestro desarrollo social y económico (PNUMA 2007, 2012).

La contaminación de los recursos acuáticos, es una problemática de creciente importancia debido al uso cada vez más intensivo de éstos provocada por las demandas del crecimiento poblacional, el cual no se ve acompañado en igual medida de políticas sustentables para garantizar su integridad y el mantenimiento de las funciones ecosistémicas, de vital importancia para todos los organismos, incluidos los seres humanos. Debido a que las acciones del hombre en las áreas urbanas incrementan el ingreso de nutrientes, metales, compuestos orgánicos, hormonas etc., los ríos que atraviesan ciudades normalmente presentan una mayor y más variable concentración de contaminantes (Pasquini et al. 2012). Por otra parte, las plantas de tratamiento de efluentes, diseñadas para disminuir la carga de contaminantes, no logran la remoción completa de todos compuestos que traen los efluentes, por lo cual una gran variedad de compuestos ingresa a los ecosistemas acuáticos, afectando a la biota que habita en él (Rodríguez-Mozaz et al. 2004).

En las últimas décadas una creciente evidencia científica ha demostrado que las poblaciones silvestres de peces están siendo expuestas a numerosos perturbadores endocrinos (PEs), en concentraciones suficientes como para producir diversas alteraciones que afectan, entre otras funciones, a la reproducción, con las implicancias ambientales que esto acarrea (Jobling & Tyler 2003, Frye et al. 2012, Scholz et al. 2012, Vandenberg et al 2012, Rogers et al. 2013). Diversos estudios han identificado a los estrógenos, como los compuestos más significativos presentes en la mayoría de las aguas residuales del mundo (Desbrow et al. 1998, Matsui et al. 2000, Korner et al. 2001).

Debido al origen antropogénico de las hormonas sintéticas y naturales, las mismas son frecuentemente detectadas en los efluentes de plantas de tratamientos de líquidos cloacales y aguas superficiales en concentraciones que oscilan desde pg/L a ng/L (Baronti 2000, Kuch & Ballschmiter 2001). Los estrógenos se caracterizan por ejercer efectos a bajas concentraciones en los organismos, lo que implica que a las concentraciones registradas en el ambiente estos compuestos pueden ejercer un efecto estrogénicos sobre la biota.

En la mayoría de la bibliografía encontrada, estos compuestos se cuantifican en los recursos hídricos del hemisferio Norte. Existen diversos programas de monitoreo ambiental en los distintos países, donde se registra y cuantifica la presencia de estos compuestos tanto en aguas superficiales como en efluentes cloacales. Un estudio llevado a cabo por Chimchirian et al. (2007) registraron la presencia de 12 hormonas naturales y sintéticas (entre las que se menciona la estrona, estriol, levonorgestrel, E<sub>2</sub>, EE<sub>2</sub>, entre otras) en diferentes ríos de Pensilvania, Estados Unidos, cuyas concentraciones oscilaron entre 1.2 a 259 ng/L.

En Europa, China, Japón y América del Norte se han detectado en aguas superficiales concentraciones de xenoestrógenos que oscilan entre: <1-80 ng/L (para E<sub>2</sub>), <1-85 ng/L (para E<sub>1</sub>), <1-75 ng/L (para EE<sub>2</sub>), mientras que en residuos cloacales se han registrados valores de hasta 200 ng/L (Desbrow et al. 1998, Johnson et al. 2000, Komori et al. 2004, Kuch & Ballschmiter 2001, Niven et al. 2001, Shen et al. 2001, Sheahan et al. 2002, Pojana et al. 2004, Karbe et al. 2006, Nagpal & Meays 2009 ).

En la provincia de Buenos Aires, Argentina, Valdés et al. (2014) han registrado en efluentes cloacales y algunos estuarios concentraciones de E<sub>2</sub> y EE<sub>2</sub> que oscilan entre 122-631 y 65-187 ng/L respectivamente, mientras que en un arroyo se registraron valores entre 369 y 43 ng/L respectivamente. De acuerdo a lo mencionado, se advierte que los valores de E<sub>2</sub> hallados en aguas superficiales son muy superiores a los registrados en países anglosajones. Si bien la concentración registrada de EE<sub>2</sub> es menor a la de la hormona natural, es importante destacar que la hormona sintética es mucho más potente e incluso presenta una mayor persistencia ambiental (Thorpe et al. 2003).

Como se mencionó en el capítulo III sección D las hormonas masculinas (andrógenos) pueden ejercer un efecto estrogénico a determinadas concentraciones (Piferrer & Donaldson 1993, Hornung et al. 2004, Pawlowski et al. 2004). En la bibliografía existen pocos reportes sobre la presencia de andrógenos en aguas superficiales. Liu et al. (2011) detectó en ríos de China concentraciones de dihidrotestosterona (DHT) que rondan los 10 ng/L. Estos mismos valores fueron registrados en nuestra provincia, en la cuenca del Río Suquía (Valdés et al. 2014).

Otros compuestos con reconocida actividad estrogénica pueden estar presentes en los ambientes acuáticos, entre los que se destacan los alquilfenoles. En el hemisferio Norte, en aguas superficiales se han detectado concentraciones que oscilan entre 1-135 ng/L para el caso del 4*n*-NP, mientras que en residuos cloacales se han registrado valores del orden de los µg para diferentes alquilfenoles (por ejemplo de 0.11 a 185 µg/L) (Pojana et al. 2004, Karbe et al. 2006). En Argentina un estudio llevado a cabo por Babay et al. (2008) detectó concentraciones de 4*n*-NP que oscilan entre 27 a 35 µg/L en cursos de aguas cercanos a PTEs, mientras que en la cuenca del Río Suquía (Córdoba), Bonansea et al. (2012) han registrado la presencia de 4*n*-NP luego de la Planta de tratamiento de aguas cloacales de Bajo Grande (PTEBG), aunque aún éste no pudo ser cuantificado.

Si bien cada compuesto produce una respuesta particular en la biota, es importante destacar que los cuerpos de agua contienen mezclas de diferentes tipos de compuestos, que difieren en el tipo de respuestas biológicas que provocan. Esto refleja la complejidad a la hora de abordar la problemática de la contaminación a campo. En laboratorio, diversos autores realizaron estudios combinando E<sub>2</sub>, EE<sub>2</sub> y 4*n*-NP, junto con otros alquilfenoles y obtuvieron respuestas estrogénicas mayores al 40% en comparación al máximo efecto estrogénico registrado de manera individual; concluyendo que estos compuestos tienen la capacidad de actuar conjuntamente de manera aditiva (Thorpe 2001, 2003, Silva 2002, Brian et al. 2005).

La cuenca del Río Suquía se localiza en la región semi-árida de la provincia de Córdoba (Argentina) y provee de agua potable para consumo humano tanto a dicha ciudad como a distintas poblaciones aledañas. La ciudad de Córdoba, presenta una población que se ha duplicado en los últimos 20 años llegando a tener 1.5 millones de habitantes (INDEC 2010). Esta cuenca ha sido intensamente estudiada en cuanto a su calidad de agua, a través de parámetros físico-químicos y biomarcadores biológicos, demostrando 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 (PTEBG) (Pesce & Wunderlin 2000, Amé et al. 2007, Merlo et al. 2011, Monferrán et al. 2011, Guyón et al. 2012b, Maggioni et al. 2012, Rautenberg et al. 2014). Además, el curso de agua se encuentra afectado por otras dos importantes fuentes de contaminación: volcamientos industriales de establecimientos ubicados a la vera del río, con escaso tratamiento previo (Comisión Municipal Honoraria 1998, Cosavella et al. 2006), y agroquímicos utilizados para combatir distintos tipos de plagas en los cultivos que alcanzan el curso por escorrentía (Kruus et al. 1991). Este problema se ha agravado durante los últimos años como consecuencia de la expansión de la frontera agrícola y la tala de bosques nativos,

determinando que la explotación agrícola alcance ambas márgenes del río (Barchuk 2008). Diversos autores han registrado en la cuenca de este río numerosos compuestos químicos. Valdés et al. (2014) ha detectado concentraciones de hasta 10 ng/L de E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. La presencia de metales pesados tales como Cu, Pb y Cr, cuyos niveles superan los permitidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, han sido registrados por numerosos autores (Merlo et al. 2011, Monferrán et al. 2011, Maggioni et al. 2012, Rautenberg et al. 2014). Entre los pesticidas detectados en el río pueden mencionarse la atrazina, endosulfán-sulfato, acetoclor, clorpirifos y cipermetrina, muchos de ellos en concentraciones que superan los límites establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (Bonansea et al. 2012). La mayoría de estos compuestos presentan actividad como PEs (Singh & Singh 2008, Li et al. 2009, Hayes et al. 2011, Da Cuña et al. 2013, Juberg et al. 2013).

La relación entre el caudal de los efluentes de PTEBG (media: 2,45 m<sup>3</sup>/s en el período 2011/2012) y el caudal del río (media: 2,5 m<sup>3</sup>/s en el mismo período) es casi 1:1, lo que supera la capacidad de purificación del río (Mancini 2012). Esto sumado a que muchos de estos compuestos son lipofílicos y persistentes, tienen la capacidad de bioacumularse y provocar efectos sobre los ecosistemas acuáticos o terrestres (Halling-Sørensen et al. 1998). Estos procesos someten a los componentes de la biota acuática a graves alteraciones tanto a nivel individual como en la estructura de sus comunidades (Bistoni et al. 1999, Hued et al. 2012, Valdés et al. 2014).

En base a los antecedentes mencionados, se propuso evaluar si el deterioro en la calidad del agua del Río Suquía provoca cambios en el comportamiento reproductivo, parámetros espermáticos, histología y ultraestructura de testículo en machos de *J. multidentata* recolectados en sitios con distinta calidad del agua.

## 4.2. HIPÓTESIS

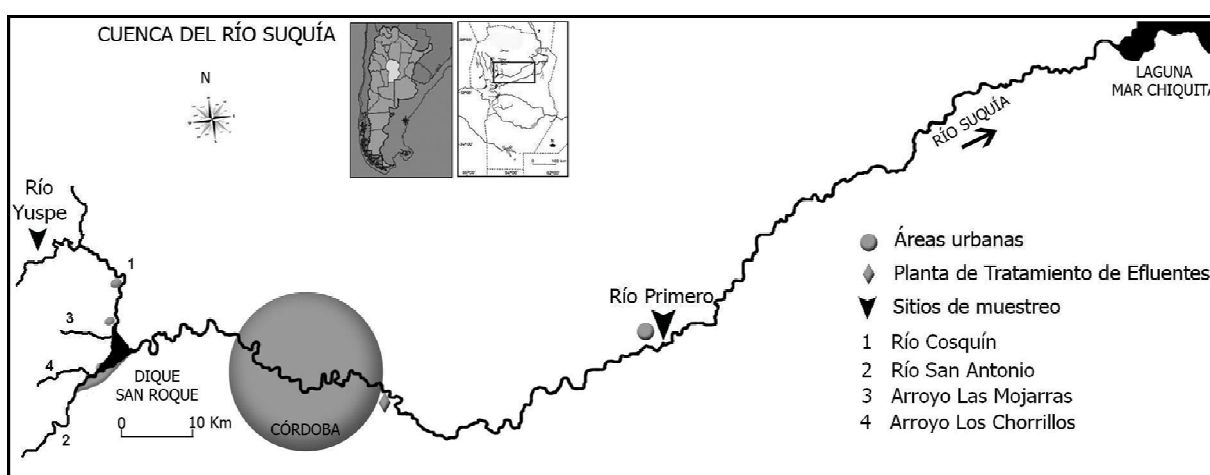
Como hipótesis general del presente capítulo se plantea que machos de la especie autóctona *J. multidentata* recolectados en sitios con marcada contaminación antropogénica manifiestan alteraciones en el comportamiento reproductivo y parámetros espermáticos en comparación con los que habitan en ambientes quasi-prístinos, presumiblemente por la presencia de diversos compuestos con actividad estrogénica. Además, la exposición a estos compuestos provoca cambios en el ciclo reproductivo de esta especie, y diversas alteraciones en la histología y ultraestructura de los testículos.

### 4.3. METODOLOGÍA

#### 4.3.1. Área de estudio

La cuenca del Río Suquía se ubica en el centro de la Provincia de Córdoba, y se origina por la confluencia de diversos afluentes: Río Icho Cruz-San Antonio y Yuspe-Cosquín y los arroyos Las Mojarras y Los Chorillos, provenientes de las Sierras Grandes. Todos ellos desembocan en el lago San Roque, a partir del cual se origina el Río Suquía, que recorre casi 200 km hasta desembocar en la laguna de Mar Chiquita. Es una cuenca endorreica que cubre un área de 8000 km<sup>2</sup>. Debido a que es un río que depende de los aportes pluviales, su caudal varía notablemente a lo largo del año. 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).

Los peces se recolectaron en dos sitios de la cuenca del Río Suquía (Fig. 4.1), seleccionados de acuerdo a estudios previos de calidad de agua (Pesce & Wunderlin 2000; Hued & Bistoni 2005). El sitio quasi-prístino seleccionado (sitio de referencia) se ubicó sobre el río Yuspe (RY) (31° 14' 18"; 64° 31' 14") a 70 km de la ciudad de Córdoba (Fig. 4.2 A). El segundo sitio, se estableció en la localidad Río Primero, a 70 km aguas abajo de la PTE (RP) (31° 20' 17"; 63° 36' 35") (Fig. 4.2B). El mismo se caracteriza por un elevado impacto antropogénico. Es importante 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 por la marcada contaminación (Mangionni et al. 2012)



**Fig 4.1.** Ubicación geográfica de los dos sitios de muestreo pertenecientes a la cuenca del Río Suquía, Córdoba, Argentina.



**Fig 4.2.** Fotografías del **(A)** Río Yuspe, Córdoba, seleccionado como sitio de referencia en la presente tesis. **(B)** Río Suquía a la altura de la localidad de Río Primero, Córdoba, ubicada a 60 km río debajo de la ciudad de Córdoba, donde puede observarse el deterioro en la calidad de sus aguas.

#### 4.3.2. Recolección de muestras

Los muestreos se realizaron mensualmente durante un año, desde enero a diciembre de 2010. Los individuos machos de *J. multidentata* fueron capturados utilizando un equipo de pesca eléctrica y transportados al laboratorio, con agua obtenida de cada localidad, en bidones de 20 L. Cuando fue posible se capturaron 15 ejemplares en cada sitio de muestreo. Conjuntamente con la recolección de peces, de modo bimensual, se colectaron muestras de agua para realizar los análisis físico-químicos.

#### 4.3.3. Parámetros de calidad de agua

Se monitorearon in situ oxígeno disuelto, conductividad, pH y temperatura mediante una sonda multiparamétrica Multiline F/SET3 (WTW, Weilheim, Germany). Las muestras de agua recolectadas fueron analizadas en el laboratorio para calcular la demanda biológica de oxígeno a los 5 días (DBO-5), nitrógeno-amonio, nitrito-nitrógeno, nitrato-nitrógeno, fósforo-ortofosfato, cloruros, sulfatos, dureza, calcio, magnesio, sólidos totales y coliformes totales. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con APHA (2005) y AOAC (1995).

Los 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 la asignación de 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, que varía del 0 a 100%, desde la más baja a la más alta calidad de agua. Valores de ICA menores a 50% se consideran que dificultan seriamente la vida acuática.

#### 4.3.4. Biomarcadores

##### 4.3.4.1. Comportamiento reproductivo

Para evaluar el comportamiento reproductivo se procedió según lo descrito en el capítulo III (sección 3.3.4.1). Debido al menor número de ejemplares recolectados en invierno y a que aumentó el porcentaje de machos que no se comportaron al ser expuestos ante una hembra, el



comportamiento reproductivo se analizó sólo durante la época reproductiva (ER) (Septiembre-Abril) (Goyenola et al. 2011).

#### *4.3.4.2. Parámetros espermáticos*

Para la extracción del espermatozoos y análisis de los parámetros espermáticos se siguió el protocolo detallado en el Cap. II (secciones 2.2.4 y 2.2.5). Los mismos fueron analizados mensualmente y considerando la época reproductiva (ER) y no reproductiva (ENR). Debido a que los parámetros espermáticos no fueron afectados por la actividad sexual previa del macho registrada en laboratorio ( $F=3.42$ ;  $p=0.38$ ), se decidió analizar de manera conjunta a los individuos CC y SC.

#### *4.3.4.3. Índices somáticos*

Se registró la longitud estándar y el peso de cada individuo. Los índices K, el IGS y el IHS (descritos en el Cap. III: 3.3.4.3) fueron calculados mensualmente.

#### *4.3.4.4. Análisis histológico de testículo*

De manera mensual, fueron analizadas las gónadas de 5 individuos provenientes de cada sitio de muestreo, las cuales se fijaron en formaldehído al 4%, se procesaron según técnicas histológicas de rutina y se tiñeron con H&E. Los cortes fueron examinados con microscopio óptico para evaluar posibles alteraciones en la organización tisular. Se cuantificaron además porcentajes de estadios espermatozoos tal como se describió en el capítulo III (sección 3.3.4.4).

#### *4.3.4.5. Análisis ultraestructural del testículo*

Para el análisis ultraestructural las gónadas de 2 individuos por cada sitio de muestreo fueron procesadas según lo descrito en el capítulo II sección 2.2.3, una durante la época reproductiva (ER) y otra durante la época no reproductiva (ENR).

#### 4.3.4.6. *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 a lo largo de los meses se realizó un análisis ANOVA con interacción, seguido por el test a posteriori DGC. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad se realizó análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, seguido por el test a posteriori de Dunn. La significancia, para cualquiera de los análisis realizados, fue aceptada para valores de  $p < 0.05$ .

Para las variables comportamentales, solo se analizaron aquellos datos obtenidos durante la época reproductiva, priorizando en este caso, la significancia biológica de los mismos. En cuanto a las variables espermáticas, se analizó a priori si el comportamiento sexual influyó sobre estos parámetros para cada mes de muestreo. Dado que en ninguno de los casos se registró interacción, los datos espermáticos fueron analizados agrupando los individuos a los cuales se les registró previamente el comportamiento con aquellos a los que no. Por un lado se realizó un ANOVA con interacción entre meses y sitios a lo largo de todo el muestreo anual, y además se agruparon los datos registrados en la ER (época reproductiva) y ENR (época no reproductiva) para determinar si existieron diferencias entre éstas.

Para comparar si existieron diferencias significativas en el porcentaje de cistos en distintos estadios espermtogénicos entre los dos sitios a lo largo del muestreo mensual se realizó un ANOVA. Por otro lado se utilizó un test de proporciones para evaluar si existieron diferencias en el porcentaje de cistos entre ambos sitios, considerando la ER y ENR.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. *Parámetros de calidad de agua*

En la tabla 4.1 se muestran los valores de los parámetros físico-químicos del agua registrados para cada sitio de muestreo. En RP la concentración de nitrógeno inorgánico total fue elevada durante todo el año en comparación con el sitio de referencia, mientras que el oxígeno disuelto disminuyó significativamente. Los sólidos totales, dureza, conductividad, calcio, magnesio,

cloruros y sulfatos mostraron un gran incremento después de la PTLC en todos los meses de muestreo. El mismo patrón fue observado con la concentración de coliformes totales.

De acuerdo con la caracterización química mencionada para cada sitio, se observa que en RY (sitio de referencia) los valores del ICA mostraron una variación anual entre 71.3 a 87.1% mientras que en RP se registraron valores comprendidos entre 41.7 y 60.4% (Fig. 4.3).

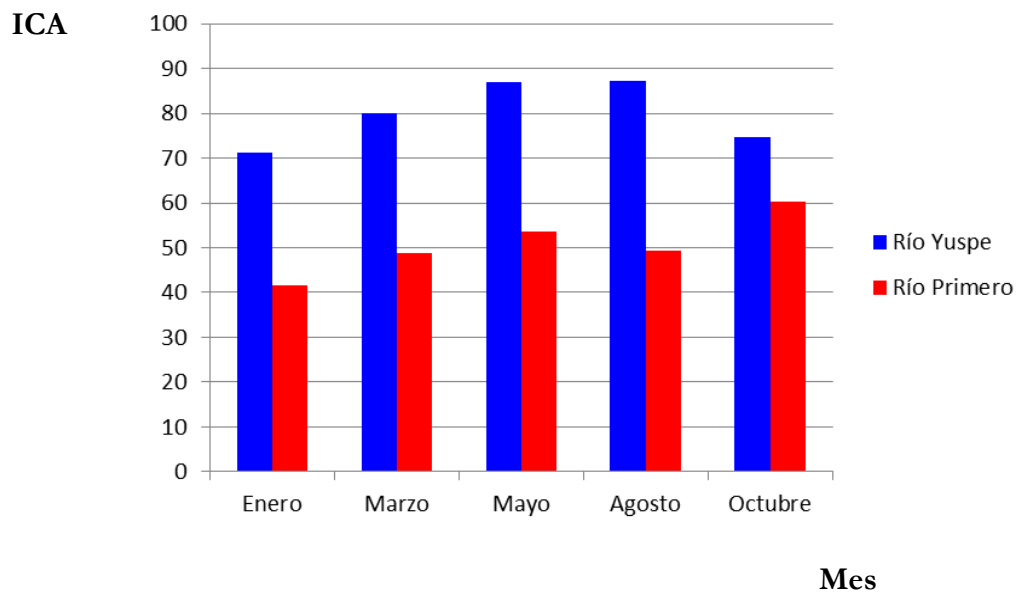


Fig. 4.3. Índice de Calidad de Agua (ICA) con frecuencia bimensual por sitio de muestreo.

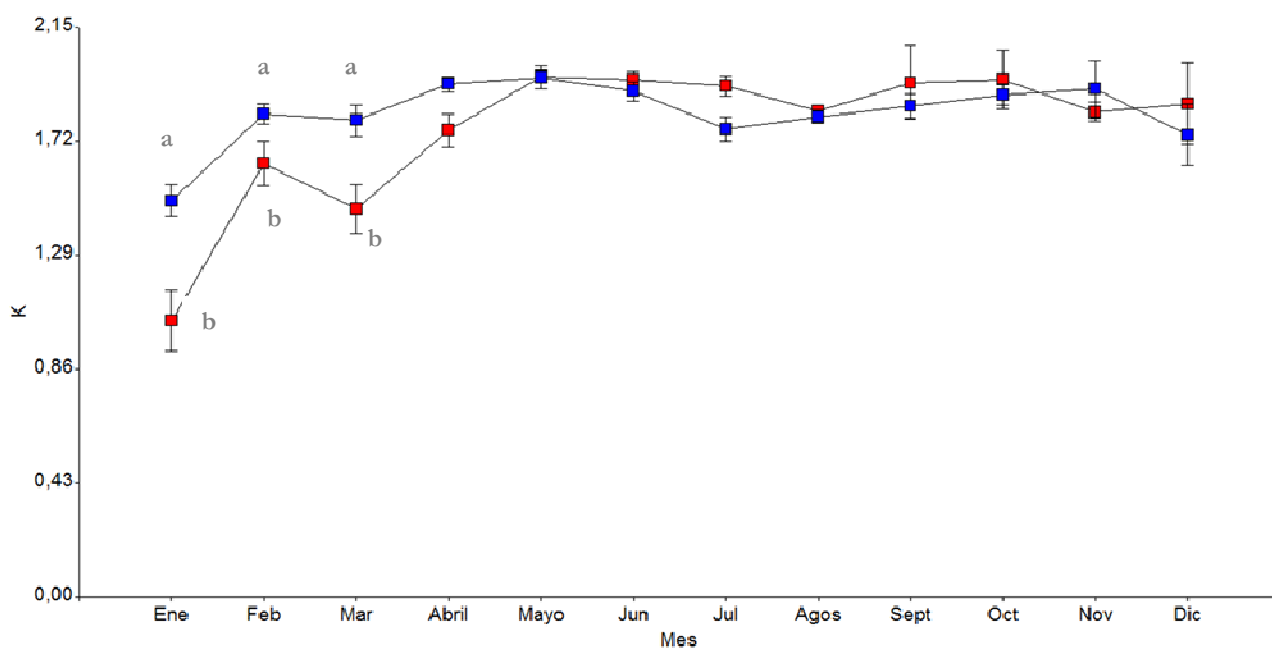
**Tabla 4.1.** Parámetros de calidad de agua de los sitios Río Yuspe (RY) y Río Primero (RP). Los valores se expresan en mg/L. Las coliformes totales corresponden a valores exponenciales (ej. 2.3 E+03=2300), y se expresan como NMP 100 m/L (número más probable por 100 mL). Los asteriscos indican mediciones in situ durante el biomonitoreo.

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	5.00 ± 0.22	1.65 ± 0.67	1.52 ± 0.52	0.18 ± 0.03	1.31 ± 0.22	0.087 ± 0.003	11.69 ± 0.99	0.87 ± 0.64	0.86 ± 0.32
Demanda Biológica de Oxígeno luego de 5 días (DBO-5)	1.35	4.5	0.3	4.1	1	1.58	1.35	1.22	4.7	0.33
Cloruro	3.91 ± 0.02	89.33 ± 0.69	3.91 ± 0.03	77.61 ± 0.69	3.91 ± 0.01	80.54 ± 0.69	3.91 ± 0.04	112.76 ± 0.69	3.91 ± 0.02	79.08 ± 1.38
Conductividad [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]*	72	980	49	978	82	967	148	1351	131	1335
Oxígeno Disuelto*	10.95	7.56	10.17	7.36	10.7	6.88	10.03	4.84	9.02	5.57
Nitrógeno-nitrato	0.88 ± 0.09	31.07 ± 2.20	0.25 ± 0.03	7.24 ± 2.45	0.51 ± 0.12	9.11 ± 1.47	0.30	2.65 ± 1.48	0.36 ± 0.08	7.50 ± 0.06
Nitrógeno-nitrito	0.09 ± 4E-10	0.28 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.18 ± 9E-4	0.01	1.75 ± 0.02	0.011 ± 0.003	0.79 ± 0.04	0.076 ± 0.001	0.177 ± 0.002
Fósforo-ortofosfato	0	0.74 ± 0.16	0	0.28 ± 0.04	0	0.25 ± 0.03	0	1.37 ± 0.02	0	0.07 ± 0.04
pH*	8.75	8.22	7.92	8.58	8.15	7.44	8.94	7.53	8.8	7.85
Sólidos Totales	76.4	1008.4	56.8	701.6	40	400	96.4	891.6	58.4	676
Sulfato	0.29 ± 0.33	132.9	0.37 ± 0.03	132.27 ± 0.89	0.35 ± 0.06	67.14 ± 8.02	0.25 ± 0.04	121.99 ± 1.34	0.35 ± 0.06	67.14 ± 8.02
Temperatura* [°C]	30.5	24.4	16.7	22.6	12.3	11.7	18.2	15	18	17.3
Coliformes Totales	1,50E+04	8,80E+05	2,00E+02	1,20E+05	5,00E+02	2,40E+05	2,20E+03	1,50E+05	5,00E+02	5,00E+03
Dureza	29.33 ± 7.32	337.53 ± 15.45	20.7 ± 0.07	317.4 ± 6.51	28.75 ± 1.63	281.75 ± 4.88	57.5 ± 3.3	292.68 ± 0.81	50.6	289.23 ± 0.81
Calcio	7.14 ± 1.63	98.41 ± 6.84	6.45 ± 1.30	92.18	8.76 ± 0.65	88.96 ± 0.65	14.75	100.02 ± 1.96	8.30 ± 1.30	87.81 ± 0.33
Magnesio	2.79 ± 2.77	22.36 ± 7.90	1.12 ± 0.79	21.24 ± 1.58	1.68 ± 0.79	14.53 ± 1.58	5.03 ± 0.79	10.48 ± 0.99	7.27 ± 0.79	17.05
ICA	71.3	41.7	80	48.8	86.9	53.5	87.1	49.2	74.6	60.4

## 4.4.2. Biomarcadores

## 4.4.2.1. Índices somáticos

En la figura 4.4 puede observarse la variación mensual en el factor de condición (K) en ambos sitios de muestreo. Se registró interacción entre meses y sitios de muestreo ( $F= 3.43$ ;  $p=0.002$ ), indicando diferencias en los patrones de variación de K entre sitios a lo largo del año. RP mostró valores significativamente inferiores con respecto a RY en los meses de enero, febrero y marzo, meses de época reproductiva. Al comparar ambos sitios de muestreo en el período completo de estudio se observaron diferencias significativas ( $F= 4.18$ ;  $p=0,0421$ ), encontrándose los niveles más elevados de K en el sitio de referencia ( $K= 1.83 \pm 0.45$ ) en comparación con el sitio contaminado ( $K= 1.76 \pm 0.57$ ).

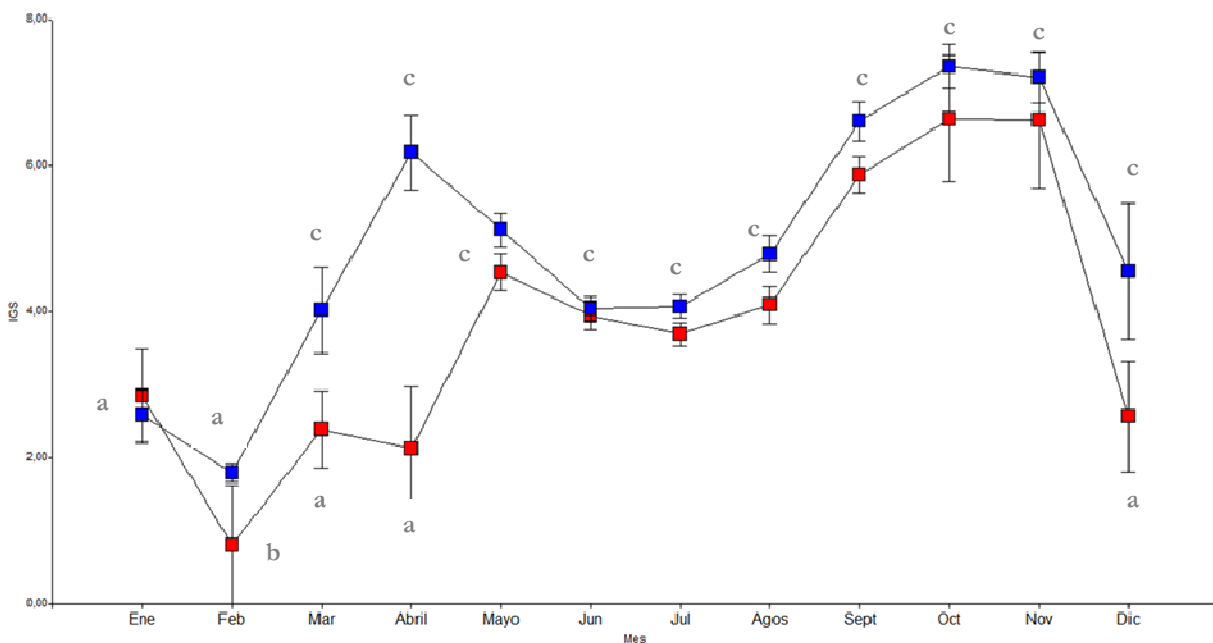


**Fig 4.4.** Variación del Factor de Condición (K) analizado durante un ciclo anual en machos de *J. multidentata* recolectados en Río Yuspe (color azul) y Río Primero (color rojo). Letras distintas indican diferencias significativas.

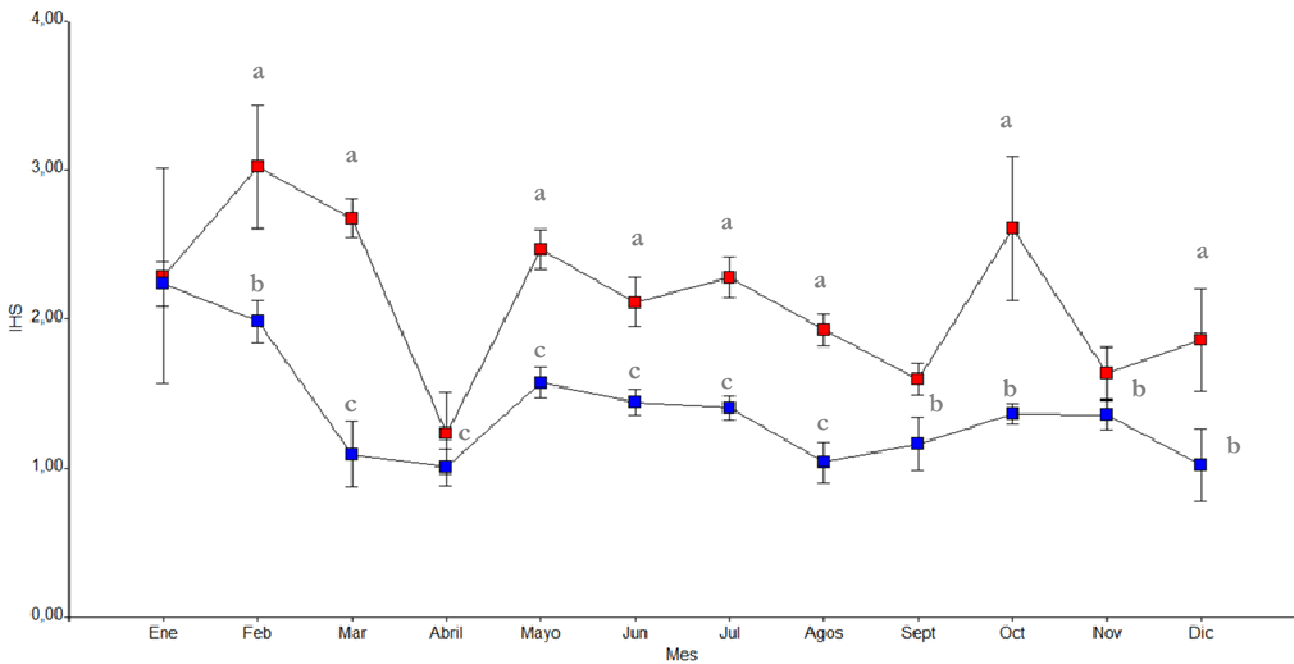
El análisis del índice hepatosomático (IHS) registró una interacción significativa entre meses y sitios ( $F= 2.46$ ;  $p=0.0064$ ), reflejando diferencias significativas en 8 de los 12 meses muestreados (Fig. 4.5). Al analizar el período completo de estudio ( $F=70.35$ ;  $p< 0.0001$ ), se registró un mayor

valor de este índice en el sitio contaminado (IHS=2.14 ± 0.53) en comparación con el sitio control (IHS=1.39 ± 0.28).

Finalmente, en cuanto al IGS, se observaron diferencias significativas entre ambos sitios de muestreo (F=27.01; p< 0.0001), siendo mayor este índice en RY (IGS=4.86) con respecto a Río Primero (IGS=3.85). Se registró además, interacción entre meses y sitios (F= 2.49; p=0.0057), indicando diferencias en los patrones de variación entre sitios a lo largo del año (Fig. 4.6). En el sitio control (RY) se identificaron dos picos de incremento en el valor del IGS durante la época reproductiva (que se extiende de septiembre a abril). El primer pico se observa entre los meses de septiembre a noviembre, mientras que el segundo puede observarse durante los meses de marzo y abril, mes en el que concluye la época reproductiva. Se registraron diferencias significativas en el valor del IGS en los meses de febrero, marzo, abril y diciembre. Si bien en general se observa la misma tendencia en la variación de este índice en Río Primero, el pico de incremento del IGS se observó tardíamente, recién en el mes de mayo.



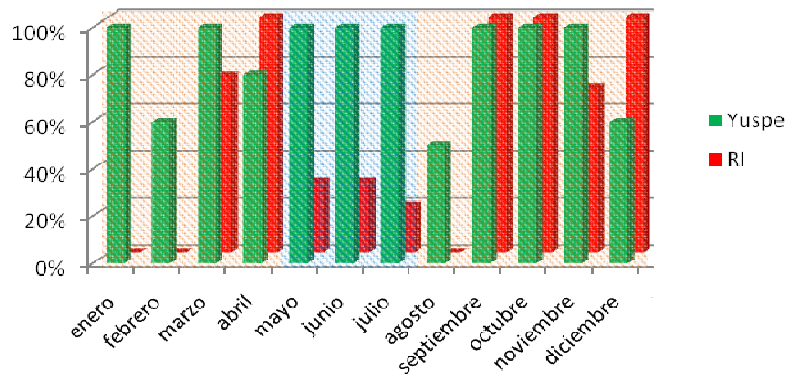
**Fig 4.5.** Variación en el índice hepatosómico (IHS) analizado durante un ciclo anual en machos de *J. multidentata* recolectados en Río Yuspe (color azul) y Río Primero (color rojo). Letras distintas indican diferencias significativas.



**Fig 4.6.** Variación del Índice Gonadosomático (IGS) analizado durante un ciclo anual en machos de *J. multidentata* recolectados en Río Yuspe (color azul) y Río Primero (color rojo). Letras distintas indican diferencias significativas.

4.4.4.2. *Comportamiento Reproductivo*

Del total de machos recolectados en el RY, un 90% inició su comportamiento sexual ante una hembra en comparación a un 55% de machos provenientes de RP. En peces provenientes del RY, en general se registró actividad sexual en un porcentaje mayor al 60% (Fig. 4.7). En contraposición, en el sitio contaminado, durante los meses de enero, febrero y agosto los machos no presentaron comportamiento sexual, mientras que en los meses de mayo, junio y julio sólo un porcentaje de alrededor al 30% presentó actividad sexual.



**Fig. 4.7.** Porcentaje de machos adultos que tuvieron comportamiento sexual ante una hembra durante todos los meses de muestreo.

El análisis en las variables comportamentales absolutas arrojó una disminución significativa en el sitio contaminado a saber: tiempo de persecución (TP); intentos de cópula (IC) y número de cópulas (C), no así en el número de persecuciones (NP) ( $H=2.82$ ;  $p= 0.0929$ ). Las variables relativas arrojaron diferencias significativas en la proporción del tiempo en que los machos intentan copular (IC/TP); de persecuciones que incluyen intentos de cópula (IC/NP) y en porcentaje de persecuciones exitosas (C/NP); siendo en todos los casos los machos de RP los que registraron menores valores (tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Variables comportamentales analizadas durante la época reproductiva (ER). Referencias: **TP**: tiempo de persecución (seg), **NP**: número de persecuciones, **IC**: intentos de cópula, **C**: cópulas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

Variables	RY	RI	H	<i>p</i>
TP	91.48 ± 12.04 <b>a</b>	51.25 ± 11.21 <b>b</b>	5.34	<b>0.0208</b>
NP	27.24 ± 5.03	18.20 ± 6.16	2.82	0.0929
IC	45.79 ± 8.24 <b>a</b>	18.25 ± 4.45 <b>b</b>	8.53	<b>0.0035</b>
C	17.91 ± 3.09 <b>a</b>	6.67 ± 2.33 <b>b</b>	8.10	<b>0.0043</b>
NP/TP	0.35 ± 0.12	0.42 ± 0.13	3.48	0.0619
IC/TP	0.49 ± 0.21 <b>a</b>	0.35 ± 0.13 <b>b</b>	4.24	<b>0.0396</b>
C/TP	0.14 ± 0.03 <b>a</b>	0.09 ± 0.02 <b>a</b>	3.89	<b>0.0487</b>
IC/NP	1.57 ± 0.13 <b>a</b>	0.91 ± 0.11 <b>b</b>	9.05	<b>0.0026</b>
C/NP	0.48 ± 0.14 <b>a</b>	0.24 ± 0.14 <b>b</b>	5.71	<b>0.0168</b>
C/IC	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26	0.6067

#### 4.4.2.3. Parámetros espermáticos

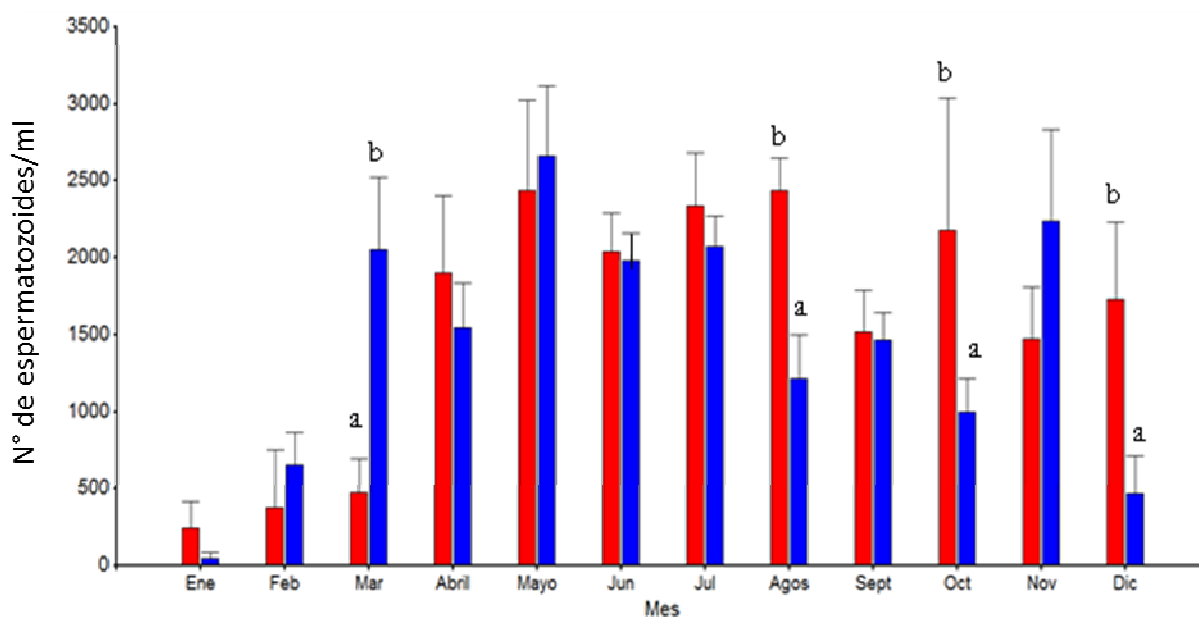
En cuanto al recuento espermático se registró interacción al comparar entre meses y sitios ( $F= 2.10$ ;  $p=0.0225$ ). Si bien este parámetro se mantuvo similar para ambos sitios durante los meses de mayo a agosto (ENR), al considerar los meses de ER (septiembre-abril) pueden registrarse marcadas diferencias entre ambos sitios (Fig. 4.8). En general, se observa un mayor recuento en individuos recolectados en el sitio contaminado en comparación con el sitio de



referencia. Estas diferencias fueron significativas para los meses de agosto, octubre y diciembre. Sin embargo en el mes de marzo el mayor recuento fue registrado en RY.

La tabla 4.3 muestra los valores de viabilidad y motilidad espermática obtenidos en machos recolectados en cada sitio durante los 12 meses de muestreo. En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos móviles e inmóviles, no se observó interacción entre sitio y mes de muestreo (VM:  $F=1.70$ ,  $p=0.08$ ; VI:  $F=2.35$ ,  $p=0.12$ ). Si en cambio, esta fue observada para el porcentaje de espermatozoides muertos ( $F=3.44$ ,  $p=0.003$ ). Al comparar los diferentes meses, si bien en muchos casos las diferencias no fueron significativas, se observa en general en RP un mayor porcentaje de espermatozoides muertos.

Con respecto a la motilidad espermática se registró interacción entre sitio y mes de muestreo tanto para la VSL ( $F=15.23$ ,  $p<0.0001$ ) como para la VCL ( $F=14.26$ ,  $p<0.0001$ ), observándose las principales diferencias en los meses de ENR, siendo la velocidad de los espermatozoides mayor para el sitio contaminado.



**Fig. 4.8.** Variación anual del recuento espermático (número de espermatozoides/ $\mu$ l de muestra) registrado en machos de *J. multidentata* recolectados en el sitio de referencia (barras azules) y el sitio contaminado (barras rojas).

Al agrupar los valores espermáticos de acuerdo a la época reproductiva (ER) y no reproductiva (ENR), puede observarse que del total de individuos recolectados para ambos sitios durante la ER, en un 37% de los individuos en RY y un 34% en RP no se extrajo muestra de

esperma en comparación con un 5% y 9% respectivamente durante la ENR. En la tabla 4.4 se muestran los valores de los distintos parámetros espermáticos de acuerdo a la época reproductiva analizada. En relación al recuento espermático, no se registró interacción entre sitio y época de muestreo ( $F=0.71$ ;  $p=0.4002$ ). Asimismo, no se observaron diferencias significativas al comparar ambos sitios de muestreo ( $F= 0.12$ ;  $p=0.7242$ ). Contrariamente, se registró un aumento significativo en el recuento durante la ENR ( $2280 \text{ cél}/\mu\text{l} \pm 115$ ) en comparación con la ER ( $1833 \text{ cél}/\mu\text{l} \pm 113$ ) ( $F=4.34$ ;  $p=0.0386$ ).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos móviles (VM) e inmóviles (VI) sólo se registraron diferencias significativas al considerar por época de muestreo ambos sitios de manera conjunta (VM:  $F=11.17$ ,  $p=0.0010$ ; VI:  $F=4.86$ ;  $p= 0.0288$ ) presentando los peces recolectados en la ER un menor porcentaje de espermatozoides VM y VI ( $72.40\% \pm 1.67$  y  $16.08 \pm 1.15$  respectivamente) en comparación con la ENR ( $79.44\% \pm 1.28$  y  $12.52\% \pm 1.11$ ). Al comparar ambos sitios o bien al considerar la interacción entre ambos no se observaron diferencias significativas para los porcentajes de VM ( $F=0.87$ ;  $p=0.3520$  y  $F=0.04$ ;  $p= 0.8429$  respectivamente) y VI ( $F=0.22$ ;  $p=0.64$  y  $F= 0.42$ ;  $p= 0.5171$ ).

Con respecto al porcentaje de espermatozoides muertos se registró una interacción significativa entre sitio y época de muestreo ( $F=1.85$ ;  $p= 0.1752$ ), observándose un menor porcentaje de espermatozoides muertos en machos recolectados en RY durante la ENR. Asimismo, se registró un efecto significativo del sitio de muestreo sobre el porcentaje de espermatozoides muertos (M) ( $F=4.47$ ;  $p= 0.0361$ ), registrándose un mayor valor en RP ( $11.15\% \pm 1.05$ ) en comparación con el sitio de referencia ( $8.06\% \pm 1.32$ ). También se observó un efecto significativo de la época de muestreo (considerando ambos sitios en conjunto) ( $F=9.94$ ;  $p=0.0019$ ), siendo el porcentaje de espermatozoides muertos mayor durante la ER ( $11.80\% \pm 2.01$ ) en comparación con la ENR ( $8.04\% \pm 1.07$ ).

Finalmente en cuanto a la motilidad, las diferencias más marcadas se observaron en los meses de ENR, donde los mayores valores de velocidad lineal y curvilínea se evidenciaron en el sitio contaminado

**Tabla 4.3.** Porcentajes de viabilidad espermática obtenidos a lo largo de un ciclo anual en machos de *J. multidentata* recolectados en un sitio contaminado (RP, Río Primero) y sitio control (RY, Río Yuspe).

Meses	% VM		% VI		% M		VL		VCL	
	RY	RP	RY	RP	RY	RP	RY	RP	RY	RP
<b>Enero</b>	38.09 ± 0.0 *	74.65 ± 17.85	28.58 ± 0.0*	21.99 ± 19.08	33.33 ± 0.0* <b>c</b>	3.37 ± 2.09 <b>a</b>	91.58 ± 26.36	113.87± 7.64	95.20±28.30	117.26 ± 9.12
<b>Febrero</b>	65.91 ± 10.89	62.64 ± 0.0*	17.61 ± 5.55	26.37 ± 0.0*	16.48 ± 9.05 <b>a</b>	10.99 ± 0.0* <b>a</b>	127.06± 26.36 <b>b</b>	111.32 ± 8.96 <b>a</b>	132.82± .72 <b>b</b>	105.04±23.45 <b>a</b>
<b>Marzo</b>	76.51 ± 14.40	67.09 ± 13.61	16.73 ± 13.65	13.36 ± 6.39	6.76 ± 3.34 <b>a</b>	19.55 ± 9.28 <b>b</b>	58.73 ± 12.77 <b>c</b>	109.03±3.42 <b>a</b>	60.53±11.89 <b>c</b>	113.41 ± 0.98 <b>a</b>
<b>Abril</b>	76.48 ± 11.40	69.12 ± 17.85	15.87 ± 9.86	23.98 ± 13.06	7.65 ± 3.71 <b>a</b>	6.90 ± 6.49 <b>a</b>	113.07± 12.37	97.68±19.54	115.75±14.1	98.97± 19.36
<b>Mayo</b>	80.47 ± 12.12	80.78 ± 6.70	14.45 ± 12.75	9.09 ± 3063	5.07 ± 4.42 <b>a</b>	10.13 ± 5.52 <b>a</b>	60.24 ± 12.14 <b>c</b>	109.28± 11 <b>a</b>	65.40±12.14 <b>c</b>	111.36± 12.0 <b>a</b>
<b>Junio</b>	86.30 ± 10.16	77.98 ± 11.85	9.03 ± 9.99	14.36 ± 10.58	4.64 ± 2.47 <b>a</b>	7.66 ± 4.07 <b>a</b>	61.92 ± 17.83 <b>c</b>	114.06±11.24 <b>a</b>	65.38±17.76 <b>c</b>	115.56± 11.81 <b>a</b>
<b>Julio</b>	71.70 ± 13.71	76.67 ± 14.32	20.02 ± 13.72	11.63 ± 10.01	8.27 ± 7.14 <b>a</b>	11.74 ± 8.75 <b>a</b>	96.45 ± 11.03	102.1± 15.31	97.69 ± 8.50	105.06± 12.48
<b>Agosto</b>	80.84 ± 8.02	78.34 ± 11.76	12.50 ± 8.22	9.72 ± 5.55	6.67 ± 3.63 <b>a</b>	11.93± 7.94 <b>a</b>	60.84 ± 11.84 <b>c</b>	100.4 ± 17.23 <b>a</b>	65.48±13.17 <b>c</b>	103.5 ± 16.88 <b>a</b>
<b>Septiembre</b>	77.03 ± 13.64	84.29 ± 7.68	11.44 ± 8.92	8.03 ± 3.93	11.53 ± 8.24 <b>a</b>	7.66 ± 4.93 <b>a</b>	94.79 ± 9.32	103.25 ± 14.65	96.34 ± 17.00	107.41 ± 19.00
<b>Octubre</b>	70.52 ± 13.03	49.26 ± 22.60	18.89 ± 8.53	18.97 ± 6.41	14.02 ± 12.16 <b>a</b>	31.79 ± 36.21 <b>a</b>	101.51 ± 8.31	114.27± 8.72	104.7 ± 5.32	117.8 ± 14.59
<b>Noviembre</b>	74.46 ± 12.90	78.84 ± 4.39	14.96 ± 10.50	9.23 ± 5.51	10.58 ± 5.77 <b>a</b>	12.33 ± 4.84 <b>a</b>	122.72 ± 2.20 <b>b</b>	102.97± 9.11 <b>a</b>	125.14±4.69 <b>b</b>	105.62± 7.63 <b>a</b>
<b>Diciembre</b>	59.62 ± 23.7	47.0 ± 18.72	13.69 ± 7.58	33.94 ± 15.06	26.68 ± 16.14 <b>c</b>	19.06 ± 4.46 <b>b</b>	102.25 ± 1.35	104.46±18.45	104.39± 11.1	109.2 ± 8.75 <b>a</b>

\*Muestra obtenida de un unico ejemplar

**Tabla 4.4.** Parámetros espermáticos analizados a lo largo de un ciclo anual. Referencias: **ER:** época reproductiva; meses enero a abril y septiembre a diciembre; **ENR:** época no reproductiva; meses de mayo a agosto; Recuento espermático (cél/ $\mu$ l) **VL:** velocidad lineal ( $\mu$ m/seg); **VCL:** velocidad curvilínea ( $\mu$ m/seg); **LIN:** porcentaje de linealidad; **VM:** porcentaje de espermatozoides vivos móviles; **VI:** porcentaje de espermatozoides vivos inmóviles y **M:** porcentaje de espermatozoides muertos.

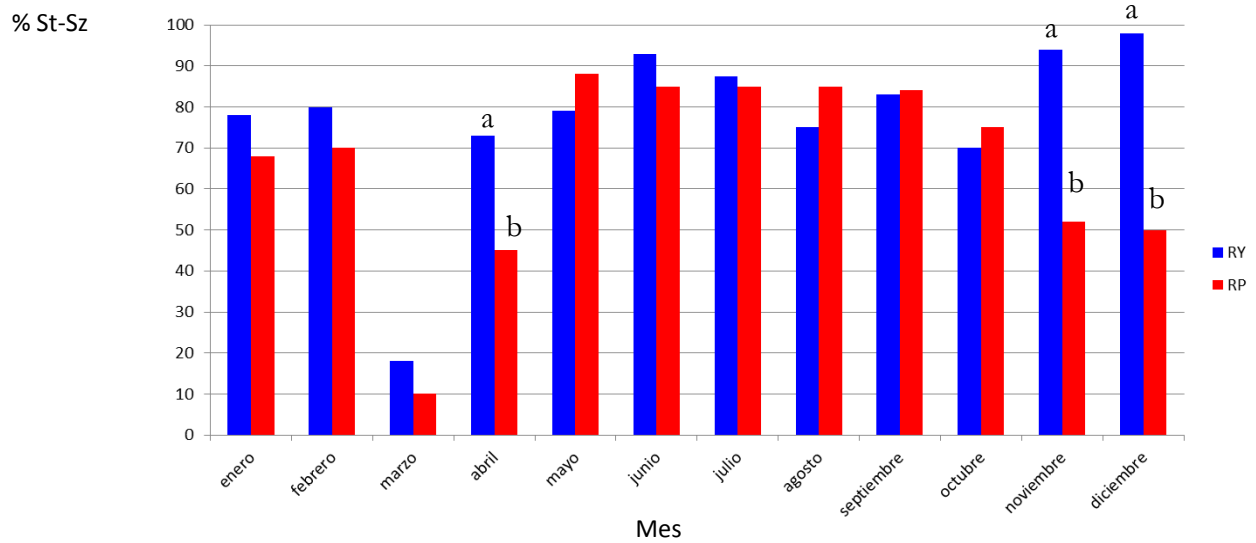
Variables	ER		ENR		F	p
	RY	RI	RY	RP		
<b>Recuento</b>	1874 $\pm$ 206	1547 $\pm$ 352	2281 $\pm$ 168	2080 $\pm$ 202	34.86	<0.001
<b>VL</b>	101.59 $\pm$ 31.11 <b>a</b>	107.64 $\pm$ 17.42 <b>a</b>	62.47 $\pm$ 15.74 <b>b</b>	106.93 $\pm$ 14.34 <b>a</b>	10.85	0.0235
<b>VCL</b>	105.05 $\pm$ 5.85 <b>a</b>	111.91 $\pm$ 8.10 <b>a</b>	66.50 $\pm$ 15.89 <b>b</b>	108.65 $\pm$ 14.84 <b>a</b>	12.56	0.0187
<b>LIN</b>	99.57 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	99.81 $\pm$ 0.56	0.15	0.786
<b>VM</b>	73.57 $\pm$ 4.96 <b>a</b>	65.95 $\pm$ 5.58 <b>a</b>	80.68 $\pm$ 4.86 <b>a</b>	78.23 $\pm$ 6.08 <b>a</b>	0.04	0.8429
<b>VI</b>	15.97 $\pm$ 1.34 <b>a</b>	18.26 $\pm$ 2.09 <b>a</b>	13.44 $\pm$ 1.81 <b>a</b>	11.62 $\pm$ 1.66 <b>a</b>	0.34	0.5626
<b>M</b>	10.45 $\pm$ 1.19 <b>a</b>	12.17 $\pm$ 1.84 <b>a</b>	5.85 $\pm$ 1.07 <b>b</b>	10.16 $\pm$ 1.13 <b>a</b>	9.94	0.0019

4.4.2.4. Análisis histológico

En los testículos de individuos provenientes de ambos sitios de muestreo se observaron estadios primordiales a lo largo de todo el ciclo anual, en un porcentaje siempre inferior al 5%; siendo los estadios maduros de desarrollo (St y Sz) los que en general prevalecieron (Fig. 4.9). Sólo se registraron diferencias significativas en el porcentaje de cistos maduros entre ambos sitios en los meses de abril, noviembre y diciembre, observándose una disminución significativa en los peces recolectados en el sitio contaminado. Al agrupar por épocas (tabla 4.5), puede observarse que durante la ER (meses de noviembre a abril), el porcentaje de estadios maduros disminuyó significativamente en peces recolectados en el sitio contaminado.

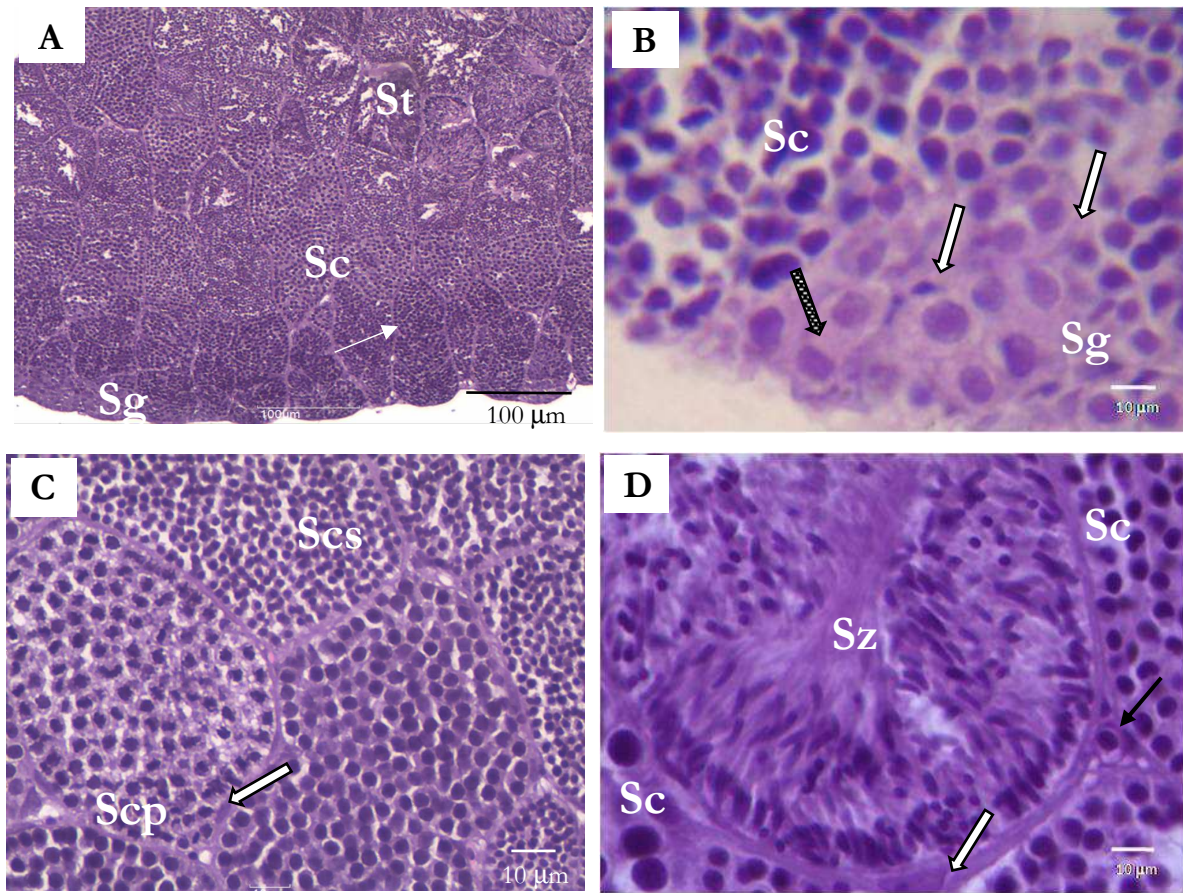
**Tabla 4.5.** Porcentaje de espermatidas y espermatozoides (estadios tardíos) registrados en testículos de peces recolectados en Río Yuspe y Río Primero agrupados según la época reproductiva (ER) y época no reproductiva (ENR) durante un año. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0.005).

Sitio	Época	Espermatidas y Espermatozoides (%)
Río Yuspe	Reproductiva	75.04 $\pm$ 3.4 <b>a</b>
	No reproductiva	83.21 $\pm$ 3.5 <b>a</b>
Río Primero	Reproductiva	58.22 $\pm$ 7.6 <b>b</b>
	No reproductiva	85.35 $\pm$ 2.3 <b>a</b>

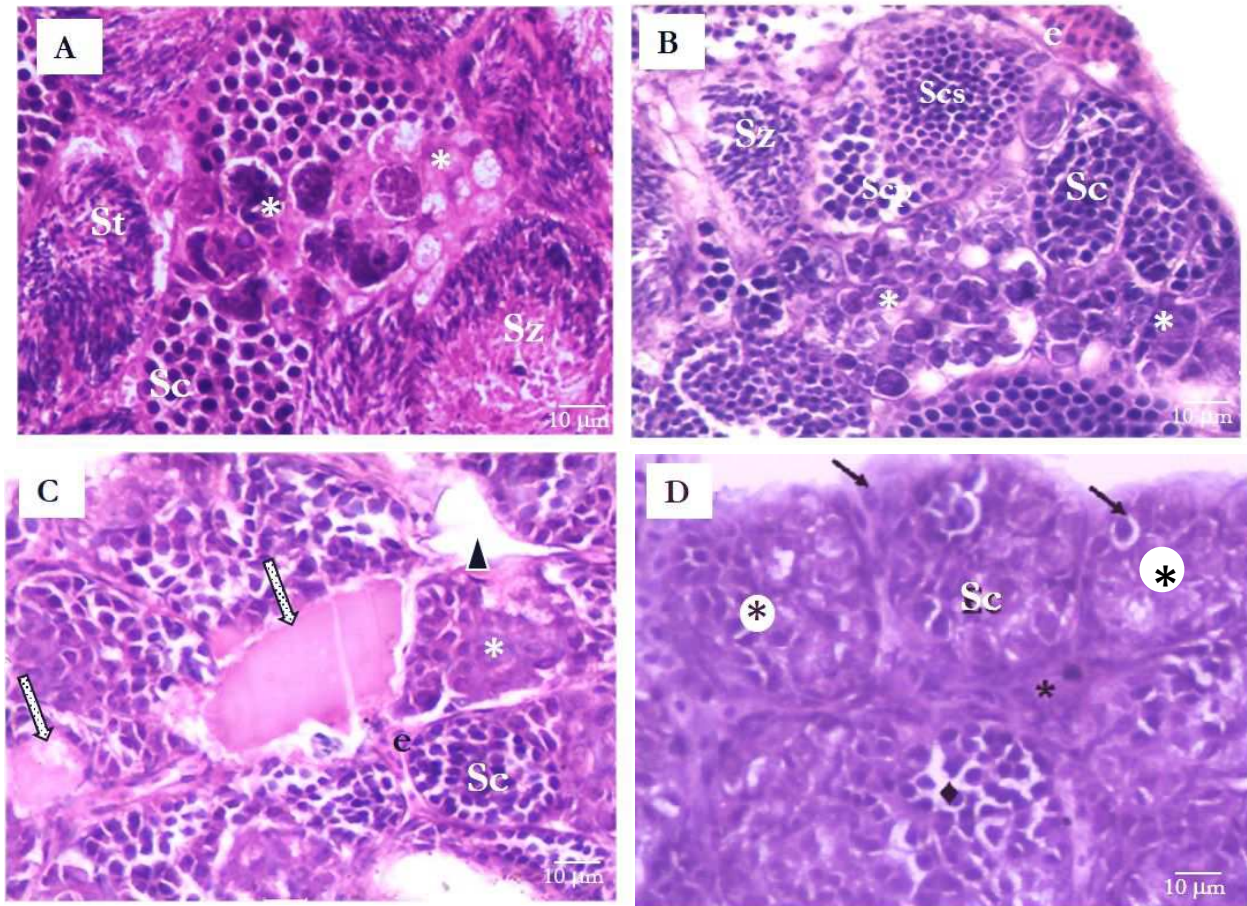


**Fig. 4.9.** Variación del porcentaje de estadios espermatogénicos maduros durante un ciclo anual en los sitios de muestreo Río Primero (barras rojas) y Río Yuspe (barras azules). Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios.

En la figura 4.10 se observan cortes histológicos de testículos provenientes del sitio de referencia. En general los límites de los cistos estuvieron bien definidos, no observándose alteraciones histológicas de relevancia. Sólo se registraron de manera aislada focos necróticos y fibrosis en los meses de junio a noviembre. Las gónadas de peces provenientes del sitio contaminado mostraron por el contrario, diversas alteraciones histológicas en todos los meses de muestreo (Fig. 4.11). Entre los principales daños a nivel tisular pueden citarse: alteraciones a nivel de las Sg tales como formación de sincitios, vacuolización y formación de acúmulos celulares; desorganización de los cistos (mezcla de cistos en diferentes estadios celulares), desincronización de la espermatogénesis dentro de los cistos (presencia de células en distinto estado de desarrollo, por ejemplo formación del flagelo de las St con el núcleo sin arriñonar), y finalmente pérdida de estructura de los cistos. Además, se registraron focos necróticos y fibrosis durante los meses de diciembre a mayo, período de gran actividad reproductiva.



**Fig. 4.9.** Cortes histológicos de testículos de machos de *J. multidentata* recolectados en el Río Yuspe donde puede observarse **(A)** estructura general del testículo (magnificación 100x); **(B)** cistos de espermatogonias y espermatocitos con estructura definida (magnificación 1000x); **(C)** grupo de Sc (magnificación 400x); **(D)** cisto conteniendo espermatozoides (magnificación 1000x). Referencias: **Sg:** espermatogonias; **Sc:** Espermatocitos; **Scp:** espermatocitos primarios, **Scs:** espermatocitos secundarios; **St:** espermátidas; **Sz:** espermatozoides. Flecha delgada negra indica célula de Leydig; flecha blanca borde negro señala célula de Sertoli; flecha punteada indica mitosis celular; flecha delgada blanca señala cisto bien definido.



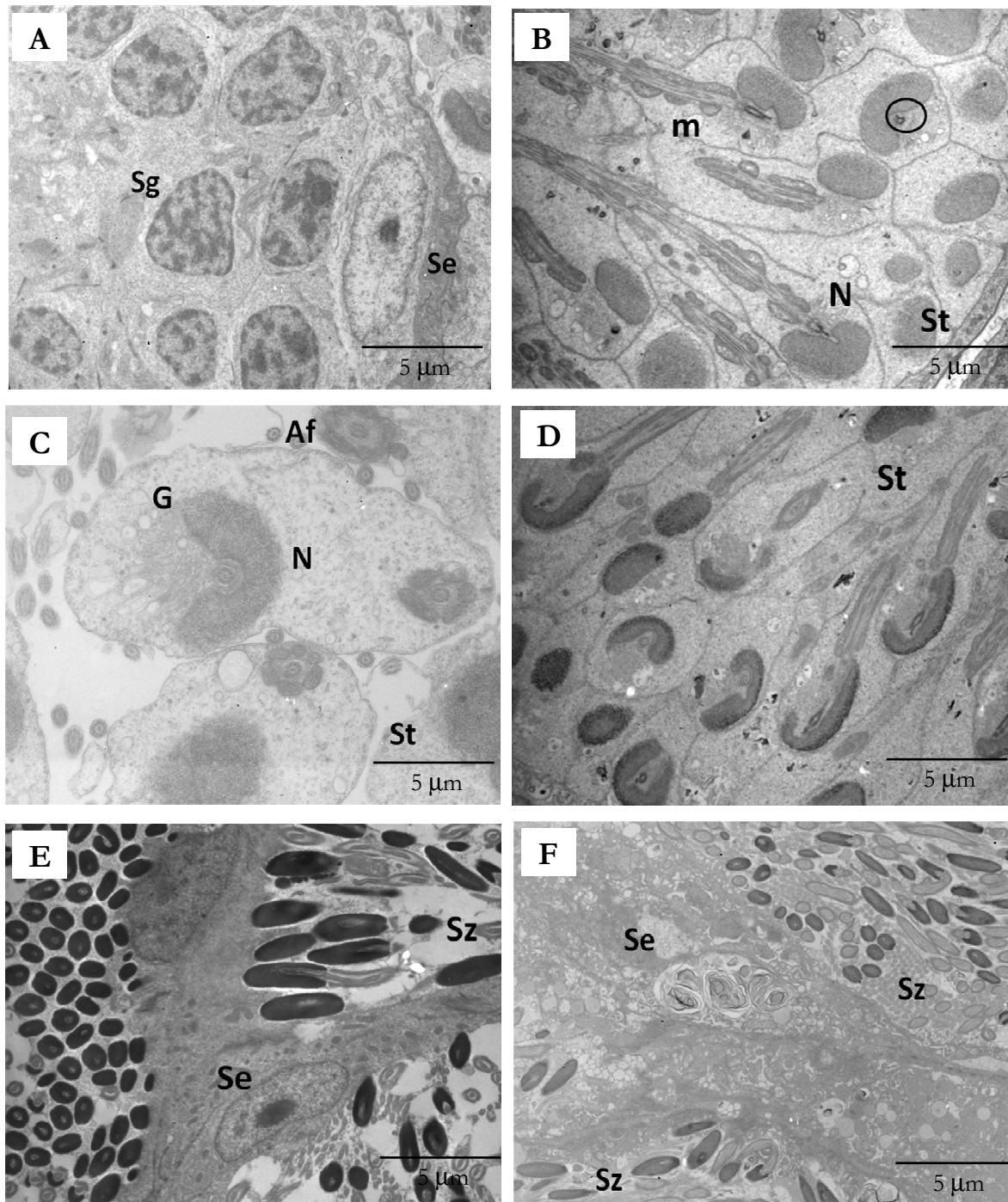
**Fig. 4.10.** Cortes histológicos de testículos de machos de *J. multidentata* recolectados en Río Primero donde puede observarse **(A-B)** células vacuolares, pérdida de estructura de los cistos (magnificación 400x); **(C)** presencia de necrosis en estadios primordiales, **(D)** Vacuolización generalizada en estadios primordiales. Todas las fotografías fueron tomadas a 400x de magnificación. Referencias: **Sc:** espermatocitos; **Sg:** espermatogonias, **St:** espermátidas; **Sz:** espermatozoides. Asteriscos indican vaoulización; triángulo y rombos: pérdida de conexión entre células; flecha negra: células con características anormales; flechas con punteado: necrosis.

#### 4.4.2.5. *Análisis ultraestructural del testículo*

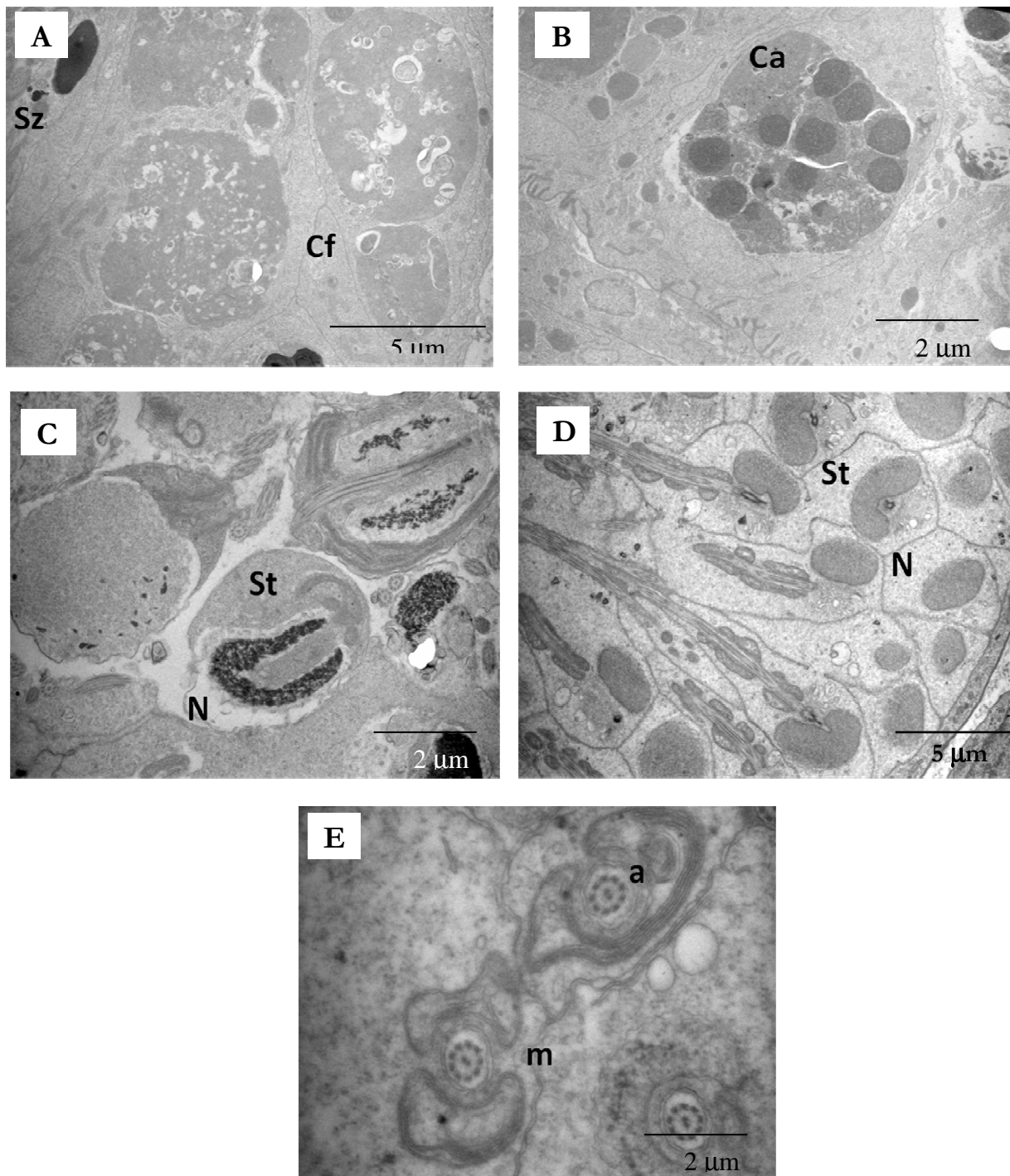
En peces provenientes del Río Yuspe, tanto durante la ER como ENR, el material se observó muy homogéneo sin alteraciones evidentes a nivel ultraestructural (Fig 4.11 A-E). El proceso de diferenciación espermátide-espermatozoide ocurrió de manera organizada y sincronizada: un arriñonamiento del núcleo con la consiguiente ubicación del aparato de Golgi cercano al mismo y la formación del complejo centriolar, seguido por la inserción del aparato flagelar. Se pudo divisar la fusión de mitocondrias durante la formación de la pieza media (Fig 4.11 B-D). En cistos que contienen espermatozoides, éstos se encontraron con las cabezas alineadas alrededor de la pared del cisto, estableciéndose un contacto directo entre la cabeza del espermatozoide y la célula de Sertoli (Fig. 4.11 E). A diferencia de la ENR, durante los meses de actividad sexual se observó una hipertrofia de las células de Sertoli, con una gran actividad fagocítica, en los estadios espermátogénicos más maduros (ST-SZ), lo que evidencia una intensa actividad espermátogénica (Fig 4.11 F).

Por el contrario en peces provenientes del sitio contaminado se evidenciaron numerosas alteraciones en gónadas tanto en la ER como ENR. La presencia de células de Sertoli hipertrofiadas en los últimos estadios celulares fue observadas con frecuencia. Durante la ENR se registró la presencia de abundantes fibroblastos y miofibroblastos encargados de reemplazar el el tejido estromal dañado, reflejando de esta manera la ocurrenciaa de injurias en el tejido espermátogénico que serían reemplazadas por este tejido estromal. Además se registraron alteraciones en el proceso de diferenciación espermátida-espermatozoide observándose que la vaina mitocondrial no se forma de manera completa con el consiguiente engrosamiento de las membranas mitocondriales, lo que indicaría importantes alteraciones a nivel de estas organelas. Se registró con frecuencia, la fagocitosis de cistos enteros y numerosos procesos apoptóticos, incluso dentro del túbulo colector (Fig. 4.12 A-C). Durante la ER se registraron estas mismas alteraciones sumado a una gran desorganización en el proceso de diferenciación de espermátide-espermatozoide, ya que se evidenciaron alteraciones durante la inserción del aparato flagelar, obervándose el núcleo que no llega a arriñonarse ni condensanrse de manera completa. Además se observan alteraciones en la formación del flagelo, principalmente durante la fusión de mitocondrias (formación de la pieza media) (Fig. 4.12 D-E).





**Fig. 4.11.** Análisis ultraestructural de testículo de *J. multidentata* provenientes del Río Yuspe tanto en época no reproductiva (ENR) (Fig. A-C) como reproductiva (ER) (Fig. D-F). Referencias: **G**: Aparato de Golgi; **m**: mitocondias; **N**: núcleo; **Se**: Célula de Sertoli; **Sg**: Espermatogonias; **St**: espermatídes; **Sz**: espermatozoides. Con círculo se señala el complejo centriolar y con asterisco elementos fagocitados por Célula de Sertoli. Todas las fotografías fueron obtenidas a 4600x.



**Fig. 4.12.** Testículo de *J. multidentata* provenientes del Río Primero en época Reproductiva (a-b) y época No Reproductiva (c-e). Referencias: **a:** axonema; **Ca:** cuerpo apoptótico; **Cf:** cisto fagocitado; **m:** mitocondrias, **N:** núcleo; **Se:** Célula de Sertoli; **St:** espermátides; **Sz:** espermatozoides. Con círculo se señala el complejo centriolar y con asterisco elementos fagocitados por Célula de Sertoli. A: 6000x; B-C: 10000x; D: 4600x; E: 10000x

#### 4.5. DISCUSIÓN

Los ejemplos más claros de alteraciones reproductivas determinadas en especies silvestres han ocurrido en el ambiente acuático, lo que no es sorprendente, ya que numerosas descargas tanto de tratamiento de aguas residuales como industriales, son liberadas en estos tipos de ambientes. Estudios sistemáticos a campo han revelado claros ejemplos de alteraciones reproductivas en peces en diversos recursos hídricos a nivel mundial con contaminación antrópica e industrial (Jobling et al. 2002, Kidd et al. 2007, Scholz & Klüver 2008). El Río Suquía no es una excepción, ya que al igual que la mayoría de los ríos que atraviesan grandes ciudades, recibe contaminantes de diversa naturaleza, provenientes de diferentes fuentes. Estudios previos llevados a cabo por nuestro equipo de trabajo en esta cuenca, evidencian que el río presenta niveles de contaminación elevados desde hace más de 15 años (Bistoni et al., 1999, Pesce & Wunderlin 2000, Wunderlin et al. 2001, Hued & Bistoni 2005, Nimptsch et al. 2005, Contardo-Jara et al. 2009, Monferrán et al. 2011). En particular, este sistema es muy vulnerable a la contaminación debido a su flujo escaso, su variación estacional, y corto recorrido hasta su desembocadura en la Laguna Mar Chiquita (Wunderlin et al. 2001, Contardo-Jara et al. 2009). Gaiero et al. (1997) señalan la dificultad que presenta la cuenca para eliminar compuestos xenobióticos debido a la condición endorreica mencionada. Estudios previos han informado un deterioro importante en la calidad del agua, directamente relacionado con las descargas de efluentes pobremente tratados de la PTEBG, la cual ha sido señalada como la principal fuente de contaminación (Pesce & Wunderlin 2000, Contardo-Jara et al. 2009, Merlo et al. 2011, Monferrán et al. 2011).

En la presente tesis se pone de manifiesto que la calidad de agua de la cuenca del Río Suquía se vio fuertemente afectada luego de que este atravesase la ciudad de Córdoba. Estudios previos ya han informado una disminución importante en el valor del ICA, lo cual estuvo directamente relacionado con las descargas de efluentes pobremente tratadas de PTEBG, la principal fuente de polución del agua del Río Suquía (Pesce & Wunderlin 2000, Contardo-Jara et al. 2009). El valor del ICA registrado en este estudio para el sitio contaminado es aún más bajo que los reportados previamente, evidenciando el deterioro progresivo que este sistema acuático sufre con el paso de los años. Las concentraciones elevadas de bacterias coliformes totales registradas aguas abajo de la PTEBG reflejan la falta de un tratamiento adecuado de los efluentes cloacales. Cabe destacar que en el período 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 directamente al lecho del río sin previo tratamiento (Fuente La Voz del Interior 1/03/2012, 03/10/2012).

Es importante destacar en el sitio RP el marcado incremento en la concentración de nitratos y amonio en comparación con el sitio control. Se ha demostrado que altas concentraciones de nitratos alteran las concentraciones circulantes de esteroides sexuales (Hamlin et al. 2008). Edwards & Guillette (2007) observaron que machos de *G. holbrooki* recolectados en lagos contaminados con nitratos presentaron un menor recuento espermático y alteraciones en el gonopodio. Se conoce que el nitrato se transforma in vivo en óxido nítrico, y este compuesto puede interferir con varias enzimas P450, esenciales para la producción y remoción de hormonas esteroideas en circulación, al unirse al grupo hemo (Ducsay & Myers 2011).

Es de destacar que una notable disminución en las concentraciones de oxígeno fueron registradas para el sitio contaminado. Se sabe que los bajos niveles de oxígeno son un factor limitante para que las especies puedan sobrevivir. *J. multidentata* posee adaptaciones que le permiten subsistir en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno, como la boca de posición superior, lo que le permite obtener oxígeno de las capas más superficiales, donde la concentración de este gas es mayor (Tagliani et al. 1992). Si bien esto posibilita la presencia de esta especie en este tipo de hábitat, la abundancia de la misma disminuye marcadamente con respecto al sitio de referencia. Se ha comprobado a campo y laboratorio los efectos negativos de la hipoxia sobre el crecimiento gonadal, que se ven reflejados en una disminución en el IGS (Scholz & Klüver 2008).

En el sitio de referencia se registraron dos picos de incremento en el IGS durante la ER. Esto concuerda con lo registrado en la especie vivípara *Poecilia latipinna* donde se han documentados dos picos reproductivos al comenzar y al finalizar el verano (Snelson 1984). Al comparar entre ambos sitios de muestreo, en el presente estudio en general los valores de IGS fueron menores en el sitio contaminado en comparación con el sitio control, siendo esta diferencia significativa para algunos de los meses muestreados. Se sabe que cambios en el valor del IGS representan respuestas tóxicas sistemáticas en sitios con elevada contaminación. Biomarcadores moleculares y bioquímicos, tales como la inducción de la vitelogenina han sido asociados con cambios en el IGS y otras alteraciones gonadales en machos, indicando que desórdenes gonadales están relacionados con interferencias en el sistema endocrino (Tyler et al. 1998, Scholz & Mayer 2008). Rautenberg et al. (2014) registraron en la cuenca del Río Suquía modificaciones en los niveles de vitelogenina e IGS en el sitio RP. Al igual que en el presente estudio, una reducción en el IGS ha sido registrado en peces, por diversos autores, en sitios con contaminación cloacal, a saber: *Microgans tomcod* recolectados en estuarios del Golfo St. Lawrence, de California EE.UU (Coullard et. 1999), en *Cyprinus carpio* en Río Ebro, España (Lavado et al. 2004), en *Abramis*

*abramis* en río Domme, Bélgica Vethaak et al. 2005), *Acipenser transmontanus* en Río Columbia, EE.UU (Feist et al. 2005); en *G. holbrooki* en ríos de Florida con contaminación por papeleras (Orlando et al. 2007) y en *Oreochromis mossambicus* capturados en Sudáfrica (Marchand et al. 2008).

Por otro lado, en ambientes contaminados por efluentes cloacales, se señala la modificación del comienzo y duración del ciclo reproductivo debido a la presencia de hormonas y de numerosos compuestos químicos que mimetizan la acción hormonal y que pueden producir alteraciones endocrinas (Van der Kraak 1998, Desbrow et al. 1998, Nichols 1999, Kime 1999, Jobling et al. 2002). Si bien nuestros resultados muestran que el patrón de variación del IGS es similar en ambos sitios de muestreo, se observa un desfase en el incremento de este valor en el sitio contaminado durante los primeros meses de año. Un resultado similar fue obtenido por Bianco (2012) al analizar hembras de *J. multidentata* durante el mismo período en ambos 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 RP ocurre un mes después que en el sitio control. Además, el mismo autor registró la presencia de embriones en el lumen ovárico con un mes de retraso con respecto en sitios contaminados respecto a sitio de referencia.

Valores anormales de los índices órgano-somáticos también son asociados a la exposición a contaminantes, especialmente PEs, capaces de modificar el peso del hígado como consecuencia de aumento en la actividad de las enzimas metabólicas o de la interferencia con la regulación hormonal de los órganos reproductivos (Sloof et al. 1983, Kime 1997). A lo largo del muestreo sólo se registró una disminución significativa en el factor de condición (K) en los primeros tres meses de muestreo en peces recolectados en el sitio contaminado. Se cree que esto podría estar relacionado con un aumento en la concentración de contaminantes por el bajo caudal del río debido a la marcada sequía que se registró en la provincia de Córdoba para esos meses, ya que ese año se vio alterado el ciclo hidrológico normal.

Debido a que el hígado es el principal órgano de detoxificación, un incremento en su tamaño puede ser una respuesta no específica a la exposición a tóxicos, inducida por un aumento en la demanda de actividad del órgano. En el presente estudio se registró un incremento significativo en el valor del IHS en la mayoría de los meses de muestreo en el sitio RP en comparación con RY. En concordancia con lo obtenido en el presente estudio, se ha detectado un IHS elevado en peces macho de *P. promelas* (Barber et al. 2007, Vajda et al. 2011) y *Platichthys flesus* (Lye et al. 1997) expuestos a efluentes de PTE. Un incremento en el IHS puede provocar un

funcionamiento alterado en el hígado e interferir con el estado general del pez (Mukherjee et al. 1991).

Con respecto al análisis del comportamiento reproductivo, es importante destacar que en el sitio de referencia, en todos los meses de muestreo los machos evidenciaron comportamiento sexual hacia la hembra. Esto no fue así para RP. Guyón et al (2013) registró en los mismos ejemplares recolectados para este sitio una disminución en los niveles de expresión de aromatas. Esto podría relacionarse con lo registrado en este estudio ya que se conoce el papel clave de esta enzima en el comportamiento sexual, reflejando esta disminución un claro ejemplo de los efectos de la contaminación sobre la reproducción de estos organismos.

El análisis del comportamiento sexual durante la ER arrojó que peces provenientes del RY presentaron una mayor actividad sexual (medida en función a las variables comportamentales) en comparación con el sitio contaminado. Esto demuestra que la contaminación antrópica no solo afecta la iniciación del comportamiento sexual, tal como se mencionó anteriormente, sino el desarrollo del mismo, disminuyendo por consiguiente las probabilidades de éxito reproductivo. Un estudio llevado a cabo por Toft & Guillete (2005) registraron que machos de la especie vivípara *G. holbrooki* provenientes de lagos contaminados con pesticidas presentaron alteraciones en el comportamiento asociado con el acto sexual en si (número de persecuciones y cópulas), pero no en el interés de los machos hacia las hembras.

Se conoce que la espermatogénesis en la especie *J. multidentata* es continua a lo largo del año (Martinez & Monasterio de Gonzo 2002), razón por la cual fue posible obtener muestras de esperma en la mayoría de los individuos en todos los meses del muestreo. Sin embargo en la ER se registró que en aproximadamente un 35% de los individuos no pudo obtenerse muestra de esperma, lo que podría deberse a la intensa actividad sexual y por lo tanto a un mayor gasto espermático.

A diferencia de otros estudios, no se detectaron diferencias significativas en el recuento espermático al comparar ambos sitios de muestreo (Jobling et al. 2002, Vajda et al. 2011). Es de destacar, sin embargo, que en el sitio contaminado se observó un mayor porcentaje de espermatozoides muertos, lo que indicaría un posible efecto de la contaminación sobre la viabilidad espermática, que podrían relacionarse con las alteraciones ultraestructurales detectadas en gónadas, principalmente en el proceso de diferenciación espermática-espermatozoides.

En la presente tesis se registró en peces provenientes del sitio de referencia una mayor velocidad lineal y curvilínea de los espermatozoides durante los meses de ER, disminuyendo esta en la ENR. Resultados similares fueron observados por Alavi et al. (2010) en la especie *Perna*

*fluvialilis*. Una disminución en la concentración de esperma y del porcentaje de motilidad hacia el final del período reproductivo también ha sido reportado en muchos peces teleósteos como en *Scophthalmus maximus* (Suquet et al. 1998), *Gadus morhua* L. (Rouxel et al. 2008), *Oncorhynchus mykiss* (Munkittrick & Moccia 1987), *Hippoglossus hippoglossus* (Babiak et al. 2006), y *Barbus barbus* (Alavi et al. 2008). Estos autores relacionan esta disminución de la velocidad con un proceso de envejecimiento celular que incluiría cambios en la morfología de los espermatozoides, una disminución en el ATP (necesario para el movimiento) o debido a cambios en la osmolaridad del líquido seminal.

Sin embargo al comparar con el sitio contaminado, los individuos provenientes de RP presentaron en general una mayor velocidad de los espermatozoides en comparación con el sitio de referencia, donde además no se registró una marcada disminución de la velocidad en la ENR.

En el laboratorio si bien, en general, se ha reportado que la exposición a compuestos estrogénicos produce una disminución de la velocidad de los espermatozoides (Haubruge et al. 2000, Schoenfuss et al. 2002), en algunos compuestos (como en el caso del EE<sub>2</sub>) se ha reportado un incremento en este parámetro espermático a concentraciones entre 60-480 µg/L durante 21 días (Hashimoto et al. 2009). Sin embargo a campo los resultados son contradictorios. Aunque algunos autores no han encontrado diferencias significativas en la velocidad de los espermatozoides en peces recolectados en sitios contaminados (Gill et al. 2002, Schoenfuss et al. 2002) otros registraron un incremento en la velocidad, al igual que en el presente trabajo. Un estudio llevado a cabo por Kleinkauf et al (2004) en la especie *Platichthys flesus* en dos estuarios de Inglaterra, uno de ellos con elevada contaminación antropogénica, registró en el sitio contaminado un incremento en la VCL (114 vs 92 µm/s) y en la VL (58 vs 49) de los espermatozoides en comparación con el sitio de referencia, aunque los autores no supieron explicitar claramente las causas de este fenómeno.

La inconsistencia de resultados entre el campo y laboratorio reflejan la complejidad de la exposición a un cóctel de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Hay muchos factores que interactúan que podrían influir en la forma en que los machos invierten su producción de esperma. Se ha propuesto que peces provenientes de sitios contaminados probablemente experimenten una mayor competencia espermática y por lo tanto es posible que se favorezca la producción de una mayor cantidad de espermatozoides o bien al incremento en velocidad de los mismos (Parker 1990, Ball & Parker 1996, Stockley et al. 1997, Sopinka 2010). Miura et al. (1992) demostró que la hormona 7 $\alpha$ ,20-dihydroxy-4-pregnenolona incrementa el pH de los ductos espermáticos, que elevarían los niveles de AMPc dentro de los espermatozoides, aumentando así la

velocidad de los mismos. Sopinka (2010) postuló que estas mismas vías podían activarse en los sitios contaminados.

Jobling et al. (2002) observaron un incremento significativo en el porcentaje de estadios maduros en la especie *Rutilus rutilus* en sitios con marcada contaminación antropogénica. Este registro no coincide con lo evidenciado en el presente trabajo ya que si bien en general el porcentaje de estadios maduros (St-Sz) fue similar en ambos sitios de muestreo, se registró un menor porcentaje en peces recolectados en el sitio contaminado en los meses de abril, noviembre y diciembre (ER), lo que podría indicar alteraciones a nivel de la espermatogénesis. Es conocido que los esteroides sexuales tienen un efecto directo sobre el desarrollo de las células germinales y la exposición a xenoestrógenos pueden redireccionar el desarrollo e incluso provocar una reversión sexual (Devlin & Nagahama 2002). Esta disminución en el porcentaje de cistos en este estadio podría relacionarse con la desincronización observada en el proceso de diferenciación St-Sz, en individuos recolectados en el sitio contaminado.

En cuanto al análisis cualitativo de gónadas, si bien en el sitio de referencia se registraron a nivel de microscopía óptica algunas alteraciones tales como como vacuolización de las células germinales, desorganización de la estructura del tejido y alteraciones en las Sg y Sc, la frecuencia y magnitud de las alteraciones histológicas registradas fueron siempre inferiores en comparación con el sitio contaminado. Las lesiones más comunes registradas en RP incluyeron desorganización del tejido testicular, alteraciones severas en las Sg y Sc tales como vacuolización de las células germinales, formación de sincitios, acúmulos celulares y numerosos focos necróticos. Alteraciones similares fueron detectadas en machos de *C. carpio* (Lavado et al. 2004) y *C. carassius* (Diniz et al. 2005) colectados en sitios cercanos a PTE. Estos autores establecen una directa relación entre estas alteraciones con la presencia de contaminantes xenoestrogénicos, los cuales afectan directa o indirectamente procesos de división y/o diferenciación celular.

El análisis ultraestructural de los testículos en ejemplares pertenecientes al sitio de referencia no evidenciaron alteraciones de relevancia. En cambio en los peces recolectados en RP se observaron con frecuencia células lisadas, correspondientes a la vacuolización observada al microscopio óptico. En este mismo sitio, durante la ENR se registró la presencia de numerosos fibroblastos y miofibroblastos que estarían indicando injurias o procesos posteriores a la necrosis y diversas alteraciones en el proceso de diferenciación St-Sz que podrían correlacionarse con el mayor porcentaje de espermatozoides muertos registrados durante esta época.

Si bien diversos autores han observado ovocitos en testículos de distintas especies de peces a saber, en *Scaphirhynchus platyrhynchus* (Harshbarger et al. 2000); *Pluronectes yokohamae* (Hashimoto et



al. 2000); *Morone americana* (Kavanagh et al. 2004); *Smallmouth bass* (Blazer et al. 2007), esta alteración no fue evidenciada en nuestro estudio.

El presente capítulo demuestra claramente el efecto de la contaminación antropogénica sobre diversos biomarcadores reproductivos de la especie autóctona *J. multidentata*. Si bien a lo largo del muestreo anual pudieron extraerse ejemplares en RP, los esfuerzos de muestreo fueron siempre mayores en este sitio en comparación con RY, lo que refleja claramente que la abundancia de esta especie es significativamente menor. De continuar las mismas condiciones, en breve tiempo la presencia de la especie *J. multidentata* se verá comprometida en la cuenca baja del Río Suquía.



## *CAPÍTULO V*

### *DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES*

## 5.1. Discusión General

La bibliografía referente al efecto de los PEs resalta el efecto adverso que tienen estos compuestos tanto en organismos adultos como en su progenie y las graves consecuencias ambientales que esto conlleva (WHO 2002, Edwards et al. 2006, Kidd et al. 2007, Scholz & Klüver 2009). Si bien, los PEs no provocan mortalidad inmediata, se ha demostrado que tienen la capacidad de bioconcentrarse y bioacumularse y afectar de esta manera la reproducción, lo que implica un claro impacto a nivel ecológico (Geyer et al. 2000).

Es conocido que los procesos fisiológicos involucrados en la reproducción de los organismos son hormona-dependiente. Por lo tanto, la presencia de PEs en el ambiente y la entrada de los mismos al organismo, produce una variedad de desórdenes en el desarrollo y la reproducción (WHO 2002, Edwards et al. 2006). Sobre 900 compuestos químicos que han demostrado ser PEs, al menos 200 de ellos presentan actividad estrogénica (Scholz & Klüver 2009). Entre los PEs, los estrógenos naturales y sintéticos han manifestado ser los compuestos más potentes tanto en estudios *in vitro* (Gutendorf & Westendorf 2001, Cargouët et al. 2004) como *in vivo* (Laws et al. 2000, Sumpter & Jobling 1995), provocando diversas alteraciones reproductivas que van desde aquellas que afectan la formación de gametas hasta el desempeño del comportamiento sexual de los individuos, lo que conlleva un claro impacto poblacional y ecológico.

En los peces, como en otros vertebrados, la diferenciación de células y tejidos en órganos (cómo las gónadas) con la estructura y capacidad propia de responder a señales internas y externas es controlada, en gran parte, por el eje hipotálamo-hipofisario (Ankley & Johnson 2004). Este sistema hormonal es capaz, al recibir las señales externas apropiadas, de generar un nuevo estado dinámico que resulta en el desarrollo de gametos viables y un comportamiento reproductivo adecuado, a fin de lograr la reproducción y la sustentabilidad de las poblaciones (Scholz & Mayer 2008). Los compuestos con capacidad xenoestrogénica interfieren en el equilibrio de este eje hipotálamo-hipofisario, produciendo una alteración en el mismo a diferentes niveles. La bibliografía describe interferencia con la síntesis, secreción y/o metabolismo de hormonas (Kime 1998, Tabb & Blumberg 2006), alteración en la unión de hormonas a receptores (Mills & Chichester 2005) y efectos sobre la expresión de la enzima citocromo P450 aromatasa (CYP19), vital para la diferenciación y el desarrollo normal sexual en peces (Waye & Trudeau 2011). El desarrollo gonadal (en embriones y juveniles) y la época

reproductiva se consideran los períodos más críticos donde los PEs pueden actuar (Ankley & Johnson 2004).

En países del hemisferio Norte se han evaluado los riesgos ambientales de diversos compuestos químicos (pesticidas, químicos, medicamentos) y en base a ello se ha regulado su uso (EMEA/CHMP, 2006, Unión Europea 1997-2006). Esto no sucede en países del hemisferio Sur, donde en general la regulación de estos productos no está delimitada, y en muchos casos compuestos prohibidos en el hemisferio Norte aún continúan en uso, como es el caso del 4*n*-nonilfenol (4*n*-NP), un compuesto tensioactivo ampliamente utilizado como surfactante en pesticidas y productos de limpieza tanto en industrias como hogares domésticos.

En el presente trabajo se registró que la calidad de agua del Río Suquía se ve fuertemente afectada luego de que éste atraviesa la ciudad de Córdoba, situación que está siendo denunciada desde hace más de 15 años. Estudios previos han informado una disminución importante en el valor del índice de calidad de agua (ICA) en estos sitios, que ha sido relacionado directamente con las descargas de efluentes de la PTEBG, la principal fuente de contaminación del Río Suquía (Pesce & Wunderlin 2000, Contardo-Jara et al. 2009), sumado a los efluentes industriales y agroquímicos (Kruus et al. 1991, Cosavella et al. 2006, Bonansea et al. 2012).

En la presente tesis se planteó como objetivo evaluar la respuesta de diversos biomarcadores reproductivos en la fauna nativa frente a la exposición de compuestos con actividad estrogénica (E<sub>2</sub>, EE<sub>2</sub>, 4*n*-NP y MT), utilizando como especie bioindicadora al pez vivíparo *Jenynsia multidentata*. Para ello se expusieron machos adultos a diferentes concentraciones de xenoestrógenos bajo condiciones de laboratorio. Debido a que, extrapolar los resultados obtenidos en laboratorio al campo no es sencillo, se procedió a realizar muestreos en dos sitios de la cuenca del Río Suquía, uno de referencia y otro con marcada contaminación antropogénica, de manera de evaluar los mismos biomarcadores, para determinar si la contaminación antropogénica está afectando los parámetros reproductivos de las poblaciones silvestres. Es importante destacar que en este tipo de estudios los organismos difícilmente estén expuestos a un solo compuesto sino que, como es señalado por diversos autores, están frente a una compleja mezcla de contaminantes, los cuales pueden provocar efectos sinérgicos o antagónicos (Thorpe 2001, 2003, Silva et al. 2002, Sumpter 2003).

La especie íctica *J. multidentata* ha sido propuesta como una especie modelo en diversos estudios ecotoxicológicos (Cazenave et al. 2005, 2008, Ballesteros et al. 2007, 2009a, 2009b, Pesca et al. 2008, Amé et al. 2009, Monferrán et al. 2011, Hued et al. 2012, 2013, Maggioni et

al. 2012, Guyón et al. 2013). En coincidencia con ello, en el presente trabajo esta especie ha demostrado ser una excelente modelo para analizar los efectos de la contaminación por compuestos con actividad estrogénica, tanto en estudios en laboratorio como a campo.

A continuación se expondrán las consideraciones finales, atendiendo a cada biomarcador evaluado en esta tesis.

#### ❖ *Comportamiento reproductivo*

Las respuestas comportamentales son biomarcadores relevantes, ya que las mismas integran varios procesos bioquímicos, celulares y neuronales, involucran un complejo mecanismo de control regulado por el sistema endocrino y permiten relacionar las respuestas fisiológicas con cambios en el ambiente circundante (Vogl et al. 1999). El comportamiento constituye un importante biomarcador de efecto utilizado en ecotoxicología, ya que presenta la ventaja de ser no invasivo, por lo cual no es necesario sacrificar a los individuos en estudio. Diversos comportamientos en peces, no solo los relacionados con la actividad sexual, son afectados por la contaminación (Schramm et al. 2008) y se ha visto que en muchos casos los cambios comportamentales suceden a concentraciones inferiores a aquellas que producen alteraciones en otros biomarcadores (Scott & Sloman 2004, Sebire et al. 2009).

Dentro de los biomarcadores cuantificados en esta tesis, el comportamiento reproductivo fue el más sensible. Los análisis discriminantes realizados para los ensayos de E<sub>2</sub>, EE<sub>2</sub> y 4*n*-NP arrojaron como resultado que las variables comportamentales son las que mejor explicaron las diferencias entre grupos.

En los ensayos de laboratorio, los individuos manifestaron comportamiento sexual ante una hembra para la mayoría de los tóxicos analizados, por lo que se concluye que a las concentraciones utilizadas la iniciación de la actividad sexual no se veía afectada. Sin embargo, resultados opuestos se registraron para el EE<sub>2</sub>, donde se observó una disminución de hasta un 40% en la iniciación de dicha actividad. Por otra parte, es interesante destacar que en general en los individuos expuestos a xenoestrógenos fue necesario al menos realizar un recambio de la primera hembra para el inicio del comportamiento sexual.

En cuanto a las diferentes variables comportamentales, se observó una disminución de las mismas en individuos tratados tanto con EE<sub>2</sub> y 4*n*-NP, lo que refleja una menor eficacia sexual. El único caso donde se registró una exacerbación en las variables del comportamiento reproductivo (IC/TP; C/TP; IC/NP; C/NP) fue en la concentración más baja de E<sub>2</sub> (50 ng E<sub>2</sub>/L), mientras que en el tratamiento con MT, las concentraciones ensayadas no afectaron el desempeño de la actividad sexual.

Cuando se compara con la bibliografía, la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de xenoestrógenos en peces adultos provoca en general una reducción en el comportamiento sexual, siendo las alteraciones comportamentales similares para las distintas especies.

Como se discutió para cada compuesto en los bioensayos, los resultados comportamentales registrados en esta tesis pueden correlacionarse con los niveles de expresión de la enzima aromatasa cerebral (*cyp19a1b*), cuantificados en un estudio llevado a cabo de manera paralela, en los mismos individuos, donde una disminución en la expresión de esta enzima se vio correlacionada en una disminución de las variables comportamentales y viceversa (Guyón et al. 2013, Roggio et al. 2014b). Se conoce que este gen está fuertemente regulado por estrógenos (Le Page et al. 2006) y se ha visto que la exposición a xenoestrógenos incrementa su expresión (Mouriec et al. 2009). Una gran actividad de la enzima aromatasa en estado adulto es característica de peces (Lephart 1996), ya que en mamíferos solo se observa en embriones, donde está implicada en la sexualización del cerebro (Boon 2010).

Entre los vertebrados, los peces teleósteos exhiben características únicas en cuanto a su neurodesarrollo y sexualización cerebral. Tienen la propiedad de que su cerebro puede desarrollarse durante toda su vida, ya que los adultos conservan activos los precursores de la glía radial. Estas células son capaces de sufrir divisiones para formar nuevas neuronas (Pellegrini et al. 2007, Diotel et al. 2010). Los estrógenos y la enzima aromatasa son importantes en la regulación del desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la supervivencia de las células por fuera de este "cerebro reproductivo". Los estrógenos producidos localmente modulan las funciones de supervivencia neuronal. Por lo tanto, la alta actividad de aromatasa en el cerebro de peces adultos es compatible con su actividad neurogénica constante (Le Page 2010). Estudios actuales demuestran que los compuestos similares al estrógeno no sólo modulan la expresión y la actividad de la aromatasa en las células gliales radiales, sino también su proliferación (Pellegrini et al. 2014). Así, los xenoestrógenos tienen el potencial de perturbar la neurogénesis adulta, lo que significaría que la ventana crítica a través de la cuales los animales son altamente susceptibles a los PEs se extendería a lo largo de toda la vida de los peces.

En el estudio a campo el 90% de los peces recolectados en el sitio de referencia manifestaron comportamiento sexual frente a un hembra en comparación con el 55% del sitio contaminado. La misma tendencia se observa al considerar las variables comportamentales, donde los valores obtenidos fueron inferiores a las del sitio de referencia. Estos resultados

reflejan claramente un efecto deletéreo de la contaminación antropogénica sobre el comportamiento sexual.

#### ❖ *Variables espermáticas*

Las variables espermáticas respondieron de manera diferente de acuerdo al xenoestrógeno evaluado. El recuento espermático sólo disminuyó en determinadas concentraciones en machos expuestos a E<sub>2</sub> (50 ng/L) y 4*n*-NP (10 µg/L), mientras que la viabilidad solo se vio afectada a la concentración más alta de EE<sub>2</sub> (150 ng/L). La motilidad espermática solo fue afectada tras la exposición a 4*n*-NP, donde se registró un incremento en la velocidad en comparación con los controles. La exposición a MT no afectó ninguno de los parámetros espermáticos analizados.

Diversos trabajos señalan que los cambios en el recuento espermático pueden ser adjudicados a alteraciones estructurales registradas en gónadas, tales como desincronización de la meiosis, fagocitosis de cistos enteros (lo que es un indicador de algún problema en la división y/o diferenciación celular) o bien a nivel de las células de Sertoli (Christiansen et al. 1998; Kinnberg et al. 2000). En algunos ensayos se ha registrado un incremento de espermatozoides vivos inmóviles, que podría adjudicarse a alteraciones en la membrana mitocondrial observadas en el estadio de diferenciación espermátida-espermatozoide. En la presente tesis no se evaluó la duración de la motilidad, pero es probable que las alteraciones observadas en estas organelas (descriptas en el capítulo IIIA) puedan afectar este parámetro. Por otro lado en el único tratamiento en que se observó una variación en la velocidad de los espermatozoides fue con 4*n*-NP (en cuyo caso la misma se incrementó). Es probable que esta variación se deba más a un efecto tóxico del compuesto que a un efecto xenoestrogénico.

Si bien en la presente tesis no se determinó la duración total de la espermatogénesis para la especie en estudio, se cree que la disparidad de resultados observados en relación a los parámetros espermáticos se debe a que el ciclo espermatogénico para *J. multidentata* sería superior a 28 días, tal como se describe en especies emparentadas. Si tenemos en cuenta que la mayoría de los efectos de los PEs en gónadas se da en los estadios primordiales, 28 días de exposición no serían suficientes para visualizar cambios a nivel de las gametas.

A campo se observó en el sitio contaminado un mayor porcentaje de espermatozoides muertos, que podría relacionarse con las alteraciones ultraestructurales registradas en gónadas o efectos directos sobre la membrana celular. También fue registrada una mayor velocidad de los espermatozoides que podría deberse a efectos directos de los contaminantes sobre las gametas o sobre la esteroidogénesis o una adaptación de los individuos para garantizar una fertilización exitosa.

Son escasos los trabajos que evalúan la calidad de esperma tras la exposición a xenobióticos y ellos se han discutido en cada capítulo. En trabajos a campo se han registrado una disminución en la concentración de esperma así como también en diversos parámetros de motilidad, en peces recolectados en sitios contaminados en comparación con sitios de referencia (Aravindakshan et al. 2005). Por otro lado, en trabajos en laboratorio se ha registrado que peces expuestos a xenoestrógenos mostraron una disminución en la calidad del semen, ya que presentaron una menor densidad y motilidad espermática tanto en estudios *in vivo* (Lahnsteiner et al. 2005) como *in vitro* (Hatef et al. 2010). En mamíferos, estudios llevados a cabo en ratas durante la etapa embrionaria o en los primeros días luego del nacimiento evidenciaron que la exposición a xenoestrógenos reduce no solo el número de espermatozoides sino además la calidad espermática (Sharpe et al. 1995).

En humanos se ha visto que algunos xenobióticos pueden provocar efectos en el esperma al unirse a receptores de E<sub>2</sub> en la membrana plasmática, actuando como agonistas a la hormona endógena (Nadal et al. 2000), mientras que otros xenoestrógenos como los alquilfenoles actuarían probablemente a través de la unión a receptores nucleares (Luconi et al. 2001). En peces podría darse la misma situación ya que se ha visto que los xenoestrógenos pueden unirse tanto a receptores nucleares (Nagler et al. 2007) como en los de la membrana plasmática (Loomis & Tomas 2000)

#### ❖ *Índices somáticos*

Los índices somáticos son utilizados para evaluar el estado general de los peces, siendo los mismos afectados por una gran cantidad de factores tales como la edad, estado nutricional, la estación del año, época reproductiva, así como por una amplia variedad de tóxicos, aunque su respuesta no es específica frente a la exposición de algún determinado xenobiótico (Van der Oost et al. 2003).

Los índices somáticos K, IHS no evidenciaron marcados cambios frente a la exposición a compuestos estrogénicos en condiciones de laboratorio. De los tres índices somáticos evaluados, sólo el IGS mostró una disminución en peces expuestos a las concentraciones más altas de EE<sub>2</sub> (75 y 150 ng/L) y a todas las concentraciones de 4*n*-NP (1 y 10 µg/L), en concordancia con lo descrito para otras especies (Jobling et al. 1996, Schultz et al. 2003, Velasco-Santamaría et al. 2010). Ésto posiblemente se deba a la potencia estrogénica de estos compuestos

Al analizar la respuesta de los índices somáticos a campo, el K no mostró marcadas diferencias entre los dos sitios de estudio, ya que sólo en pocos meses se obtuvieron valores



mayores para el sitio control. En cuanto al IHS se evidenció un incremento en el valor de este índice en el sitio contaminado en varios meses de muestreo. 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) de los hepatocitos, como una respuesta adaptativa para aumentar la capacidad del hígado para detoxificar compuestos extraños vía el sistema de oxidasa de función múltiple (Addison 1984). Finalmente si bien en ambos sitios de muestreo el IGS mostró fluctuaciones durante la época de actividad sexual evidenciándose dos claros períodos reproductivos, se registró un desfase en el ciclo reproductivo en el sitio contaminado. Esto concuerda con lo observado con Bianco (2011) en hembras de la misma especie durante la misma época de muestreo, así como en otras especies ante la exposición a efluentes de PTE (Lye et al. 1997, Barber et al. 2007, Vajda et al. 2011).

#### ❖ *Histología y ultraestructura testicular*

Las alteraciones histológicas registradas en gónadas no fueron específicas para los diferentes tóxicos. Sin embargo se registró un incremento en la frecuencia y extensión de las mismas, a las mayores dosis ensayadas. Entre las alteraciones se puede mencionar presencia de numerosos procesos de vacuolización, pérdida de conexión entre células, apoptosis, congestión y necrosis.

El análisis ultraestructural, en cambio, permitió evidenciar alteraciones exclusivas para cada tóxico. En los individuos expuestos a E<sub>2</sub> se registraron numerosas mitocondrias con la membrana alterada durante la etapa de diferenciación de St-Sz y la presencia de Sg trinucleadas, que reflejarían problemas en la división celular. En el tratamiento con EE<sub>2</sub> se observó con frecuencia la fagocitosis de cistos completos y la presencia de fibroblastos, mientras que en los individuos expuestos a 4*n*-NP, se evidenciaron severos daños a nivel del tejido intersticial de la gónada, ya que se observó necrosis de Células de Sertoli, registrándose en algunos casos la ausencia total de de las mismas. Finalmente en el ensayo de MT se evidenciaron numerosas células de Leydig en comparación al control y a los demás tratamientos, y un exceso de producción por parte de las mismas. A campo fueron registradas en el sitio contaminado alteraciones en las mitocondrias, numerosos procesos apoptóticos y fagocitosis de cistos enteros.

Tanto en los individuos tratados en los ensayos como en los recolectados a campo en el sitio contaminado, las células de Sertoli se vieron notablemente afectadas. Se sabe que la espermatogénesis se encuentra estrictamente regulada y requiere un microambiente especial creado y mantenido por dichas células, que envuelven a las células germinales formando una

unidad morfo-estructural caracterizada por una intensa interacción parácrina. Se ha visto que el testículo no es un tejido uniforme, ya que puede responder diferencialmente a las hormonas FSH y andrógenos entre los diferentes espermatocistos. Por ejemplo dos cistos contiguos expuestos a ambientes endocrinos similares pueden responder de manera diferente a las señales endocrinas. Esta variación se debe a cambios locales que involucran la expresión de factores de crecimiento y receptores de hormonas (Schulz & Miura 2002).

Si bien el número de divisiones mitóticas por parte de las Sg estaría determinada genéticamente, se ha visto que la exposición a hormonas puede alterar este proceso (Schulz & Miura 2002). En la presente tesis, las células de Sertoli se han visto afectadas en todos los ensayos de laboratorio y en individuos recolectados en sitios contaminados, resultados que coinciden con lo encontrado en la bibliografía, lo cual indica que esta unidad fundamental para el desarrollo de la gametas masculinas es sumamente vulnerable ante la exposición de compuestos con actividad estrogénica. Se conoce que las hormonas pituitarias y esteroidogénicas regulan numerosos procesos dentro de la espermatogénesis, tales como la actividad de las células madre, el balance entre división y diferenciación celular, mecanismos de apoptosis, proliferación y diferenciación de células de Sertoli, etcétera (Billard 1986, Schulz & Miura 2002).

En la presente tesis, si bien se han evidenciado numerosas alteraciones ultraestructurales en el testículo, donde muchas de ellas se debieron a efectos directos en las células de Sertoli, en ninguno de los ensayos se registró una supresión total de la espermatogénesis y los parámetros espermáticos no siempre se modificaron. Se señala en la bibliografía que sólo la ausencia de andrógenos provocaría la supresión total de la espermatogénesis ya que los estrógenos pueden producir efectos negativos en dicho proceso, pero no su suspensión total (Robertson et al. 1999). Por otro lado, el tiempo de exposición a los diferentes compuestos (28 días) podría no ser suficiente como para observar cambios en los espermatozoides teniendo en cuenta la duración del ciclo espermatogénico en *J. multidentata*.

## 5.2. Conclusiones

- ❖ *Jenynsia multidentata* resultó ser una excelente especie bioindicadora para evaluar los efectos de compuestos estrogénicos sobre diversos aspectos reproductivos, por lo que podría ser utilizada en estudios de monitoreo en una extensa área de América del Sur.
- ❖ Por primera vez para esta especie se caracterizaron diversos parámetros espermáticos, estableciéndose un sencillo protocolo de obtención y tratamiento para las muestras de espema.
- ❖ El EE<sub>2</sub> demostró ser el xenoestrógeno más potente evaluado en la presente tesis. Por otro lado las concentraciones de MT utilizadas en este trabajo no actuaron como xenoestrógeno ya que ninguno de los biomarcadores cuantificados respondió ante dicho compuesto.
- ❖ Los resultados obtenidos en la presente tesis resaltan la necesidad de utilizar un set de biomarcadores cuando se quiere evaluar el efecto de xenobióticos. El comportamiento reproductivo y la ultraestructura de gónadas resultaron ser los biomarcadores más sensibles en condiciones de laboratorio si se quiere comprobar el efecto estrogénico de un tóxico. A campo, si bien la situación es más compleja, dada la mezcla de compuestos que existen en los ambientes contaminados donde pueden observarse efectos sinérgicos o antagónicos, ambos biomarcadores también resultaron ser los más sensibles.
- ❖ Las concentraciones de tóxicos utilizadas en los ensayos de exposición, que provocaron diversas alteraciones tanto a nivel celular, fisiológico y comportamental 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. El EE<sub>2</sub> y MT son ampliamente utilizados en medicina y veterinaria lo cual implica que siempre están presentes en efluentes cloacales al igual que la hormona natural E<sub>2</sub>, mientras que el 4*n*-NP prohibido en muchas regiones del hemisferio norte es de amplio uso en nuestro país tanto para uso doméstico como en industrias. Todo ello indica que todos estos compuestos seguirán presentes en los cuerpos de agua de nuestro país, y por lo tanto continuarán representando una amenaza para los organismos, incluido el hombre.
- ❖ Es difícil extrapolar los resultados obtenidos en laboratorio a un nivel ecosistémico. En la bibliografía uno de los efectos citados luego de la exposición a concentraciones

ambientalmente relevantes de xenotrógenos es la reducción de la progenie (Coe et al. 2010). Si bien en la presente tesis no se ha evaluado el éxito reproductivo de los organismos, dadas las alteraciones registradas en los bioensayos, es factible que el éxito reproductivo de los individuos se vea disminuido. Es muy probable que esta situación se esté dando en los sitios con elevada contaminación antropogénica, ya que los organismos están expuestos a un sinnúmero de compuestos que afectan distintos aspectos no solo de su biología reproductiva. El mayor esfuerzo de muestreo para la recolección de ejemplares en el sitio contaminado refleja claramente el impacto que la contaminación ejerce sobre las poblaciones silvestres.

❖ La presente tesis vislumbra la necesidad de realizar estudios y aplicación de mejoras en el tratamiento de efluentes urbanos e industriales para lograr disminuir la carga de contaminantes emergentes que se liberan al río. Estas mejoras deberían acompañarse con un adecuado tratamiento por parte de los gobiernos a través de la formulación de leyes, de una gestión cuidadosa de los desechos, de manera de controlar la disposición final de los mismos y de la toma de conciencia por parte de la población, de manera de contribuir con la preservación de los recursos hídricos.



## *CAPÍTULO VI*

### *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.
- Adler, P.; Steger-Hartmann, T.; Kalbfuss W. 2001. Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenster Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. *Acta hydrochem. hydrobiol.* 29 (4), 227-241 In Wenzel, A.; Ternes, T. 2003. Final Report ENV.D.1/ETU/2000/0083 Study on endocrine disrupters in drinking water. Schmallenberg and Wiesbaden, February 26, 2003
- 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.
- Ahmad, M.H.; Shalaby, A.M.E.; Khattab, Y.A.E. Abdel-Tawwab, M. 2002. Effects of 17  $\alpha$ -methyltestosterone on growth performance and some physiological changes of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus* L.). Egypt. *J. Aquat. Biol. Fish*, 4(4): 295-311.
- Almeida, J.S.; Meletti, P.C.; Martinez, C.B.R. 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 140, 356-363.
- 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 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environ Pollut* 158: 2566-2571.
- Alavi, S.M.H.; Hatef, A.; Pšenička, M.; Kašpar, V.; Boryshpolets, S.; Dzyuba, B.; Cosson, J.; Bondarenko, V.; Rodina, M.; Gela, D.; Linhart, O. 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) Sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22 (4): 861-886.

- Alavi, M.H.; Rodina, M.; Gela, D.; Linhart, O. 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) Testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22 (3): 695–717.
- Alavi, S.M.H.; Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmotic pressure. *Cell Biology International* 30 (1): 1–14.
- Alavi, S.M.H.; Cosson, J. 2005. Sperm motility in fishes: (I) Effects of pH and temperature. *Cell Biology International*, February 29 (2): 101–110.
- 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 *Jenynsia 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 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ Toxicol Chem* 23: 782-791.
- Ball, M.A., Parker, G.A. 1996. Sperm Competition Games: External Fertilization and "Adaptive" Infertility. *J Theor Biol* 180: 141-150.
- 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.; Keefe, S.H.; Antweiler, R.C.; Taylor, H.E.; Wass, R.D. 2006. Accumulation of contaminants in fish from wastewater treatment wetlands. *Environ Sci Technol* 40:603-611.
- 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.
- Bartlett, J.M.S., Kerr, J.B. and Sharpe, R.M. 1986. The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J. Androl.* 7: 240-253.
- Batty, J.; Lim, R. 1999. Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales Australia. *Arch Environ Contamin Toxicol* 36: 301-307
- 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.
- Bellido, P. & Bellido P.S. 1999. Receptores a estrógenos y progesterone. *Ginecol Obstet* 45 (1):9-13
- Benotti, M.J.; Trenholm, R.A.; Vanderford, B.J.; Holady, J.C.; Stanford, B.D., Snyder SA. 2009. Pharmaceutical and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol* 43:597-603.
- 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 Suquía, Córdoba, Argentina. Tesina de grado para optar al título de biólogo. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Pp 31.
- Billard R. 1969. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 9:251–271
- Billard R.; Escaffre A. 1969. La spermatogenese de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogenese. *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique*. 9:251–271
- Billard, R. 1981. Effects of washing gametes on their fertilization in rainbow trout. *Rev Can Biol* 40: 317-321.
- Birkhead, T.R.; Møller, A.P.1998. Sperm competition and sexual selection Academic Press, London
- 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.
- Bisazza, A., S. Manfredi & A. Pilastro. 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.
- 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 $\alpha$ -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.
- Bobé J, Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol* 165: 535–548.
- 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.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C: 219–245
- Boschetto, C.; Gasparini, C.; Pilastro, A. 2011. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav Ecol Sociob.* 65 (4) pp. 813-821
- Bremner, W.J., Millar, M.R., Sharpe, R.M. and Saunders, P.T.K. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135: 1227–1234.
- Burness G, Casselman SJ, Schulte-Hostedde AI, Moyes CD, Montgomerie R (2004) Sperm swimming speed and energetic vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behav Ecol Sociobiol* 56: 65-70. doi: 10.1007/s00265-003-0752-7
- Burns JR, Weitzman SH (2005) Insemination in Ostariophysan Fishes. In: Uribe MC, Grier HJ (eds) *Viviparous Fishes*, 1st ed. New Life Publications, Mexico, pp 105-132

## C

- Caldwell D. J.; Mastrocco F.; Nowak, E. Johnston, J.; Yekel, H.; Pfeiffer, D.; Hoyt, M.; DuPlessie, B.M., Paul D. Anderson. 2010. An Assessment of Potential Exposure and Risk from Estrogens in Drinking Water. *Environ Health Perspect* 118:338-344.
- 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.; Gelinas, 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.
- Cavaco, J.E.B., Blijswijk van, B., Leatherland, J.F., Goos, H.J.T. Schulz, R.W. 1999. Androgen-induced changes in Leydig cell ultrastructure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell Tissue Res*. 297: 291-299.
- 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.
- Chimchirian, R.F; Suri, R.P., Fu, H. 2007. Free synthetic and natural estrogen hormones in influent and effluent of three municipal wastewater treatment plants. *Water Environ Res.* 79(9):969-74.

- Cirja, M.; Ivashchkin, 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.
- Colucci, M.S.; Topp, E. 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: II. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *J. Environm. Qual.* 30: 2077-2080
- 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.
- Constantz GD.1984. Sperm competition in Poeciliidae fishes. In: Smith RL (ed) Sperm competition and the evolution of animal mating systems Academic Press, New York, pp 465-485
- 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.

- Cosson, J.; Dreanno, C.; Billard, R.; Suquet, M., Cibert, C. 1999 Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors In: Gagnon C (ed) The male gamete: from Basic Knowledge to clinical applications. Ache River Press St Louis, USA, pp 161-186
- 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.
- Christ, S.; Toth, G.P.; McCarthy J. A.; Torsella A.; Smith, M.K. 1996. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). *J fish Biol* 48(6). 1210-1222.
- Choi SM, Y. S., Lee BM. 2004. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1(7): 1-32
- 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.

Dadone, L., Narbaitz, R. 1967. Submicroscopic Structure of Spermatozoa of a Cyprinodontiform Teleost, *Jenynsia lineate*. *Z Zellforsch* 80: 214-21

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.

Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E. 2008. *The Toxicology of Fishes*. CRS Press. Taylor & Francis Group. Florida, pp 19-20.

- 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.
- Doux fils, 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.
- Ducsay, C.A.; Myers, D.A. 2011. NOS activation and NO function: differential control of steroidogenesis by nitric oxide and its adaptation with hypoxia. *J Endocrinol* 210, 259–269.

## 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.
- Edwards, T.M., Moore, B.C., Guillette, L.J. Jr. 2006. Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *Int J Androl* 29:109–121.
- 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 $\alpha$ -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *Egypt J Aquat Res* 38: 59-66.
- El Sayed Ali, T.; Abdel-Aziz, S.H.; El-Sayed, A.F.; Zeid, S. 2014. Structural and functional effects of early exposure to 4-nonylphenol on gonadal development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): b-histological alterations in testes. *Fish Physiol Biochem* 40:1495-1507
- EMEA/CHMP. (2006). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. EMEA/CHMP/ SWP/4447/00
- EU. 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European parliament and of the council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and



Restriction of Chemicals (REACH), Social Journal of the European Union L 396/1. OJ Eur Comm 396:1–849

European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wild-life. 1997. Cat. No EUR 17549, DG XII, Brussels. Available at: [http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports_en.html)

Evans JP, Pilastro A, Ramnarine IW. 2003. Sperm transfer through forced matings and its evolutionary implications in natural guppy (*Poecilia reticulata*) populations. *Biol J Linn Soc* 78: 605–612. doi: 10.1046/j.0024-4066.2002.00193.x

## F

Fausch, K.D.; Lyons, J.; Karr, J.R.; Angermeier, P.L. 1990. Fish communities as indicators of environmental degradation. *American Fisheries Society Symposium*. 8, 123-144.

Fawcett, D.W. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod Suppl* 2:90-127

Fitzpatrick, J.L.; García-González, F.; Evans, J.P. 2010. Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation *Biol Lett*. 6(6): 797–799.

Florez, J. 2013. *Farmacología humana*. Ed Elsevier Masson.

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.

Frye CA, Bo,E, Calamandrei, G, Calzà, L, Dessì-Fulgheri, F, Fernández, M, Fusani, L, Kah, O, Kajta, M, Le Page, Y., Patisaul H.B., Venerosi ,A., Wojtowicz, A.K., Panzica, GC. 2012. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.* 24(1):144-59

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

Gage, M. J.G., C. P. Macfarlane, S. Yeates, R. G. Ward, J. B. Searle & G.A. Parker. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol.* 14:44–7.

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.

Gardiner DM (1978) Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost *Cymatogaster aggregata*. *J Fish Biol* 13: 435-438

Gasparini, C.; Simmons, L.W.; Beveridge, M.; Evans, J.P. 2010. Sperm Swimming Velocity Predicts Competitive Fertilization Success in the Green Swordtail *Xiphophorus helleri* PLoS One. 5(8): 121-146.

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.; Hinfrey, 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.

Ghedotti, M.J. 1998. Phylogeny and classification of the Anablepidae (Cyprinodontiformes: Teleostei), pp 561-582. In Malabarba, L., R. Reis, R. Vari, Z. Lucena & C. Lucena (eds) Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.

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 Wasch- 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.
- Ginzburg AS. 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Acad Sci USSR, Moscow
- 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 disrupters 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.
- Greven, G.; Schmahl, G. 2006. A note on the spermatozoon ultrastructure of the four-eyed fish *Anableps anableps* (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes). *Zeitschrift für Fischkunde* 83-88 Grier HJ, Burns JR, Flores JA (1981) Testis structure in three species of teleosts with tubular gonopodia. *Copeia* 1981: 797-801
- 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.
- Gutendorf, B.; Westendorf, J. 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166, 79-89.
- 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 iberingi*. *Water Res* 38: 2367-2373.

## H

- Hadi Alavi, M. S.; Psenika, M.; Rodina, M.; Policar, T.; Linhart, O. 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbuis* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquat Living resources*. 21(01) 75-80.
- 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 17 $\beta$ -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.
- Hamlin, H.J. 2008. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female *Siberian sturgeon* (*Acipenserbaeri*) in commercial aquaculture. *Aquaculture* 281 118-125
- 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- $\alpha$ -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.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Golshan, M., Linhart, O., 2013. Toxicity of environment contaminants to fish spermatozoa functions *in vitro* – A review. *Aquat Toxicol* 140–141: 134–144.
- 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.
- Henríquez, V.D. 2012. Tesis Doctoral. Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: Productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío de Chile. Santiago de Chile
- Higgs, D.A.; Fagerlund, U.H.M.; McBride, J.R.; Dye, H.M. Donaldson, E.M.1977. Influence of combinations of bovine growth hormone, 17  $\alpha$ - methyltestosterone and L-thyroxine on growth of young coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Zool.* 55: 1048-1056.
- 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*). *Cybium* 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.
- Hiroyuki, K.; Katsura, E.; Takeuchi, S.; Niiyama, .K; Kobayashi, K. 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect.* 112(5): 524–531

- 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**

- Ikeuchi, T.; Todo, T.; Kobayashi, T.; Nagahama, Y. 2001. Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B: 449–455.
- 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 $\alpha$ -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**

- Jamieson BGM (1991) Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge
- 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.; Neuhauss, 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.
- Karbe L., T. Ternes, A. Wenzel, and M. Hecker. 2006. Estrogens, xenoestrogens, and effects on fish in German Waters. In *Estrogens and Xenoestrogens in the Aquatic Environment: An Integrated Approach for Field Monitoring and Effect Assessment*. Edited by: D. Vethaak, M. Schrap, and P. de Voogt. 365-406 pp. 2006 SETAC.
- Kuch, H. M. and K. Ballschmiter. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range *Environ Sci Technol* 35(15): 3201-6.
- 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 Bioph Res Co* 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.
- Khalil Wagdy K. B.; Hasheesh, W.S.; Mohamed- Assem S. M.; Hossam H. A.; Eman A. Z. 2011. Assessment the impact of 17 $\alpha$ -methyltestosterone hormone on growth, hormone concentration, molecular and histopathological changes in muscles and testis of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus Life Science Journal* 8(3)
- 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.
- Kleinkauf A, Macfarlane C, Yeates S, Simpson MG, Leah RT. 2004. A biomarker approach to endocrine disruption in flounder--estrogen receptors, hepatocyte proliferation, and sperm motility. *Ecotoxicol Environ Saf.* 58(3):324-34.
- 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 *Zoarces 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.
- Koya, Y.; Iwase, A. 2004. Annual reproductive cycle and rate of the spermatogenic process in male mosquitofish *Gambusia affinis*. *Ichthyol Res.* 51(2) 131-136.
- Körner, W., Ulrike, B., Triebkorn, R.; Schwaiger, J.; Negele, R.D.; Hagenmaier SA.M.H. 2001. Steroid Analysis and Xenosteroid Potentials in the Small Streams in Southwest Germany. *J. aquat Ecos strees Recon* (8): 215-229.
- 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.
- Kuch, H. M.; K. Ballschmiter. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 35(15): 3201-6.
- 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**

- Lahnsteiner F, Patzner R (2008) Sperm Morphology and ultrastructure in fish. In: Hadi Alavi SM, Cosson J J, Coward K, Rafiee G (eds) Fish Spermatology, 1st edn. Alpha Science International, Oxford, U.K, pp 1-61
- 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.
- Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J., Cooper, R.L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 54, 154-167.
- 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.
- 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.
- López, A.G.; Bogerd, J.; Granneman J.C.M.; van Dijk, W.; TRant, J.M.; Taranger, G.L.; Schulz R.W. 2009. Leydig Cells Express Follicle-Stimulating Hormone Receptors in African Catfish *Endocrinology*. 150(1): 357–365.
- Loomis, A.K.; Thomas, P. 2000. Effects of Estrogens and Xenoestrogens on Androgen Production by Atlantic Croaker Testes In Vitro: Evidence for a Nongenomic Action Mediated by an Estrogen Membrane Recepto. *Biol. Rep.* 97(21): 11603–11608
- 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.
- Lyon, M.F., Glenister, P.H. and Lamoreux, M.L. 1975. Normal spermatozoa from androgen resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature* 258: 620–622.
- 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.
- Mac Latchy, 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 end points in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem* 22: 996-1008.
- Mac Lusky, N.J.; Naftolin, F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1302.
- Marjani, M.; Jamili, S.; Mostafavi, P.G.; Ramin, M. Mashinchian, A. 2009. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Fish. Aquat. Sci.*, 4(1): 71-74.
- 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 spermatozeugma 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.
- Mattei X (1991) Spermatozoon ultrastructure and its systematics implications in fishes. *Can J Zool* 69: 3038-3055.

- 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.
- Meffe GK, Snelson FF (1989) *The Ecology and Evolution of Livebearing Fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, USA
- 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.
- Metcalf, 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.
- Meyer A, Lydeard C (1993) The Evolution of Copulatory Organs, Internal Fertilization, Placentae and Viviparity in Killifishes (Cyprinodontiformes) Inferred from a DNA Phylogeny of the Tyrosine Kinase Gene X-src. *P Roy Soc Lond B* 254: 153-162. doi: 10.1098/rspb.1993.0140
- 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 $\beta$ -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.
- Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9:295–318
- 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.
- Montgomery M.; Brown, A.C; Gendelman, H.K.; Ota, M. Mizuho Ota, Clotfelter, E.H. 2014. Exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol decreases motility and ATP in sperm of male fighting fish *Bettasplendens*. *Environ Toxicol.* 29: 243–252.
- 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.; Thioulant, 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.
- Mussali, G.; Tovar-Sanchez, E.; Valdeverde, M.; Rojas del Castillo, E. 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to exosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 117-140, 2013



## N

- Nadal, A., Roperó, A. B.; Laribi, O.; Maillet, M.; Fuentes, E. Soria, B.2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(21).
- 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.
- Nagpal, N.K.; Meays, C.L. 2009. Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active-Compounds (PhACs): 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) Technical Appendix Science and Information Branch Water Stewardship Division Ministry of Environment Ministry of environment province of British Columbia
- 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 ethinylestradiol 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.; Linderroth, 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.; Holbeck, 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.; Vandenbyllardt, 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, ethynylestradiol. *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.
- Parenti LR (2005) The Phylogeny of Atherinomorphs: Evolution of a Novel Fish Reproductive System. In: Uribe MC, Grier HJ (eds) *Viviparous Fishes*, 1st ed. New Life Publications, Mexico, pp 105-132
- Parker, G. A. 1990a. Sperm competition games - sneaks and extra-pair copulations. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 242:127-133.
- Parker, G. A. 1990b. Sperm competition games - raffles and roles. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 242: 120-126
- Parker, G.A.; Ball, M.A. 2005. Sperm competition, mating rate and the evolution of testis and ejaculate sizes: a population model. *Biol Lett* 1: 235-238.
- 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 ethynylestradiol 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 Suquía 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 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 330-345.
- Pecio A, Rafirisky J (1994) Structure of the testes, spermatozoa and spermatozeugmata of *Mimagoniates barberi* Regan 1907 (Teleostei: Characidae) an internally fertilizing, oviparous fish. *Acta Zool* 75:179-185
- 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 Suquía 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.
- Piferrer, F. & Guiguen, Y. 2008. Fish Gonadogenesis. Part II: Molecular Biology and Genomics of Sex Differentiation. *Rev Fish Sci* 16:35-55.
- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), 2007. Perspectivas del Medio Ambiente Mundial, GEO4. Ed. PNUMA (1<sup>o</sup> edición). pp 115-120.

- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), 2012. Aguas saludables para el desarrollo sostenible. Estrategia operativa del PNUMA para el agua dulce (2012-2016). Ed. PNUMA. pp 5-6.
- Pojana, G.; Bonfa, G.; Busetti, F.; Collarin, A.; Marcomini, A. 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon water. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1874-1880 (cited from Belfroid et al., 2006).
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32: 459-497.

## R

- Rautenberg, G.E.; Amé, M.V.; Monferrán, M.V.; Bonansea, R.I.; Hued, A.C. 2014. A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquia River. *Ecological indicators*. 48: 706 - 720
- 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.
- Rizkalla, E.H.; Haleem, H.H.; Abdel-Halim, A.M.M Youssef, R.H. 2004. Evaluation of using 17 $\alpha$ -methyl testosterone for monosex *Oreochromis niloticus* fry production. *Egypt. Ger. Soc.Zool.*, 43(a): 315-335
- 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
- Rogers, J.A.; Metz, L.; Yong, V.W. 2013. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms *Molec Immunol*. 53(4) 421-430.
- Roggio, M.A.; Hued, A.C.; Bistoni, M.A. 2012. Effects of 4n-nonylphenol exposure on the reproductive behavior and testis histology of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae: Cyprinodontiformes). *Natura Neotropicales*.
- Roggio, M.A.; Teves, M.E.; Gatica, L.V.; Hued, A.C.; Giojalas L.C.; Bistoni, M.A. 2014a. Spermatozoa characterization in the one-sided livebearing fish, *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae). *Rev. Biol. Trop.* 62 (3): 997-1006.

- Roggio M.A.; Guyón N.F.; Valdés M.E.; Hued A.C.; Amé M.V.; Giojalas L.C.; Wunderlin D.A.; Bistoni M.A. 2014. Effects of the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the fish *Jenynsia multidentata*. *Bull of Environ Contam and toxicol*. 92(5):579-84.
- Rurangwa, E.; D.E. Kime; F. Ollevier & J.P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234: 1-28.
- Russel, L.D.; Ettlin, R.A., Sinha Hikim, A.P. and Clegg E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press (Clearwater, Florida, U.S.A.), pp. 1–37.

## S

- Saaristo, M.; Craft, J.A.; Lehtonen, K.K.; Bjork, H.; Lindstrom, K. 2009. Disruption of sexual selection in sand gobies (*Pomatoschistus minutus*) by 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol, an endocrine disruptor. *Horm Behav* 55: 530-537.
- Salierno, J.D.; Kane, A.S. 2009. 17 $\alpha$ -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.
- Schweer, L.G. 2002. Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test. EPA. Work assignment manager. U.S Environmental Protection Agency. Washington.
- 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.; Cediél, 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-ethynylestradiol 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.
- Shanthanagouda, 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.
- Sharma CM, Rosseland BO, Almvik M, Eklo OM. (2009). Bioaccumulation of organochlorine pollutants in the fish community in Lake Arungen, Norway. *Environ Pollut* 157:2452–2458.
- Shen, J.H., B. Gutendorf, H.H. Vahl, L. Shen, J. Westendorf. 2001. Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology* 166: 71-78 (cited from Belfroid et al., 2006).
- Scholz, S., Klüver, N. 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual gonadal development in fish. *Sex Dev* 3:136–151.

- 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 E, R. N., Kortenkamp A. 2002. Something from “nothing”-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol*. 8(36): 1751-1756.
- Silva, P.; Rocha, M.J.; Cruzeiro, C.; Malhao, F.; Reis, B.; Urbatzka, R.; Monteiro, R.A.; Rocha, E. 2012. Testing the effects of ethinylestradiol 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.
- Skinner AMJ, Watt PJ. 2007. Phenotypic correlates of spermatozoon quality in the guppy, *Poecilia reticulata* Behav Ecol 18: 47–52.
- 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.
- Smith CC, Ryan MJ (2010) Evolution of sperm quality but not quantity in the internally fertilized fish *Xiphophorus nigrensis*. *J Evol Biol* 23: 1759–1771. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02041.x
- Snelson, F.F Jr. 1984. Seasonal Maturation and Growth of Males in a Natural Population of *Poecilia latipinna* *Copeia* 1. 252-255
- Snook, R.R. 2005 Sperm in competition: not playing by the numbers. Trends Ecol Evol 20: 46-53.
- 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 Catalonian 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.
- Stockley, P.; Gage, M.J.G.; Parker, G.A., Miller; A.P. 1997. The evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am Nat* 149: 933-954.
- Stachel, B., U. Ehrhorn, et al. 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environ Pollut* 124(3): 497-507
- 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 Y., H. Huang , Y. Sun, Chao W., Xiao-Lei S., Hong-Ying H., Takashi K., Koichi F. 2013. Ecological risk of estrogenic endocrine disrupting chemicals in sewage plant effluent and reclaimed water. *Environ Pollut* 180, 339-344

## 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 KL, C. R., Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, et al. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol.* 6(37): 1142-1149.
- Thorpe KL, H. T., Hetheridge MJ, Scholze M, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol.* 12(35): 2476-2481
- 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, M.E.; Marino, D.J.; Wunderlin, D.A.; Somoza, G.M.; Ronco, A.E.; Carriquiriborde, P. 2015. Screening concentration of E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and EE<sub>2</sub> in sewage effluents and surface waters of the "Pampas" region and the "Río de la Plata" estuary (Argentina). *Bull Environ Contam Toxicol*. 94(1):29-33.
- 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.
- WHO. 2002. World Health Organization: Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. In Damstra T; Barlow, S.; Bergman, A., Kavlock, R., Van Der Kraak, G., (eds). ReportWHO/PCS/EDC/02.2, 180, Geneva
- 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.
- Yamazaki, F. 1976. Application of hormones in fish culture. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 948-958.
- 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

- Zaharin Aris, A.; Shamsuddin, A.S.; Praveena, S.M. 2014. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Inter.* 69: 104-119.
- Zaroogian, G.; Gardner, G.; Horowitz, D.B.; Gutjahr-Gobell, R.; Haebler, R.; Mills, L. 2001. Effect of 17 $\beta$ -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.; Hinsch, 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*

# EFFECTS OF 4*n*-NONYLPHENOL EXPOSURE ON THE REPRODUCTIVE BEHAVIOR AND TESTIS HISTOLOGY OF *Jenynsia multidentata* (ANABLEPIDAE: CYPRINODONTIFORMES)

**MARÍA ANGELINA ROGGIO, ANDREA CECILIA HUED  
& MARÍA DE LOS ÁNGELES BISTONI**

Instituto de Diversidad y Ecología Animal (CONICET-UNC) y Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Avenida Vélez Sarsfield 299, (5000) Córdoba, Argentina.

## ABSTRACT

Increasing evidence has shown that wild populations of aquatic animals are exposed to chemical compounds that behave as hormone mimics and disrupt their reproductive physiology. Fish species are sensitive bioindicators of water quality. The one-sided livebearing fish *Jenynsia multidentata* has a wide neotropical distribution and has been used as an excellent model in both laboratory and field studies. The main goal of the present work was to assess the effects of subchronic 4*n*-nonylphenol (4*n*-NP) exposure on *J. multidentata*. Adult males were exposed to 0, 20 and 40 µg l<sup>-1</sup> 4*n*-NP during 14 days. 17 β estradiol (E<sub>2</sub>) was used as positive control. Reproductive behavior, somatic indices, testis and liver histology were evaluated. Our results suggest that 4*n*-NP has adverse effects on the reproductive behavior and histological characteristics in males of *J. multidentata*. Individuals exposed to 4*n*-NP show similar alterations to those recorded in E<sub>2</sub> treatments. Changes in the reproductive biology caused by exposure to xenoestrogens 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 that evaluates the effects of 4*n*-NP on the reproductive aspect of native fish species.

### Key words:

Live-bearing fish, xenoestrogens, biomarkers.

# EFFECTOS DEL 4*n*-NONILFENOL SOBRE EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO E HISTOLOGÍA DEL TESTÍCULO EN *Jenynsia multidentata* (ANABLEPIDAE: CYPRINODONTIFORMES)

MARÍA ANGELINA ROGGIO, ANDREA CECILIA HUED  
y MARÍA DE LOS ÁNGELES BISTONI

Instituto de Diversidad y Ecología Animal (CONICET-UNC) y Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Avenida Vélez Sarsfield 299, (5000) Córdoba, Argentina.

## RESUMEN

Una creciente evidencia científica demuestra que los organismos acuáticos son expuestos a diversos xenobióticos que pueden imitar la función de hormonas naturales, y, por lo tanto, alterar la fisiología reproductiva de los mismos. Los peces constituyen bioindicadores sensibles en la evaluación de la calidad de los recursos hídricos. *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) es un pez vivíparo de amplia distribución neotropical y ha sido utilizado como un excelente modelo experimental. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la exposición subcrónica del compuesto 4*n*-nonylphenol (4*n*-NP) en machos adultos de *J. multidentata*. Para ello los individuos fueron expuestos a 0, 20 y 40 µg l<sup>-1</sup> 4*n*-NP durante 14 días. La hormona 17 β estradiol (E<sub>2</sub>) fue utilizada como control positivo. El comportamiento reproductivo, índices somáticos, histología de gónadas e hígado fueron evaluados. Nuestros resultados sugieren que el 4*n*-NP afecta de manera adversa las variables anteriormente mencionadas. Las alteraciones registradas tras la exposición a 4*n*-NP fueron similares a las observadas para la hormona E<sub>2</sub>. A nuestro entender, el presente trabajo constituye el primer reporte que evalúa los efectos del 4*n*-NP sobre parámetros reproductivos en una especie íctica autóctona de Argentina.

### Palabras clave:

Peces vivíparos, xenoestrógenos, biomarcadores.

## INTRODUCTION

A wide range of chemical compounds with adverse health effects on organisms are introduced into the aquatic environment. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) interfere with the endocrine system of wildlife and human populations. One group of EDCs includes xenoestrogens, which bind to estrogen receptors with a similar affinity to the endogenous estrogen hormone (17  $\beta$  estradiol). They have the potential to exert effects at extremely low concentrations (Mills & Chichester, 2005) affecting animal development and reproduction.

Among xenoestrogens, alkylphenol polyethoxylates (APEOs) are used as nonionic surface active agents in a wide variety of industrial and agricultural products, including paints, pesticides, detergents and cosmetics (Ying *et al.*, 2002). The degradation of APEOs in the environment produces alkylphenols, such as 4*n*-Nonylphenol (4*n*-NP). This product is a ubiquitous contaminant in the aquatic environment and it is characterized by its high toxicity and resistance to biodegradation (Ministry of the Environment, Government of Japan, 2001; Tsuda *et al.*, 2001).

The potential threat of xenoestrogens to animal reproduction posed the necessity to identify and develop bioindicators and biomarkers to monitor their effects. Fish are sensitive bioindicators of aquatic environment quality and are useful models to understand the mechanisms of external perturbations that could disrupt essential biological functions in other vertebrates (Kime, 1999; Jalabert *et al.*, 2000). Exposure of fish males to 4*n*-NP or other alkylphenols has been reported to cause a decrease in testicular size, testicular fibrosis, apoptosis of germ and Sertoli cells, ovotestes, vitellogenin induction, and changes in reproductive behavior patterns (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Dréze *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Kinnberg *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003; Rey Vázquez *et al.*, 2009). Several studies on the effects of 4*n*-NP have been conducted on different fish species (Mills & Chichester, 2005). Nevertheless, there is a gap of knowledge about the effects of this compound on South American native fish.

The one-sided livebearing fish, *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) is a conspicuous species in the Neotropical region (Malabarba *et al.*, 1998). It has been used as laboratory fish model to evaluate the effects of xenobiotics through different biomarkers (Cazenave *et al.*, 2008; Amé *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2009). In particular, the reproductive behavior and histological characteristics have been pointed out as useful biomarkers (Hued *et al.*, 2012; Guyón *et al.*, 2012). Males have a coercive behavior (Bisazza *et al.*, 2000) and the testis structure has been classified as restricted lobular type (Martinez & Monasterio de Gonzo, 2002).

The aim of this study was to evaluate changes in testicular histology and in male reproductive behavior of the native fish, *J. multidentata* in response to subchronic exposure (14 days) to 4*n*-NP.

## MATERIALS AND METHODS

### REAGENTS

Ultrapure water (<5mg/L TOC) was obtained from a purification system (Arium 61316-RO plus Arium 611 UV). 4*n*-Nonylphenol (4*N*-NP) and 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) were obtained from Sigma-Aldrich Argentina (99.9 % and 98 % purity, respectively). E<sub>2</sub> was used as a positive control to examine whether the effects of 4*N*-NP corresponded to the effects of natural estrogen. The stock solutions (1 mg ml<sup>-1</sup>) were prepared by dissolving each reagent in acetone (Merck Chemist) and stored at 20°C. Aliquots of these solutions were used to prepare the 4*n*-NP and E<sub>2</sub> working solutions by diluting them in ultrapure water.

### FISH

Adult males of *J. multidentata* were caught by a backpack electrofisher from a reference site in the San Antonio River, Córdoba, Argentina (64°32'W 31°28'S) (Hued & Bistoni, 2005) and transported to the laboratory in 20-L water tanks. Fish were acclimated for two weeks under controlled laboratory conditions (21°C and 12:12h light-to-dark cycle). During the acclimatization period fish were fed twice a day with commercial fish food. Females used in the behavioral analysis were captured at the same site.

### EXPOSURE CONDITIONS

Fish were exposed to 20  $\mu\text{g l}^{-1}$  and 40  $\mu\text{g l}^{-1}$  of 4*n*-NP (l) during 14 days in a 10 L aerated glass aquarium. Two concentrations of E<sub>2</sub> were used as positive control: 100 ng l<sup>-1</sup> and 1000 ng l<sup>-1</sup>, and acetone alone (0.005 % v/v) as solvent control. Five fish were exposed to each concentration and four replicates were made for each treatment (*n*=20). Male standard length (mean  $\pm$  SD) was 27.09  $\pm$  3.65 mm and mean weight was 0.43  $\pm$  0.17 g. Males were fed and kept under the same conditions during the exposure and acclimatization periods. Water was replaced partially twice a week and completely once a week.

### REPRODUCTIVE BEHAVIOR

At the end of the exposure period, each male was transferred to a 5-L aquarium and paired with an unexposed female for 24 hours. Male sexual display was recorded using a video recorder (Panasonic; mod. 3244) and by direct observation for 15 min in the morning and 15 min in the afternoon (due to the diurnal habits of *J. multidentata*, Cazenave *et al.*, 2008). Based on the normal reproductive behavior described by Bisazza *et al.* (2000), 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 her gonopore.

- *Number of persecutions (P)*: number of times that a male persecutes a female in an attempt to make contact with her gonopore.

- *Copulatory attempts (CA)*: number of times that a male enlarges its gonopodium to make contact with the female gonopore.

- *Number of copulations (C)*: number of times that a male makes direct contact through its gonopodium with the female gonopore.

The following ratios were then calculated: CA/PT, CA/P, C/PT, C/P (successful persecution) and C/CA. The last parameter was used as an estimation of mating success (Pilastro *et al.*, 1997; Bisazza *et al.*, 2000).

#### SOMATIC CONDITION AND HISTOLOGICAL ASSESSMENT

Immediately after recording reproductive behavior, each male was euthanized by immersion in tricaine metanosulfonate overdose (500 mg l<sup>-1</sup> MS222). Total weight and standard length were recorded to determine the Fulton Index (K) for each fish (Anderson & Newman, 1996). Testis and liver were excised and weighed in order to calculate the Gonadosomatic Index (GSI) and Hepatosomatic Index (HSI) (Goede & Borton, 1990), and fixed in 10 % formalin. Tissue samples were dehydrated through a graded series of ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Sections of 4 to 6- $\mu$ m thick were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for examination under a light microscope.

#### STATISTICAL ANALYSES

Descriptive statistics of the reproductive behavior and somatic variables measured (mean, standard deviation, range) were calculated. Normal variables were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) to evaluate the differences between treatments followed by the DGC test *a posteriori* (Infostat 2003). Variables with non-normal distribution were analyzed with the Kruskal-Wallis Analysis, followed by the Dunn test *a posteriori*. The level of significance was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### SURVIVAL

All of the control and 4n-NP and E<sub>2</sub> exposed fish survived to the end of the experiment.

## REPRODUCTIVE BEHAVIOR

The behavioral parameters recorded in the present work did not show significant differences in each treatment group between morning and afternoon. Therefore all the data was combined and analyzed together.

One hundred percent of the control males were sexually active in the presence of the female. However, the percentage of males exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> showed a lower percentage of sexual activity, decreasing 30 % at 20 µg l<sup>-1</sup> 4n-NP and 20 % in the other treatments.

The behavioral parameters are shown in Table 1. Several variables were affected by estrogen exposure, showing a significant decrease relative to the control group. Both CA and C decreased significantly in all treatments relative to the control group, but no differences were recorded in PT and P among males exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub>.

The number of copulas related to time of persecution (C/TP) was lower in the highest concentration of 4n-NP. This pattern was recorded in males exposed to both concentrations of E<sub>2</sub>. The proportion of persecutions that ended in copula (C/P) (successful persecutions) decreased significantly in males exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> relative to the control group. On the other hand, the relationship between copulatory attempts and number of persecutions (CA/P) was significantly different only in males exposed to both concentrations of E<sub>2</sub>. Finally the proportion of copulatory attempts that ended in copula (C/CA) (successful attempts) was lower in males exposed to 4n-NP and 100 ng E<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>.

Variables	Control	20 µg L <sup>-1</sup> NP	40 µg L <sup>-1</sup> NP	100 ng L <sup>-1</sup> E <sub>2</sub>	1000 ng L <sup>-1</sup> E <sub>2</sub>
PT	43.80 ± 6.86A	31.87 ± 8.84A	35.89 ± 4.45A	33.21 ± 11.44A	27.55 ± 8.87A
P	18.20 ± 2.35A	17.10 ± 4.12A	15.85 ± 5.20A	11.50 ± 4.63A	12.21 ± 4.12A
CA	17.60 ± 2.15A	5.92 ± 7.19B	4.62 ± 3.27B	5.64 ± 2.77B	8.91 ± 2.39B
C	4.85 ± 0.85A	1.21 ± 2.46B	1.47 ± 1.15B	0.87 ± 0.61B	0.86 ± 0.41B
NP/PT	0.50 ± 0.05A	0.64 ± 0.06A	0.91 ± 0.15B	0.79 ± 0.13B	0.74 ± 0.06B
CA/TP	0.47 ± 0.04A	0.42 ± 0.07A	0.73 ± 0.25A	0.39 ± 0.07A	0.53 ± 0.10A
C/PT	0.08 ± 0.01A	0.04 ± 0.02B	0.02 ± 0.01B	0.02 ± 0.01B	0.04 ± 0.02B
CA/P	1.09 ± 0.11A	0.71 ± 0.15B	0.74 ± 0.14B	0.52 ± 0.07B	0.75 ± 0.14B
C/P	0.18 ± 0.03A	0.09 ± 0.04B	0.05 ± 0.03C	0.04 ± 0.02C	0.06 ± 0.02C
C/CA	0.17 ± 0.03A	0.10 ± 0.04B	0.05 ± 0.03C	0.06 ± 0.03C	0.09 ± 0.03B

**Table 1.** Reproductive behavioral variables registered in *Jenynsia multidentata* males exposed to sublethal concentrations of 4n-NP and E<sub>2</sub> for 14 days. Mean ± EE; n= 15. References: (PT) Time of persecution; (P) number of persecutions; (CA) copulatory attempts; (C) copulas. Capital letters indicate significant differences among treatments (p<0.05).

### SOMATIC CONDITION AND HISTOLOGICAL ASSESSMENT

The average, maximum and minimum values of somatic indices in control and treatment groups are shown in Table 2. Only males exposed to 1000 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> showed a significant increase of K regarding other treatments. On the other hand, the GSI decreased significantly in both treatments of 4n-NP and E<sub>2</sub> and the HSI increased significantly at the 40 µg L<sup>-1</sup> 4n-NP and 100 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> compared with the control group.

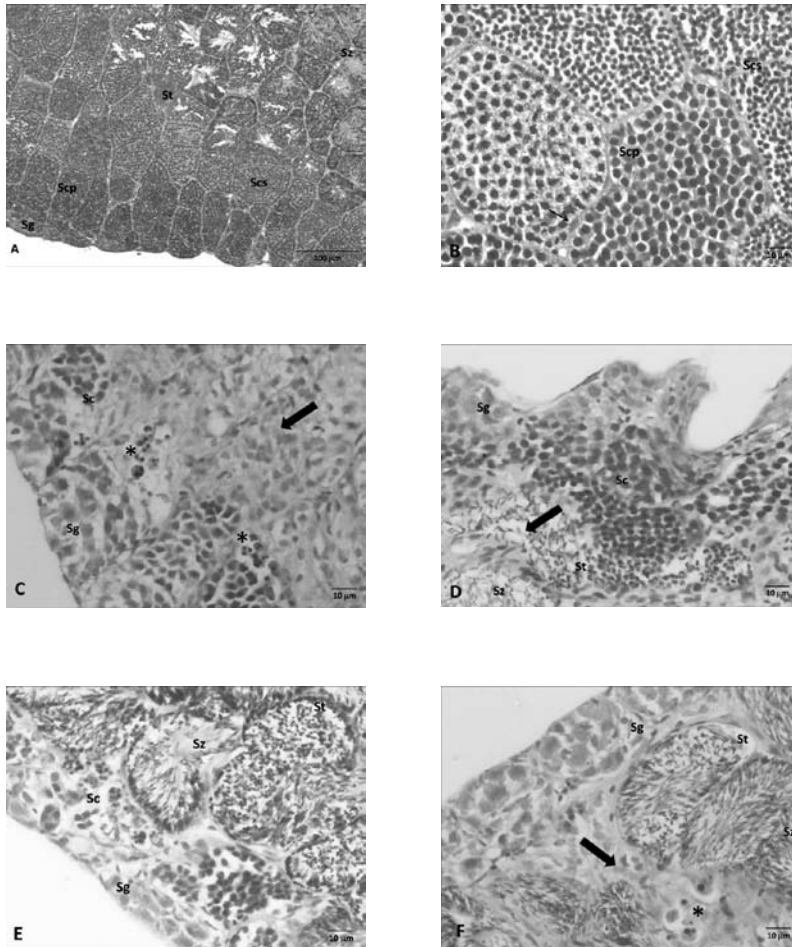
Testis from control fish contain regularly organized cysts with all spermatogenic stages (Fig.1a–b). The testicular structure corresponds to the lobular restricted type. Each lobule contains isogenic germ cells enclosed by Sertoli cells forming organized cysts, from immature to mature cysts, arranged from the periphery to the efferent ducts. Spermatogonias (Sg) are restricted to the testis periphery whereas cysts with spermatocytes (Sc), spermatids (St) and mature spermatozoa are arranged toward the central duct. Males exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> showed a clear disarrangement and loss of cyst structure, where the cyst walls are not recognizable (Fig 1c–f). Apoptotic bodies were also observed inside Sertoli cells. These bodies correspond to phagocytized degenerated germ cells (Fig 1c, e and f). A decrease in spermatocyte cysts was registered in all treatments, being more evident at 1000 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> (Fig. 1f).

Histological examination of the liver revealed progressive adverse effects on the parenchyma structure following exposure to increasing 4n-NP and E<sub>2</sub> concentrations. The liver of control males showed a homogenous parenchyma structure (Fig. 2a, 2d) whereas males exposed to both 4n-NP and E<sub>2</sub> showed a loss of hepatic structure, a generalized hydropic degeneration (cells appeared swollen), vascular congestion, sinusoid dilatation and numerous hepatocytes contained pyknotic nuclei (Fig. 2b, c, e, f). Focal necrosis was registered at 1000 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> (Fig. 2f).

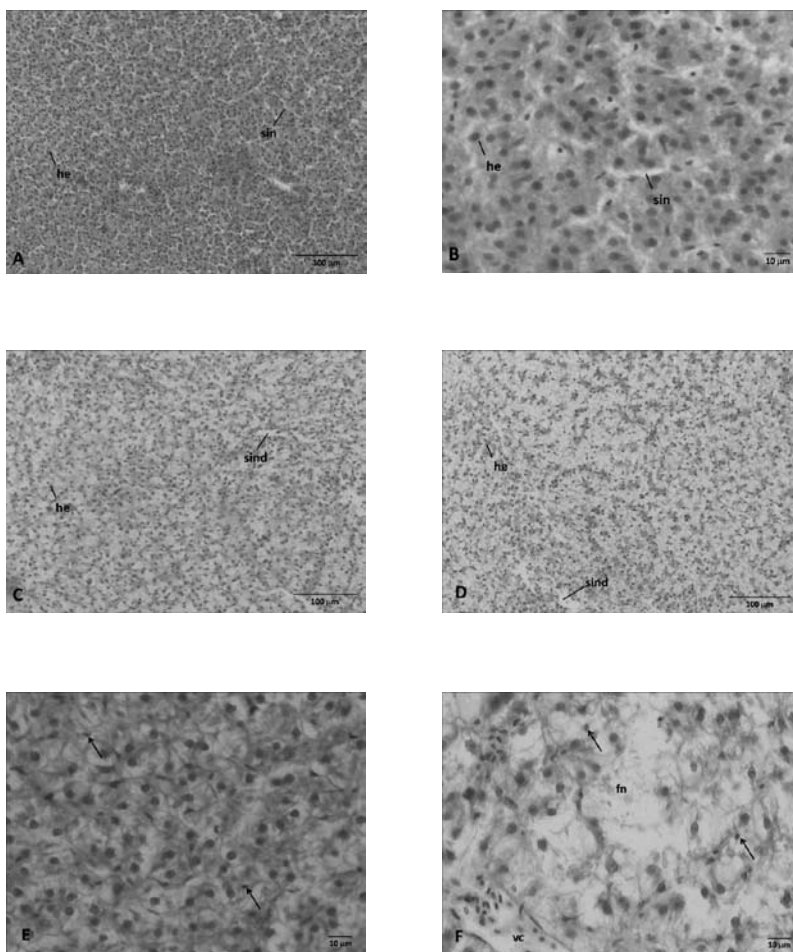
Indexes	Control	20 µg L <sup>-1</sup> NP	40 µg L <sup>-1</sup> NP	100 ng L <sup>-1</sup> E <sub>2</sub>	1000 ng L <sup>-1</sup> E <sub>2</sub>
K	1.98 ± 0.18A	2.08 ± 0.14A	2.24 ± 0.17A	2.10 ± 0.17A	2.21 ± 0.03A
GSI	2.60 ± 0.31A	1.20 ± 0.24B	1.09 ± 0.24B	1.58 ± 0.23B	1.23 ± 0.15B
HSI	1.74 ± 0.18A	1.94 ± 0.27A	2.41 ± 0.25B	2.51 ± 0.17B	1.96 ± 0.14A

**Table 2.** Somatic indexes measured in *Jenynsia multidentata* males exposed to sublethal concentrations of 4n-NP and E<sub>2</sub> for 14 days. Mean ± EE; n= 15. References: (K) Fulton Index; GSI: Gonadosomatic index and HSI: Hepatosomatic index





**Figure 1.** Light microphotographs of testis of *Jenynsia multidentata*. **(A)** The testicular structure corresponds to the lobular restricted type (100x); **(B)** a well-defined cyst structure in control fish; **(C)** male exposed to 20 µg NP L<sup>-1</sup> showing a clear loss of cyst structure (thick arrows) and the presence of apoptotic bodies; **(D)** at 40 µg NP L<sup>-1</sup> a disarrangement of cyst structure and spermatogonial hypertrophy was evidenced; **(E)** male exposed to 100 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> showing apoptotic bodies enclosed in Sertoli cells; and **(F)** individual exposed to 1000 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> showing a loss of cyst structure and a decrease in number of spermatocytes **(B–F: 400x)**. References: Sc, spermatocytes; Scp, primary spermatocytes; Scs, secondary spermatocytes; Sg, spermatogonia; St, spermatids; Sz, spermatozoa; asterisks show apoptotic bodies; thick arrows show loss of cyst structure. H&E stain.



**Figure 2.** Light microphotographs of liver from *Jenynsia multidentata*. **(A–B)** A well-defined parenchyma structure in control fish (100x and 400x respectively); **(C–D)** males exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> respectively, showing a clear loss of parenchyma structure and generalized hydropic degeneration (100x); **(E)** male exposed to the highest concentration of 4n-NP showing pyknotic cells and **(F)** male exposed to the highest concentration of E<sub>2</sub> showing focal necrosis and pyknotic cells **(E–F: 400x)**. References: hd, hydropic degeneration; he, hepatocytes; fn, focal necrosis; sin, sinusoids, sind, sinusoid dilatation; vc, vascular congestion; arrows show pyknotic nuclei. H& E stain.

## DISCUSSION

Reproduction is considered to be a key parameter to evaluate the harmful potential of endocrine disruptors. It is well-known that sex hormones play an important role in the expression of sexual behavior in fish (Arcand-Hoy & Benson, 1998), and reproductive success depends on the ability to perform the appropriate sexual behavior. It has been suggested that changes in sexual behavior following exposure to EDCs could be useful biomarkers to assess estrogenic effects and could predict effects at the population level (Bayley *et al.*, 1999; Bjerselius *et al.*, 2001; Doyle & Lim, 2005).

Control males showed the same reproductive behavior pattern described by Bisazza *et al.* (2000), with coercive copulatory attempts through gonopodial thrusting. When a male meets a female, he moves immediately behind her and then darts forward along her side in an attempt to bring forward his gonopodium. When his body is in close contact with the female, he rotates the gonopodium towards the female and tries to insert his gonopodium into her gonopore, repeatedly.

A significant decrease in most behavioral parameters was recorded after exposure to 4n-NP and E<sub>2</sub>, suggesting that 4n-NP mimics the E<sub>2</sub> activity. Although exposed and non-exposed males spent the same time persecuting females, males treated with 4n-NP and E<sub>2</sub> showed a decrease in the number of copulatory attempts and copulas compared to non-exposed males. After 4n-NP and E<sub>2</sub> exposure a decrease of 50 % or more was recorded in the percentage of successful persecution (C/P) compared to control males. On the other hand, the effectiveness of copulatory attempts (C/CA) was lower in all treatments compared to the control group. Bisazza *et al.* (1996) highlighted the importance of copulatory attempts in viviparous fish behavior because only a small proportion of CA was successful. Therefore, any reduction in male sexual activity of *J. multidentata* could reduce the ability of males to impregnate females. Therefore, our results indicate that xenoestrogen exposure has a negative impact on the reproductive behavior of *J. multidentata*.

Several studies have shown the adverse effects of alkylphenols and E<sub>2</sub> on fish reproductive behavior, showing a generalized decline in male reproductive performance (Bayley *et al.*, 1999; Bjerselius *et al.*, 2001; Oshima *et al.* 2003). Doyle & Lim (2005) demonstrated a lower number of approaches and copulatory attempts in males of eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki* exposed to 20, 100 and 500 ng l<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> for 84 days. Effects of 4n-NP on fish reproduction have also been documented. Schoenfuss *et al.* (2008) reported that male *Pimephales promelas* exposed to a low concentration of 4n-NP exhibited an apparently beneficial effect on their nest holding ability (an excitatory response), whereas males exposed to high 4n-NP concentrations (6 to 60 µg l<sup>-1</sup>) suffered adverse consequences. Cardinali *et al.* (2004) showed that newly born guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 100 µg l<sup>-1</sup> 4n-NP for 90 days did not approach females and assumed sigmoid display. The alterations registered by the mentioned author are in agreement with our results.

The Gonadosomatic index (GSI) has been pointed out as a general measure of gonadal maturation based on the hypothesis that larger gonads indicate higher development (Schweer, 1992). Therefore, reduced testicular size could be an indication of hampered fertility (Jobling *et al.*, 1996). In the present study the GSI decreased significantly in all treatments. Males exposed to 4n-NP and 1000 ng L<sup>-1</sup> E<sub>2</sub> showed approximately a 50 % reduction in the GSI compared to the control group. Similar results have been reported in males of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, southern platyfish *Xiphophorus maculatus* and *P. reticulata* exposed to different concentrations of 4n-NP (Jobling *et al.*, 1996; Christiansen *et al.*, 1998; Cardinali *et al.*, 2004) and in common carp, *Cyprinus carpio* and goldfish *Carassius auratus* exposed to E<sub>2</sub> (Gimeno *et al.*, 1998; Bjerselius *et al.*, 2001).

Histological changes in gonads can be predictive of the reproductive success of the species under study and thus the population fitness (Van der Ven *et al.*, 2003). In the present study we showed several effects of 4n-NP and E<sub>2</sub> on the testicular structure of fish. A loss in cyst structure was recorded in all treatments. These alterations are in agreement with those recorded in viviparous eelpout *Zoarces viviparous* injected intraperitoneally with 100 µg l<sup>-1</sup> week<sup>-1</sup> 4n-NP (Christiansen *et al.*, 1998) and *X. maculatus* exposed to 80 and 280 µg l<sup>-1</sup> 4n-NP (Kinnberg *et al.*, 2000). Similar results have been reported after E<sub>2</sub> exposure (*P. reticulata*; 10 and 15 ng L<sup>-1</sup>) during 3.5 months (Nielsen & Baatrup, 2006) and *Danio rerio* exposed to 1, 10 and 100 nM E<sub>2</sub> during 21 days (Van der Ven *et al.*, 2003). The mechanism(s) by which 4n-NP affects testicular structure is still unknown. However, a possible explanation for these changes is an effect on Sertoli cells. These cells constitute the cyst wall where spermatogenesis takes place (Grier, 1981) and phagocytize discarded organelles (residual bodies) and cytoplasm during spermiation or phagocytize germ cells that degenerate in the normal course of spermatogenesis (Hunter & Donaldson, 1983). However, in the present work the multiple apoptotic bodies observed in Sertoli cells of immature cysts could be the result of the adverse effect of 4n-NP and E<sub>2</sub>, which indicates the increase in cellular apoptosis or necrosis of degenerated germ cells. These alterations have also been registered in testis of fathead minnow *P. promelas* exposed to E<sub>2</sub> (Miles-Richardson *et al.*, 1999), *Z. viviparous* exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> (Christiansen *et al.*, 1998) and Japanese medaka *Oryzias latipes* and *D. rerio* exposed to 4n-NP (Weber *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003). The clear loss of cyst structure in *J. multidentata* exposed to 4n-NP and E<sub>2</sub> is coincident with the decrease registered in GSI values. This decrease could be the result of the testis structure disorder together with an increase of cell apoptosis or necrosis registered in all treatments.

The liver analysis showed a significant increase in the HSI values in males exposed to 40 µg l<sup>-1</sup> of 4n-NP and 100 ng l<sup>-1</sup> of E<sub>2</sub>. This result could be an adaptive response to increase the capacity of the liver to detoxify foreign compounds (Goede & Barton, 1990). A similar variation of HSI was registered in newly born guppies exposed to a sublethal

concentration of 4*n*-NP for 90 days (Cardinali *et al.*, 2004) and in field studies, in sites contaminated with alkylphenols (Orlando *et al.* 1999).

Liver histopathology is employed as a sublethal test for evaluating the toxic effects of xenobiotic compounds. The liver is considered the target organ of chemically induced tissue injuries due to its function of xenobiotic biotransformer and its central role in the circulatory system (Hinton *et al.*, 2001). When toxic compounds exceed the detoxification level of the liver, high concentrations of a toxicant cause modifications to the normal hepatic structure. In the present work the hepatocytes of control males were homogeneous both in size and cytoplasm density. On the contrary, the liver histological assessment of exposed males revealed dose-related damages, varying from hydropic degeneration at low concentrations to focal necrosis at the highest concentrations. A loss of hepatic tissue structure and the presence of pyknotic nuclei for all the treatments was also observed. These changes could affect the normal liver function. Similar histological alterations in liver have been pointed out by several authors (Ballesteros *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2008, Hued *et al.*, 2012) who evaluated the effects of different toxics on liver histology.

In summary, the remarkable changes observed in reproductive behavior and histological changes induced by 4*n*-NP suggest that these parameters are sensitive and potentially useful biomarkers for the exposure to environmentally relevant estrogenic compounds. According to our results, 4*n*-NP produces similar effects on the natural hormone E<sub>2</sub>, indicating that 4*n*-NP exerts a clear estrogenic action on males. This compound has a negative influence on the male reproductive biology of *J. multidentata* and could potentially lead to long-term effects on wild populations that may not always be immediately evident.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Research Council (CONICET) from Argentina, *Secretaría de Ciencia y Técnica* (SECyT) and the National Agency of Scientific and Technological Promotion (ANPCyT – FONCyT). This work is part of the Ph.D. thesis of M.A. Roggio, who gratefully acknowledges a fellowship from CONICET. The authors wish to thank M.L.Ballesteros and R.P.Roggio for their field assistance and M. Sironi for his critical review of this manuscript.

**Recibido | Received:** 03 de junio de 2012

**Aceptado | Accepted:** 10 de septiembre de 2012

## REFERENCIAS

- Amé, M.V., M.V. Baroni, L.N. Galanti, J.L. Bocco & D.A. Wunderlin.** 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74: 79–1186.
- Anderson, R.O. & R.M. Newman.** 1996. Length, weight and associated structural indices (447–482). In: Murphy, B.R. & D.W. Willis (eds). *Fisheries techniques. American Fisheries Society Bethesda, Maryland.*
- Arcand-Hoy, L. & W.H. Benson.** 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 49–57.
- Ballesteros, M.L., G.E. Bianchi, M. Carranza & M.A. Bistoni.** 2007. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J. Environ. Sci. Health Part B* 42: 351–357.
- Ballesteros, M.L., P.E. Durando, M.L. Nores, M.P. Díaz, M.A. Bistoni & D.A. Wunderlin.** 2009. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 157: 1573–1580.
- Bayley, M., J.R. Jacob, L. Nielsen & E. Baatrup.** 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43: 68–73.
- Bisazza, A., A. Pilastro, R. Palazzi & G. Marin.** 1996. Sexual behaviour of immature male eastern mosquitofish: a way to measure intensity of intra-sexual selection. *J. Fish Biol.* 48: 726–737.
- Bisazza, A., S. Manfredi & A. Pilastro.** 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.
- Bjerselius, R., K. Lundstedt-Enkel, H. Olsén, I. Mayer & K. Dimberg.** 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β estradiol. *Aquat. Toxicol.* 53: 139–152.
- Cardinali, M., F. Maradonna, I. Olivotto, G. Bertoluzzi, G. Mosconi, A.M. Polzonetti-Magni & O. Carnevali.** 2004. Temporary impairment of reproduction in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reprod. Toxicol.* 18: 597–604.
- Cazenave, J., M.L. Nores, M. Miceli, M.P. Díaz, D.A. Wunderlin & M.A. Bistoni.** 2008. Changes in the swimming activity and glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res.* 42: 1299–1307.
- Christiansen T., B. Korsgaard & A. Jespersen.** 1998. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17 β estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout *Zoarces viviparus*. *Mar. Environ. Res.* 46: 141–144.
- Doyle, C.J. & R.P. Lim.** 2005. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17 β estradiol. *Ecotox. Environ. Saf.* 61: 392–397.
- Drèze, V., G. Monod, J.P. Cravedi, S. Biagianti-Risbourg & F. LeGac.** 2000. Effects of 4-Nonylphenol on sex differentiation and puberty in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology* 9: 93–103.
- Gimeno, S., H. Komen, S. Jobling, J. Sumpter & T. Bowmer.** 1998. Demasculinization of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.* 43: 93–109.
- Goede, R.R. & B.A. Barton.** 1990. Organismic indices and an autopsy-bases assessment as indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society Symposium* 8: 93–108.
- Grier, H.J.** 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am Zool.* 21: 345–357.
- Guyón N.F., M.A. Roggio, M.V. Amé, A.C. Hued,**

- M.E. Valdés, L.C. Giojalas, D.A. Wunderlin & M.A. Bistoni.** 2012. Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17 $\beta$ -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 935–940.
- Hinton, D.E., H. Segner & T. Braunbeck.** 2001. Toxic responses of the liver. In: Schlenk D, Benson WH (eds) Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts, vol 1. Taylor & Francis, London, pp 224–268.
- Hued, A.C. & M.A. Bistoni.** 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., S. Oberhofer & M.A. Bistoni.** 2012. Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup® Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 62:107–117.
- Hunter, G.A. & E.M. Donaldson.** 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish physiology. Academic Press, New York, pp. 223–303.
- Infostat.** 2003. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Jalabert B., J.F. Baroiller, B. Breton, A. Fosteier, F. Le Gac, Y. Guiguen & G. Monod.** 2000. Main neuro-endocrine, endocrine and paracrine regulations of fish reproduction and vulnerability to xenobiotics. *Ecotoxicology* 9: 25–40.
- Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne & J.P. Sumpter.** 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 194–202.
- Kime D.E.** 1999. Environmentally induced endocrine abnormalities in fish. *Issues in Environ. Sci. Technol.* 12: 27–48.
- Kinnberg, K.; B. Korsgaard, P. Bjerregaard & Jespersen, A.** 2000. Effects of Nonylphenol and 17 $\beta$  estradiol on vitelogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Jour. Exp. Biol.* 203: 171–181.
- Kinnberg, K.; B. Korsgaard & P. Bjerregaard.** 2003. Effects of octylphenol and 17 $\beta$ -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. *Comp Biochem. Physiol. C* 134: 45–55.
- Malabarba, L., R. Reis, R. Vari, Z. Lucena & C. Lucena.** 1998. Phylogeny and classification of Neotropical Fishes. *EDIPUCRS*, Porto Alegre, 603 pp.
- Martinez V.H. & G.A.M. Monasterio de Gonzo.** 2002. Testis morphology and spermatozeugma formation in *Jenynsia multidentata*. In: Parenti, L.R., Grier, H.J. 2004. Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. *Integ. Comp. Biol.* 44: 333–348.
- Metcalfe C.D., T.L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B.G. Koenig, C. Khan & R.J. Hughes.** 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.
- Miles–Richardson, S.R., S.L. Pierens, K.M. Nichols, V.J. Kramer, S.A. Snyder, J.A. Render, S.D Fitzgerald & J.P. Giesy.** 1999. Effects of Waterborne Exposure to 4–Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Res. A.* 80: 122–137.
- Mills, L.J. & C. Chichester.** 2005. Review of evidence:

- Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343: 1–34.
- Ministry of the Environment. Environmental Health Department. Government of Japan.** 2001. Report on the Test Results of Endocrine Disrupting of Nonylphenol on Fish (Draft).
- Nakamura, M., H. Nagoyam & T. Hirai.** 2002. Nonylphenol induces complete feminization of the gonad in genetically controlled all-male amago salmon. *Fish. Sci.* 68: 1387–1389.
- Nielsen, L. & E. Baatrup.** 2006. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 80: 140–148.
- Orlando, E.F., N.D. Denslow, L.C. Folmar & L.J. Guillette.** 1999. A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater Rivers in Florida. *Environ Health Perspect* 107:199–204.
- Oshima, Y., I.J. Kang, M. Kobayashi, K. Nakayama, N. Imada & T. Honjo.** 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17  $\beta$  estradiol. *Chemosphere* 50: 429–436.
- Pilastro, A., E. Giacomello & A. Bisazza.** 1997. Sexual selection for small size in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Proc R Soc Lond B* 264: 1125–1129.
- Rey Vázquez, G., F.J. Meijide, R.H. Da Cuña, F.L. Lo Nostro, Y.G. Piazza, P.A. Babay, V.L. Trudeau, M.C. Maggese & G.A. Guerrero.** 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. and Physiol.* C. 150: 298–306.
- Schoenfuss, H.L., S.E. Bartell, T.B. Bistodeau, R.A. Cediel, K.J. Grove, L. Zintek, K.E. Lee & L.B. Barber.** 2008. Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. *Aquat. Toxicol* 86: 91–98.
- Schweer, L.G.** 2002. Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test. EPA. Work assignment manager. U.S Environmental Protection Agency. Washington.
- Tsuda, T., A. Takino, K. Muraki, H. Harada & M. Kojima.** 2001. Evaluation of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. *Wat. Res.* 35: 1786–1792.
- Van Der Ven, L.T.M., P.W. Wester & J.G. Vos.** 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 908–913.
- Weber, L.P., Y. Kiparissis, G.S. Hwang, A.J. Niimi, D.M. Janz & C.D. Metcalfe.** 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol.* 131: 51–59.
- Weber, L.P., R.L. Jr. Hill & D.M. Janz.** 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat. Toxicol.* 63: 431–446.
- Yang, L., L.L. Shaoping Weng, Z. Feng & L. Tiangang L.** 2008. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71: 400–411.
- Ying, G.G., B. Williams & R. Kookana.** 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates — a review. *Environ. Int.* 28: 215–226.



*Environmental Toxicology and Chemistry in Latin America*IMPAIRMENTS IN AROMATASE EXPRESSION, REPRODUCTIVE BEHAVIOR, AND SPERM QUALITY OF MALE FISH EXPOSED TO 17 $\beta$ -ESTRADIOLNOELIA F. GUYÓN,<sup>†‡</sup> MARÍA A. ROGGIO,<sup>†‡</sup> MARÍA V. AMÉ,<sup>\*†§</sup> ANDREA C. HUED,<sup>†‡</sup> MARÍA E. VALDÉS,<sup>†‡</sup>||  
LAURA C. GIOJALAS,<sup>†#</sup> DANIEL A. WUNDERLIN,<sup>†‡</sup>|| and MARÍA A. BISTONI<sup>†</sup><sup>†</sup>Cátedra de Diversidad Animal II, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas, y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina<sup>‡</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina<sup>§</sup>Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina<sup>||</sup>Departamento de Química Orgánica-ISIDSA-ICYTAC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina<sup>#</sup>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 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>). Adult males were exposed to 0, 50, 100, and 250 ng/L E<sub>2</sub> over 28 d. The authors' findings demonstrate that E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>. In contrast to the molecular and behavioral responses, the condition factor, gonadosomatic index, and sperm quality were unaltered by E<sub>2</sub> exposure. The results from the present work suggest that E<sub>2</sub> affects some aspects of the reproductive biology of *J. multidentata*. These modifications in the reproductive biology caused by exposure to E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> on aromatase expression, sexual behavior, and sperm parameters in fish. Environ. Toxicol. Chem. 2012;31:935–940. © 2012 SETAC

**Keywords**—17 $\beta$ -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 naturals or synthetics), 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 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) [3,4], these levels are high enough to elicit adverse reproductive effects in fish [5–7].

Sex hormones, especially E<sub>2</sub>, 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 E<sub>2</sub> on aromatase expression, sex behavior, and sperm features in fish exposed to environmentally realistic levels of E<sub>2</sub>. 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>.

## 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> working solution by diluting it with ultrapure water.

### Determination of E<sub>2</sub> in water

The concentration of E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>. 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 E<sub>2</sub> 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 electrofisher, 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 E<sub>2</sub>, over 28 d. Although the concentrations used were relatively high, they correspond to environmentally realistic levels of E<sub>2</sub> 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 Spertrack 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  $\mu\text{l}$  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  $-80^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{g}$  RNA through nondenaturing agarose gel electrophoresis, using ethidium bromide as the staining agent. Nonspecific reverse transcription was performed with an Oligo (dT)<sub>15</sub> 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'CGGGCTGGTGGGAAGAACTC3'; *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*  $\beta$ -actin [28] as a housekeeping gene was tested. The  $\beta$ -Actin expression was found to be a useful internal standard for normalization of the *cyp19* data, mainly because changes in C<sub>t</sub> for the  $\beta$ -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

#### *E<sub>2</sub> water contents and mortality*

The stability of E<sub>2</sub> in solution was independent of the concentration tested, showing E<sub>2</sub> residual levels of  $44.7 \pm 6.2\%$  after 48 h. Even when decay in E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>/L treatment groups, two, three, and one male died, respectively. Consequently, the mortality observed was assumed to not be related to E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>), 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> on cyp19a1 genes*

Expression of the *cyp19a1b* gene was significantly enhanced after chronic exposure (28 d) to E<sub>2</sub>, 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 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) over 28 d<sup>a</sup>

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)

<sup>a</sup>The 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 E<sub>2</sub>-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 E<sub>2</sub>, respectively. Conversely, no effect on *cyp19a1a* gene expression was observed (Fig. 1B).

### DISCUSSION

The present study reveals that exposure to environmentally relevant concentrations of E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>.

Our findings demonstrate that exposure to E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>, probably involving differences in the response to E<sub>2</sub> among individuals. Conversely, no clear influence of E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> (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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> tested (100 and 250 ng/L), male reproductive performance was not significantly affected. Conversely, exposure to the lowest concentration of E<sub>2</sub> (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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> 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 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 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.

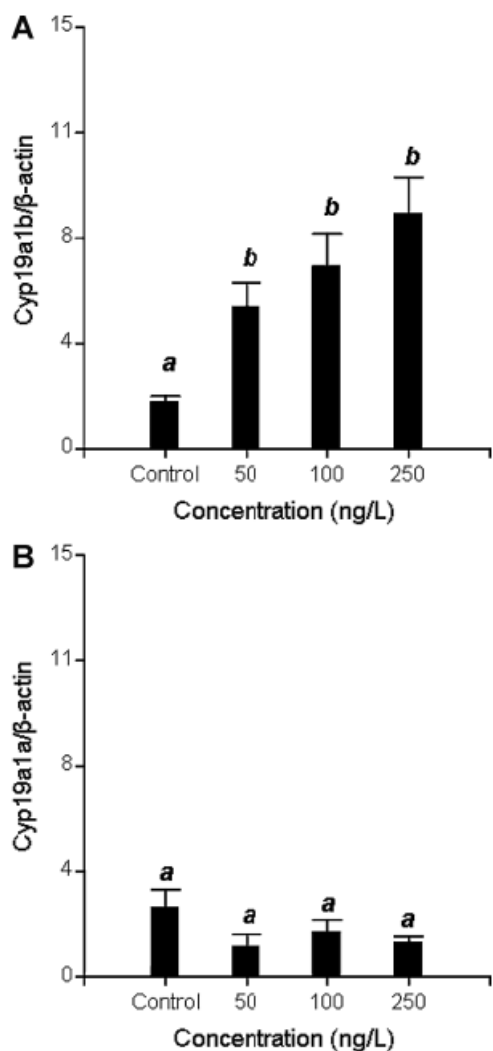


Fig. 1. The *cyp19a1* gene expression relative to  $\beta$ -actin in *Jenynsia multidentata* males exposed to different concentrations of 17 $\beta$ -estradiol by quantitative real-time polymerase chain reaction. (A) *Cyp19a1b* expression in brain. (B) *Cyp19a1a* expression in testis. Different letters 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 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>. 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 E<sub>2</sub> over 21 d did not affect the mean progressive velocity of *P. promelas* spermatozoa. Moreover, when males of *Oncorhynchus mykiss* were exposed to lower E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>, longer or full-life exposure may reverse this result. Our results suggest that the E<sub>2</sub> 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, Janbakhs 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 $\beta$ -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<sup>®</sup>) 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, Guigou F, 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, Linderoth 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. 17 $\beta$ ,20 $\beta$ -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.

# Effects of the Synthetic Estrogen 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on Aromatase Expression, Reproductive Behavior and Sperm Quality in the Fish *Jenynsia multidentata*

M. A. Roggio, N. F. Guyón, A. C. Hued, M. V. Amé, M. E. Valdés, L. C. Giojalas, D. A. Wunderlin & M. A. Bistoni

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

ISSN 0007-4861

Bull Environ Contam Toxicol  
DOI 10.1007/s00128-013-1185-2



**Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**

Volume 92 Number 2 February 2014

**Implementation of a Non-lethal Biopsy Punch Monitoring Program for Mercury in Smallmouth Bass, *Micropterus dolomieu* Lacepede, from the Eleven Point River, Missouri**  
J.R. Ackerson · M.J. McKee · C.J. Schmitt · W.G. Brumbaugh 125

**Metal Discharges by Sinaloa Rivers to the Coastal Zone of NW Mexico**  
M.G. Frías-Espicueta · R. Mejía-Cruz · I. Osuna López · M.D. Muy-Rangel · W. Rubio-Carrasco · M. Aguilar-Juárez · D. Voltolina 132

**Background Concentrations of Heavy Metals in Benthos from Transboundary Rivers of the Transbaikalia Region, Russia**  
A.P. Kuklin · P.V. Matafonov 137

**Three-Parameter Modeling of the Soil Sorption of Acetanilide and Triazine Herbicide Derivatives**  
M.R. Freitas · S.V.B.G. Matias · R.L.G. Macedo · M.P. Freitas · N. Venturin 143

**Occurrence and Partitioning of Phenolic Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) Between Surface Water and Suspended Particulate Matter in the North Tai Lake Basin, Eastern China**  
Y. Zhang · W. Meng · Y. Zhang 148

**Effects of Sediment Containing Coal Ash from the Kingston Ash Release on Embryo-Larval Development in the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820)**  
M.S. Greeley Jr. · L.R. Elmore · M.K. McCracken · R.M. Sherrard 154

**Fly Ash Addition Affects Microbial Biomass and Carbon Mineralization in Agricultural Soils**  
A.K. Nayak · A. Kumar · R. Raja · K.S. Rao · S. Mohanty · M. Shahid · R. Tripathy · B.B. Panda · P. Bhattacharyya 160

**Determination and Method Validation of Metamitron in Soil by RP-HPLC**  
S. Kumar · S. Tandon · N.K. Sand 165

**A Study on Cadmium Phytoremediation Potential of Water Lettuce, *Pistia stratiotes* L.**  
S. Das · S. Goswami · A.D. Talukdar 169

**Effects of Repeated Applications of Chlorimuron-Ethyl on the Soil Microbial Biomass, Activity and Microbial Community in the Greenhouse**  
J. Xu · Y. Zhang · F. Dong · X. Liu · X. Wu · Y. Zheng 175

**Effect of Combined Application of Systemic Herbicides on Microbial Activities in North Bengal Alluvial Soil**  
A.C. Das · S. Dey 183

**Assessment of Toxicity and Potential Risk of Butene-fipronil Using *Drosophila melanogaster*, in Comparison to Nine Conventional Insecticides**  
M.S. Arain · X.-X. Hu · G.-Q. Li 190

**Detrimental Effects of Metronidazole on Selected Innate Immunological Indicators in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.)**  
J. Han · L. Zhang · S. Yang · J. Wang · D. Tan 196

**Effects of Cadmium, Copper and Zinc on Growth of Four Isolated Algae from a Highly Polluted Argentina River**  
A. Magdaleno · C.G. Vélez · M.T. Wenzel · G. Tell 202

Contents continued on back cover 128 BECTA6 92(2) 125–252 (2014) ISSN 0007-4861

Springer To visit Springer on the Web: <http://www.springer.com>  
To e-mail the journal: [bect@springer.com](mailto:bect@springer.com)

**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Effects of the Synthetic Estrogen 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on Aromatase Expression, Reproductive Behavior and Sperm Quality in the Fish *Jenynsia multidentata*

M. A. Roggio · N. F. Guyón · A. C. Hued ·  
M. V. Amé · M. E. Valdés · L. C. Giojalas ·  
D. A. Wunderlin · M. A. Bistoni

Received: 27 September 2013 / Accepted: 21 December 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** The synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) has been increasingly detected in sewage effluents in the last two decades. The aim of the present study was determined if EE<sub>2</sub> exposure adversely affected reproduction in internally fertilizing fish species *Jenynsia multidentata*. Sexual behavior, brain and gonadal aromatase expression as well as sperm quality were evaluated. The brain aromatase expression, reproductive behavior, spermatozoa viability and gonadosomatic index were sensitive biomarkers of EE<sub>2</sub> effects on this species. The condition factor, hepatosomatic index, gonadal aromatase expression,

sperm count and sperm velocities were unaltered after EE<sub>2</sub> exposure. The present work highlights the importance of using a combination of several biomarkers to study the effects of estrogenic compounds, especially when trying to link these results to potential population-level effects.

**Keywords** Endocrine disruption · Xenoestrogen compounds · One-sided livebearing fish · Sexual activity · Aromatase expression · Sperm parameters

M. A. Roggio · N. F. Guyón · A. C. Hued · M. A. Bistoni  
Fac. Cs. Ex. Fís. y Nat., Universidad Nacional de Córdoba,  
Av. Vélez Sarsfield 299, CP X5000JJC Córdoba, Argentina

A. C. Hued · M. E. Valdés · M. A. Bistoni (✉)  
Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA, CONICET),  
Córdoba, Argentina  
e-mail: mbistoni@efn.uncor.edu

M. V. Amé  
Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, Fac. Cs.  
Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Medina Allende y  
Haya de la Torre, CP X5000HUA Córdoba, Argentina

M. E. Valdés  
Fac. Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Medina  
Allende y Haya de la Torre, CP X5000HUA Córdoba, Argentina

L. C. Giojalas  
Centro de Biología Celular y Molecular, Edificio de  
Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, Universidad  
Nacional de Córdoba, Avda. Vélez Sarsfield 1611,  
CP X5016GCA Córdoba, Argentina

D. A. Wunderlin  
Departamento de Química Orgánica-ISIDSA-ICYTAC, Fac. Cs.  
Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Juan Filloy  
s/n, CP 5016 Córdoba, Argentina

Many natural and anthropogenic chemicals discharged into freshwater and estuarine systems are capable of disrupting the endocrine system of aquatic organisms. One kind of endocrine disrupting chemicals (EDCs) are estrogens (either natural or synthetic), which bind to estrogen receptors and are able to induce biological changes affecting the animal development and reproduction.

The 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>), an active component of oral contraceptive pills, has been widely chosen to evaluate the effect of estrogenic compounds on reproduction. This is due to its presence in the environment as well as its confirmed effects on the reproductive endocrine system via estrogen receptor-mediated pathways (Metcalf et al. 2001). The steroid's estrogenic potency (up to 2–5 times higher than the endogenous 17 $\beta$ -estradiol) in combination with its environmental persistence and the ability to bioconcentrate in fish tissue (Nash et al. 2004) make EE<sub>2</sub> a potential risk to fish and other aquatic organisms. EE<sub>2</sub> is widely distributed in surface waters and sewage effluents with detectable concentrations ranging from <1 to 831 ng/L (Desbrow et al. 1998; Wise et al. 2011). Even at low concentrations, EE<sub>2</sub> affects different aspects of fish reproductive biology (Söffker and Tyler 2012).

Reproductive behavior has been demonstrated to be a sensitive indicator of endocrine disruption (Clotfelter et al.

2004) and additionally, it provides an important measure of neuroendocrine function in fish (Gore 2008). Another important target for EDCs is brain aromatase (*cyp19a1b*), which catalyses the conversion of androgens into estrogens. It has been observed that changes in the expression of this enzyme after chemical exposure lead to altered reproductive behavior in male fish (Guyón et al. 2012). Finally, the sperm quality, which plays a key role in the fertilization process, could be a useful tool in the early identification of potential stressors of a natural population, particularly when they are not so harmful as to be detected by acute toxicity tests (Kime and Nash 1999). The one-sided livebearing fish, *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) has emerged as an effective field and laboratory model to identify the endocrine-disrupting potential of xenoestrogen compounds. This is due to its ability to adapt to a wide variety of environments (Hued and Bistoni 2005), its sexual dimorphism and its reproductive behavior which involves internal fertilization and coercion (Bisazza et al. 2000).

The aim of the present study was to evaluate the effects of EE<sub>2</sub> on reproductive aspects of *J. multidentata*, through the assessment of different biomarkers. This is the first report that evaluates the effects of EE<sub>2</sub> on *cyp19a1* gene expression, male sexual behavior, sperm count, motility and viability and establishes potential connections between changes in sexual behavior and aromatase expression.

## Materials and Methods

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) (99.1 % purity) was obtained from Sigma-Aldrich. The EE<sub>2</sub> stock solution ( $6.7 \times 10^{-4}$  M) was prepared in acetone (Merck Chemist).

Eighty adult males of *J. multidentata* (mean standard length  $29.01 \pm 2.33$  mm and mean body weight  $0.49 \pm 0.13$  g) were collected from an unpolluted site (Yuspe River, Córdoba, Argentina) using a backpack electrofisher, during a reproductive season (February 2011). Fish were acclimatized for 30 days at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  under a constant 12:12 h light:dark photoperiod and fed twice a day with commercial fish pellets (TetraMin<sup>®</sup>).

Five adult males were exposed together in a glass aquarium containing 5 L of water supplied with 0 (control group), 10, 75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub>, during 28 days. Four replicates were made for each treatment. Taking into account the half-life of EE<sub>2</sub> ( $33 \pm 13$  h) (Nagpal and Meays 2009), the test solutions were renewed daily. The concentration of EE<sub>2</sub> in water solutions was verified by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry using a triple quadrupole analyzer, with an electrospray ionization source operated in positive mode (HPLC–ESI–MS/MS) after sample extraction (Yan et al. 2009; Vulliet et al. 2008). Recovery

percentages were evaluated from spiked aquarium water samples with 50 ng/L EE<sub>2</sub>. The recovery percentage obtained was 59 % affording a quantification limit of 5 ng/L. Samples were collected before and after water replacement.

The reproductive behavior was evaluated in 50 % of males for each concentration and control group. After 28 days of exposure, each male was transferred to a 3 L glass aquarium and then paired with an unexposed female to record sexual behavior. Ten minutes after female introduction, male sexual activity was recorded for 20 min using a video recorder (Sony CCD TR818). Based on the normal reproductive behavior described by Bisazza et al. (2000), the following variables were estimated: Persecution time (PT), number of persecutions (P), number of copulatory attempts (CA) and number of copulations (C). Sustained copulations, defined as the direct contact through the gonopodium with female gonopore in a prolonged way for at least 5 s were also registered. To evaluate the efficiency of male sexual behavior, the following relations were calculated: CA/PT, CA/P, C/PT, C/P and C/CA. In those individuals where no sign of sexual behavior was observed, the female was removed and replaced by another one, up to four times.

Sperm parameters were evaluated in all males: exposed (E) and not exposed (NE) to stimulus female. For sperm collection all males were anaesthetized in a water solution of MS-222 (5 g/L) (Tricaine methanesulfonate; Sigma-Aldrich). In order to obtain the sperm samples and to assess sperm movement the method described in Roggio et al. (2012) was employed. The sperm kinetic parameters calculated were: (1) straight line velocity (VSL) ( $\mu\text{m/s}$ ): straight distance traveled by the spermatozoon from the beginning to the end of its track over time; (2) curvilinear velocity (VCL) ( $\mu\text{m/s}$ ): length of the spermatozoon track over measurement time and (3) linearity (LIN): the quotient between VSL and VCL which indicates the grade of straightness of a track (expressed in percentage), where values near 100 % represent a linear movement and values near 0 %, a more erratic path.

Fifteen minutes after sample collection, spermatozoa viability was estimated for each male according to World Health Organization (1999). One hundred cells were randomly chosen in order to register the number of unstained mobile and immobile cells and stained spermatozoa (died cells). From this, the percentage of spermatozoa viability was estimated for each male.

The sperm sample was tenfold diluted with distilled water to immobilize the cells. An aliquot was placed in an “improved Neubauer chamber” haemocytometer and counting sperm by duplicate. The total amount of spermatozoa was expressed by microlitre of sample.

Fish were sacrificed by breaking the spinal cord and then measured (standard length) and weighted in order to estimate the Fulton condition factor (K) (Anderson and

Newman 1996). Liver and gonads were excised and weighted to calculate hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI) respectively (Goede and Barton 1990).

For *cyp19a1* mRNA quantification, brain and gonads were snap-frozen in liquid nitrogen and stored in RNAlater (QIAGEN) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Non-specific reverse transcription was performed from individual tissue total RNA according to Ame et al. (2009). Quantitative PCR was performed to amplify and measure the transcript abundance of *cyp19a1a* in testis, *cyp19a1b* in brain and  $\beta$ -actin in both as reference gen (Ame et al. 2009). Primers sequences for *cyp19a1* mRNA quantification were obtained from Sigma-Aldrich (*cyp19a1a* forward: 5'-CAAAGGCACAAATATCATCTTGA-3' reverse: 5'-CGGGCTGGTGAAGAACTC-3'; *cyp19a1b* forward: 5'-GAAACATCA TTAACAAAAGTGAAGAACTG-3' reverse: 5'-GAGAGCTCCCCATGGTTCTG-3'). Relative gene expression to *J. multidentata*  $\beta$ -actin was analyzed by using the standard curve method (Larionov et al. 2005).

Statistical analyses were carried out using Infostat Software Package (InfoStat 2002). The variables were analyzed through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the DGC (Di Rienzo, Guzmán and Casanoves) post-test. Correlations between sperm count and number of copulations were tested using Pearson correlation tests.

## Results and Discussion

The stability of EE<sub>2</sub> in solution was in accordance with previously reported half live (Nagpal and Meays 2009). After 24 h of exposure EE<sub>2</sub> residual levels were between 15 and 55 % for the higher concentrations tested (75 and 150 ng/L; Table 1). Residual levels at 10 ng/L EE<sub>2</sub> were below the limit of detection. Even when decay in EE<sub>2</sub> concentration was measured, the nominal values are used throughout the paper.

No males died in the control group during the experimental time. In the 10, 75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub> treatment groups, one, three and two males died, respectively. Fish exposed to 75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub> showed a significant GSI decrease respect to control group and those exposed to 10 ng/L (Table 1). These results indicate a testis reduction which is consistent with other authors who obtained similar results after EE<sub>2</sub> exposure (concentrations ranging 5–300 ng/L EE<sub>2</sub>) (Martyniuk et al. 2006; Velasco-Santamaria et al. 2010). On the other hand, no significant differences in K as well as in HSI were observed among treatments (Table 1). This is in concordance with the results registered for *Danio rerio* exposed to 1, 10, and 100 ng/L EE<sub>2</sub> for 14 days (Versonnen and Janssen 2004) and for *Zoarcis viviparus* exposed to 5 ng/L for 21 days

(Velasco-Santamaria et al. 2010). Nevertheless, the absence of differences is in disagreement with other published studies. Zha et al. (2007) have registered increase in HSI values, while others authors have described a significant decrease (Saaristo et al. 2010).

Estrogen exposure affected several reproductive behavioral parameters. All the control males were sexually active in the presence of the female, whereas the proportion of males which exhibit sexual behavior decreased after EE<sub>2</sub> exposure: 60 % at 10 ng/L, 70 % at 75 ng/L and 50 % at 150 ng/L. Moreover, 90 % of control males began female approaches immediately after the female was introduced into the glass aquarium. This situation was not observed in fish exposed to EE<sub>2</sub>, where it was necessary a female replacement in 33 % of the cases at the lowest concentration and 60 % at 75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub>. On the other hand, it is noteworthy that the proportion of males which showed sustained copulations was 60 % for the control group, 20 % at 10 ng/L EE<sub>2</sub> and none for the higher concentrations of EE<sub>2</sub>. Most of the reproductive variables analyzed decreased significantly in males exposed to EE<sub>2</sub> (Table 1). PT, CA and C values were significantly lower at all the concentrations tested. It is noticeable that the highest reduction was registered at 75 ng/L EE<sub>2</sub>. The relations among the four variables showed a significant decrease in C/PT, CA/P and C/P at all concentrations. At 75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub> the copulation attempt effectiveness (C/CA) decreased more than 50 % respect to the males exposed to 10 ng/L and control group.

Since aromatase expression was not affected by previous reproductive behavior ( $F = 0.53$ ;  $p = 0.5$ ), all males were assessed all together. No significant effect of EE<sub>2</sub> on the transcription abundance of *cyp19a1b* gene was registered at the lowest concentration tested (10 ng/L EE<sub>2</sub>). However, exposure to 75 ng/L EE<sub>2</sub> caused a 3.75-fold significant increase of brain *cyp19a1b* gene expression, compared to the control group. This difference was not so noticeable at 150 ng/L EE<sub>2</sub>, where a 1.92-fold significant increase of brain *cyp19a1b* gene expression was observed (Fig. 1A). Conversely, no effect on gonadal *cyp19a1a* gene expression was registered after EE<sub>2</sub> exposure (Fig. 1B). An upregulation of *cyp19a1b* expression and/or brain aromatase activity by estrogenic compounds has been demonstrated in other fish species (Lyssimachou et al. 2006). However, these compounds have failed to modulate the expression of the ovarian aromatase (*cyp19a1a*). This could be explained by the lack of the consensus estrogen response element (ERE) in the promoter region of the gonadal variant as it has been already observed in some teleost species (Tchoudakova et al. 2001). In our study we registered a clear *cyp19a1b* increase at 75 ng/L EE<sub>2</sub>, and a decrease at the highest concentration tested (150 ng/L), although it remained above control values. According to

**Table 1** Mean values and standard deviation of biomarkers measured in *J. multidentata* males exposed to different concentrations of 17 $\alpha$ -ethynilestradiol during 28 days

	Control	10 ng/L	75 ng/L	150 ng/L
<i>Somatic indexes</i>				
K	1.95 $\pm$ 0.14	1.98 $\pm$ 0.03	1.99 $\pm$ 0.03	1.89 $\pm$ 0.04
HSI	2.47 $\pm$ 0.64	2.59 $\pm$ 0.20	2.39 $\pm$ 0.13	2.53 $\pm$ 0.25
GSI	2.74 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	2.55 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.90 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
<i>Behavioral parameters</i>				
PT	72.40 $\pm$ 6.80 <sup>a</sup>	36.80 $\pm$ 10.89 <sup>b</sup>	20.80 $\pm$ 9.04 <sup>b</sup>	42.2 $\pm$ 11.34 <sup>b</sup>
P	23.83 $\pm$ 1.96	18.60 $\pm$ 5.53	10.80 $\pm$ 4.22	17.60 $\pm$ 3.97
CA	45.60 $\pm$ 8.78 <sup>a</sup>	18.00 $\pm$ 16.35 <sup>b</sup>	5.40 $\pm$ 0.81 <sup>c</sup>	18.20 $\pm$ 6.76 <sup>b</sup>
C	17.60 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	3.25 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	2.80 $\pm$ 1.59 <sup>b</sup>
P/PT	0.34 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.04
CA/PT	0.62 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.07
C/PT	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
CA/P	1.98 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
C/P	0.80 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
C/CA	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
<i>Sperm parameters</i>				
<i>Motility</i>				
VSL ( $\mu$ m/s)	100.81 $\pm$ 4.32	105.42 $\pm$ 3.57	102.54 $\pm$ 3.87	109.37 $\pm$ 2.88
VCL ( $\mu$ m/s)	102.97 $\pm$ 4.54	108.50 $\pm$ 3.57	106.94 $\pm$ 4.44	106.11 $\pm$ 7.79
LIN (%)	99.95 $\pm$ 0.05	99.66 $\pm$ 0.21	98.89 $\pm$ 0.54	99.49 $\pm$ 0.35
<i>Viability (%)</i>				
MLS	82.09 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	75.35 $\pm$ 4.34 <sup>a</sup>	76.16 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	65.34 $\pm$ 3.77 <sup>b</sup>
ILS	12.11 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	18.85 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	17.31 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>	24.09 $\pm$ 3.99 <sup>b</sup>
DS	5.84 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	6.15 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	6.53 $\pm$ 2.49 <sup>a</sup>	10.57 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>
<i>Count (cell/<math>\mu</math>L)</i>				
Count <sub>NE</sub>	2,387 $\pm$ 564	2,199 $\pm$ 744	2,221 $\pm$ 78	1,983 $\pm$ 629
Count <sub>E</sub>	893 $\pm$ 101	1,290 $\pm$ 187	1,803 $\pm$ 782	1,704 $\pm$ 595
<i>EE<sub>2</sub> concentration (ng/L)</i>				
Before renewal	<LOD	<LOD	11 $\pm$ 4	83 $\pm$ 10
After renewal	<LOD	5 $\pm$ 6	64 $\pm$ 8	127 $\pm$ 15

The values are expressed as means  $\pm$  SDs.

Different letters indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ )

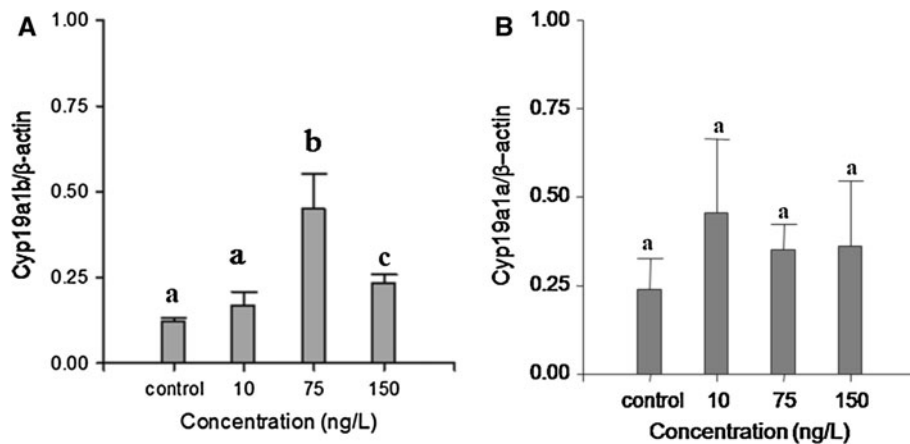
K condition factor, HSI hepatosomatic index, GSI gonadosomatic index, PT persecution time (s), P number of persecutions, CA number of copulatory attempts, C number of copulation and different relations calculated among these variables, VSL straight line velocity, VCL curvilinear velocity, LIN Linearity, MLS motile live spermatozoa, ILS immotile live spermatozoa, DS dead spermatozoa ( $n = 20$ ), Count<sub>NE</sub> sperm count of males were not exposed to female ( $n = 10$ ), Count<sub>E</sub> sperm count of males were exposed to female ( $n = 10$ )

other authors, this may be due to alternative regulatory pathways of brain aromatase that are probably triggered by levels of estrogens above a certain threshold after which no longer effects are observed (Melo and Ramsdell 2001). Therefore at certain levels EE<sub>2</sub> could elicit responses that do not behave in a dose–response manner and the effects at low doses do not predict the ones at high doses (Vandenberg et al. 2012).

While a detailed description of the role of aromatization process on the regulation of fish sexual behavior is still not

completely understood, it has been observed that alterations in brain aromatase expression or activity during exposure to EDCs results in impaired sexual behavior in male fish (Guyón et al. 2012). Our results showed impairment in male reproductive behavior after EE<sub>2</sub> exposure (Table 1). It is noticeable that at the higher concentrations (75 and 150 ng/L EE<sub>2</sub>) it was necessary a 60 % of female replacement to cause a male stimulation. Moreover, sustained copulations were not registered at these concentrations. The most deleterious effect of EE<sub>2</sub> on

**Fig. 1** Cyp19a1 gene expression relative to  $\beta$ -actin in *J. multidentata* males exposed to different concentrations of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by quantitative real-time PCR method. **A** Cyp19a1b expression in brain. **B** Cyp19a1a expression in testis (n = 20). Data are indicated as mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences among tested groups ( $p < 0.05$ )



behavior was observed at 75 ng/L, in coincidence with the peak of brain aromatase expression. Several studies have documented the adverse effects of exogenous chemicals with estrogenic activity on fish reproductive behavior, showing a generalized declination in male reproductive performance and a behavioral demasculinization (Martynovic et al. 2007). Melo and Ramsdell (2001) reported a sexual dimorphism in the localization of brain aromatase activity in *Oryzias latipes*, in accordance with the suggested role of aromatase in the regulation of male or female sex-specific behaviors. They also demonstrated that after E<sub>2</sub> exposure, male brain phenotype suffered a feminization which included elevation in total levels of aromatase activity and increased activity in brain areas in which females usually show higher levels. Following the proposal of those authors, our results in *J. multidentata* showed that EE<sub>2</sub> treatment strongly induced expression of the *cyp19a1b* gene and those higher aromatase levels could probably cause male brain feminization of aromatase distribution, which is reflected in the registered reduction in male sexual behavior. The impairment of sexual behavior that we registered in *J. multidentata* after the exposure to environmentally relevant EE<sub>2</sub> concentrations pose a risk to the successful reproduction of this species, since *J. multidentata* presents a coercive behavior and therefore males take an active role in reproduction.

Spermatozoa motility and viability were not affected by previous reproductive behavior; therefore, males exposed and not exposed to females were assessed together for statistical analyses. No significant differences in VSL, VCL and linearity were registered between treatments and between treatments and control group. These findings support the results from a previous study conducted by Guyón et al. (2012) where males of *J. multidentata* exposed 28 days to natural hormone E<sub>2</sub> (50–250 ng/L) did not showed changes in sperm velocity.

Spermatozoa viability was negative affected by EE<sub>2</sub> exposure. At the highest concentration tested (150 ng/L) it was registered a significant decrease in the percentage of

motile live spermatozoa (MLS) and an increase in immotile live (ILS) and dead (DS) spermatozoa, respect to other concentrations and control group (Table 1). This reduction implies that a lower percentage of spermatozoa could be displacing to the oocyte and therefore it reduces the fertilization success. According to these results the sperm viability could be considered a key parameter in both ecological and toxicological environmental evaluation and a “quick response tool” in the presence of potentially hazardous events that may adversely affect an aquatic ecosystem (Fabbrocini et al. 2010).

The analysis of variance revealed an interaction between sperm count and the previous sexual activity. Control males who exhibited sexual behavior had a lower sperm count than those unexposed to females (Table 1). This result is correlated with the highest percentage of copulations recorded in this group ( $r^2 = -0.75$ ;  $p = 0.003$ ). This negative correlation was not registered at any EE<sub>2</sub> concentration evaluated due to the lower percentage of copulations registered in these individuals (including sustained copulas). Considering these results, in order to establish the specific effect of EE<sub>2</sub> on sperm count we only considered those individuals who were not exposed to a female. The analysis of variance showed that sperm count of individuals unexposed to a female was not affected by EE<sub>2</sub> exposure.

In summary, the remarkable changes observed in reproductive behavior at the lower EE<sub>2</sub> concentration suggest that male sexual activity is the most sensitive and potentially useful biomarkers for exposure to environmentally relevant estrogenic compounds. Among other parameters, *cyp19a1b* gene expression, GSI and sperm viability seemed to be good biomarkers of EE<sub>2</sub> exposure. Our results also suggest that *J. multidentata* could be considered as a useful model for examining the effects of estrogenic compounds. The present work highlights the importance of using a combination of several biomarkers when studying effects of estrogenic compounds, and especially when extrapolating effects of EDC on wild fish populations.

**Acknowledgments** Authors wish to acknowledge the assistance of the Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and the Universidad Nacional de Córdoba and Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT), who provided support for this research.

## References

- 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(9):1179–1186
- Anderson RO, Newman RM (1996) Length, weight and associated structural indices. In: Murphy BR, Willis DW (eds) Fisheries techniques. American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp 447–482
- Bisazza A, Manfredi S, Pilastro A (2000) Sexual competition, coercive mating and mate assessment in the one-sided livebearer, *Jenynsia multidentata*: are they predictive of sexual dimorphism? *Ethology* 106(11):961–978
- Clotfelter ED, O'Neal DM, Gaudio JM, Casto JM, Parker-Renga IM, Snajdr EA, Duffy DL, Nolan V Jr, Ketterson ED (2004) Consequences of elevating plasma testosterone in females of a socially monogamous songbird: evidence of constraints on male evolution? *Horm Behav* 46(2):171–178
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpster JP, Waldock M (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32(11):1549–1558
- Fabbrocini A, Di Stasio M, D'Adamo R (2010) Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: a new approach to pore water quality assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 73(7):1588–1595
- Goede RR, Barton BA (1990) Organismic indices and an autopsy-bases assessment as indicators of health and condition of fish. *Am Fish Soc Symp* 8:93–108
- Gore AC (2008) Neuroendocrine systems as targets for environmental endocrine-disrupting chemicals. *Fertil Steril* 89(2):101–102
- Guyón NF, Roggio MA, Amé MV, Hued AC, Valdés ME, Giojalas LC, Wunderlin DA, Bistoni MA (2012) Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17 $\beta$ -estradiol. *Environ Toxicol Chem* 31(5):935–940
- Hued AC, Bistoni MA (2005) Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiología* 543:279–298
- InfoStat (2002) Grupo InfoStat Profesional. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Kime DE, Nash JP (1999) Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Sci Total Environ* 233(1–3):123–129
- Larionov A, Krause A, Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 6:62
- Lyssimachou A, Jenssen BM, 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 ethinylestradiol and antifoulant tributyltin. *Toxicol Sci* 91(1):82–92
- Martinovic D, Hogarth WT, Jones RE, Sorensen PW (2007) Environmental estrogens suppress hormones, behavior, and reproductive fitness in male fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 26(2):271–278
- Martyniuk CJ, Xiong H, Crump K, Chiu S, Sardana R, Nadler A, Gerrie ER, Xia X, Trudeau VL (2006) Gene expression profiling in the neuroendocrine brain of male goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17 alpha-ethinylestradiol. *Physiol Genomics* 27(3):328–336
- Melo AC, Ramsdell JS (2001) Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. *Environ Health Perspect* 109(3):257–264
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, 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(2):297–308
- Nagpal NK, Meays CL (2009) Water quality guidelines for pharmaceutically-active-compounds (PhACs): 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). Ministry of Environment Province of British Columbia. Technical appendix
- Nash JP, Kime DE, Van der Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR (2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ Health Perspect* 112(17):1725–1733
- Roggio MA, Hued AC, Bistoni MA (2012) Effects of 4n-nonylphenol exposure on the reproductive behavior and testis histology of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae: cyprinodontiformes). *Nat Neotrop* 43:31–45
- Saaristo M, Craft JA, Lehtonen KK, Lindström K (2010) Exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol impairs courtship and aggressive behaviour of male sand gobies (*Pomatoschistus minutus*). *Chemosphere* 79:541–546
- Söffker M, Tyler CR (2012) Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences. *Crit Rev Toxicol* 42(8):653–668
- Tchoudakova A, Kishida M, Wood E, Callard GV (2001) Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78(5):427–439
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Jacobs DR, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378–455
- Velasco-Santamaria YM, 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(Suppl):67–69
- Versonnen BJ, Janssen CR (2004) Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 19(3):198–206
- Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot MF (2008) Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1:84–91
- Wise A, Brien K, Woodruff T (2011) Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environ Sci Technol* 45:51–60
- World Health Organization (1999) Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th edn. Published on behalf of the World Health Organization, Cambridge University Press, Cambridge
- Yan W, Zhao L, Feng Q, Wei Y, Lin JM (2009) Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC–MS. *Chromatographia* 69:621–628
- Zha J, Wang Z, Wang N, Ingersoll C (2007) Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethinylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere* 66(3):488–495

## Spermatozoa characterization in the one-sided livebearing *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae)

María A. Roggio<sup>1</sup>, María E. Teves<sup>2</sup>, Andrea C. Hued<sup>1</sup>, Laura C. Giojalas<sup>3</sup> & María A. Bistoni<sup>1\*</sup>

1. Cátedra de Diversidad Animal II, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba - Instituto de Diversidad y Ecología Animal, CONICET, Av. Vélez Sarsfield 299, CP X5000JJC, Córdoba, Argentina; angelinaroggio@gmail.com, achued@efn.uncor.edu, mbistoni@efn.uncor.edu
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, 23298, USA; eugeteves@yahoo.com.ar
3. Centro de Biología Celular y Molecular, Edificio de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA, Córdoba, Argentina; lcgiojalas@com.uncor.edu

\* Correspondence

Received 01-III-2013. Corrected 09-II-2014. Accepted 03-III-2014.

**Abstract:** Several sperm parameters have been employed as useful tools to evaluate fish fertility. Within teleosts, approximately 3% of fish species are known to be viviparous. The Order Cyprinodontiformes includes several species with internal fertilization, and within this group most of the studies about sperm quality have been mainly focused on the Poeciliidae family. The livebearing fish *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) inhabits an extensive area of the Neotropical region and it has been used as a useful fish laboratory model to evaluate the effects of xenobiotics through different biomarkers. The present work characterized the sperm of this species through a simple protocol of semen collection. Sperm population showed linearity greater than 89% and 70% of fish have a straight line and curvilinear velocity valued between 50 and 100 $\mu$ m/s. Although 85% of individuals showed a proportion of live sperm higher than 60%, the male population had a high degree of heterogeneity in its sperm count. Morphometry analyses showed a total sperm and head lengths of 46.66 $\pm$ 2.06 $\mu$ m and 3.46 $\pm$ 0.41 $\mu$ m, respectively. A rather long midpiece region (9.12 $\pm$ 0.65 $\mu$ m) was registered, which may indicate high energy-producing capabilities of the spermatozoa. This study established basic parameter values which could be useful for evaluating reproductive potential of *J. multidentata* populations. Rev. Biol. Trop. 62 (3): 997-1006. Epub 2014 September 01.

**Key words:** sperm parameters, morphometry, sperm motility, sperm viability, viviparous fish, *Jenynsia multidentata*.

Spermatozoa structure in teleost species reveals a high diversity, mainly at the family level. The spermatozoa of internal and external fertilizers differ in their organization. External fertilizers have a simpler organization, showing an ovoid or spherical nucleus, and a small midpiece containing only few mitochondria, whereas species with internal fertilization have an elongated nucleus and a relatively bigger midpiece (Lahnsteiner & Patzner, 2008; Jamieson, 1991, 2009).

Within teleosts, approximately 3% of fish species are known to be viviparous (Wourms,

2005). Particularly, the order Cyprinodontiformes includes several species with internal fertilization (Parenti, 2005). Within this order, most of the studies about sperm characteristics have focused on the family Poeciliidae (Grier, 1973, 1975; Constantz, 1984; Meffe & Snelson, 1989; Meyer & Lydeard, 1993; Evans, Pilastro, & Ramnarine, 2003), whereas within the Anablepidae family, the few existing studies have focused on sperm ultrastructure only (Dadone & Narbaitz, 1967; Greven & Schmahl, 2006). Thus, spermatozoa

morphometry and dynamic parameters within this family are still unknown.

The one-sided livebearing fish, *Jenynsia multidentata* (Jenyns 1842) (Anablepidae) has a wide distribution in an extensive area of the Neotropical region (Ghedotti, 1998) inhabiting both polluted and non-polluted areas (Hued & Bistoni, 2005). It presents sexual dimorphism; males are smaller than females and have a modified anal fin, called gonopodium (Galindo-Villegas & Sosa-Lima, 2002). Mating behavior is coercive; males approach females from behind and try to thrust their copulatory organ in the female genital pore (Bisazza, Manfredi, & Pilastro, 2000). It is important to note that this species has been used as a useful fish laboratory model to evaluate the effects of xenobiotics through different biomarkers (Cazenave et al., 2008; Amé, Galanti, Bocco, & Wunderlin, 2009; Hued, Oberhofer, & Bistoni, 2012). On the other hand, this fish is considered a useful species in controlling mosquito populations since *J. multidentata* feeds on mosquito larvae (Ringuelet, Aramburu, & de Aramburu, 1967; Martí, Azpelicueta, Tranchida, Pelizza, & Garcia, 2006).

Spermatozoa characterization offers a useful tool to evaluate the fertility potential of male fish. It has been demonstrated that sperm quality could be determined by sperm count, motility, viability and morphology (Kime & Nash, 1999; Burness, Casselman, Schulte-Hostedde, Moyes, & Montgomerie, 2004; Gage et al., 2004; Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004; Snook, 2005). The main goal of the present study was to characterize the spermatozoa of *J. multidentata* by dynamic parameters, sperm count, viability and morphometry, through a simple protocol of semen collection and to establish basic parameter values for the evaluation of the reproductive potential of *J. multidentata* populations.

## MATERIALS AND METHODS

**Semen collection:** Forty-five adult males of *J. multidentata* (mean standard length:  $28.83 \pm 3.41$  mm; mean body weight:

$0.479 \pm 0.131$  g) were captured by a backpack electrofisher from a site on Yuspe River, Córdoba, Argentina ( $31^{\circ}14'1''8$  S -  $64^{\circ}31'14''$  W), during a reproductive season (September to April) (Mai, Garcia, Vieira, & Mai, 2007; Bianco, Guyón, & Bistoni, 2011). Fish were transported to the laboratory in plastic water tanks (20L). Samplings were performed every two months. Males were acclimated during two weeks under controlled laboratory conditions (temperature at  $21^{\circ}\text{C}$ ; light/dark cycle of 12:12 h) and were fed daily with commercial fish food (TetraMin®). At the end of the acclimatization period, each male was anaesthetized in a water solution of MS-222 (5g /L) (Tricaine methanesulfonate; Sigma Aldrich). The gonopodium was swung forward and introduced in a capillary tube. In order to release sperm, gentle pressure was applied to the side of the abdomen using a cotton tip. The sperm was collected at the base of the gonopodium. The spermatozoa of this species are not packaged as spermatozeugmata or spermatophores but they are released as clumps within mucilaginous material (Grier, Burns, & Flores, 1981). This action was repeated five times for each fish to ensure that all available sperm had been collected. Sperm samples were suspended in  $80\mu\text{L}$  of HAMF-10 culture medium, at pH 7.4 (Invitrogen, Argentina) and sperm separation was achieved by mixing the suspension with a micropipette. All measurements were carried out at room temperature ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

**Sperm dynamic parameters:** Immediately after semen extraction,  $12\mu\text{L}$  aliquot of diluted sperm suspension was placed on a glass slide. The samples were recorded at 100x magnification during four minutes, with a random change of the microscope field every ten seconds. Sperm analysis was carried out with a videomicroscopy system consisting of a phase microscope (Olympus® CX41) and a digital camera (ICAM 1500; Labomed). One hundred and fifty individual cells were tracked per sample. Each track was followed for one second divided in seven steps. Sperm dynamic parameters were analyzed with two softwares.



The ImageJ (NIH, USA) plugin MTrackJ (ver.191.1.0, Eric Meijering; [www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/](http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/)) was used to obtain the X and Y coordinates of each track. On the other hand, each track was analyzed by the Spermtrack IV (Centre for Cell and Molecular Biology, University of Cordoba) to calculate the following kinetic parameters: (i) Straight line velocity (VSL) ( $\mu\text{m/s}$ ): Straight distance traveled by the spermatozoon from the beginning to the end of its track over time, (ii) Curvilinear velocity (VCL) ( $\mu\text{m/s}$ ): Length of the spermatozoon track over measurement time and (iii) Linearity (LIN): The quotient between VSL and VCL as an adimensional value that indicates the grade of straightness of a track (expressed in percentage), where values near 100% represent a linear movement and values near 0%, a more erratic path.

**Viability and sperm count:** Fifteen minutes after sample collection, sperm viability was measured using the eosin-Y staining test (WHO, 2010). Eosin works by penetrating the head membrane of dead cells, which then have pink heads (live cells appear unstained). An amount of  $10\mu\text{L}$  of the sample was mixed on a microscope slide with  $1\mu\text{L}$  of Eosin-Y stain (0.5% wt/vol). Within 1-2 minutes after addition of the stain the sample was covered with a coverslip and examined under a light microscope at 1 000x magnification. One hundred cells were randomly chosen in order to register the number of unstained mobile and immobile cells and stained spermatozoa (died cells). From this, the percentage of spermatozoa viability was estimated for each male.

The volume of semen obtained from each individual, determined by observation of fluid height in the capillary, was approximately the same (about  $2\mu\text{L}$ ). A sperm sample dilution of 1:10 was prepared in distilled water and placed in an "improved Neubauer chamber" haemocytometer in order to register the sperm count, measured by duplicate samples. The total amount of spermatozoa was calculated by microlitre of the sample.

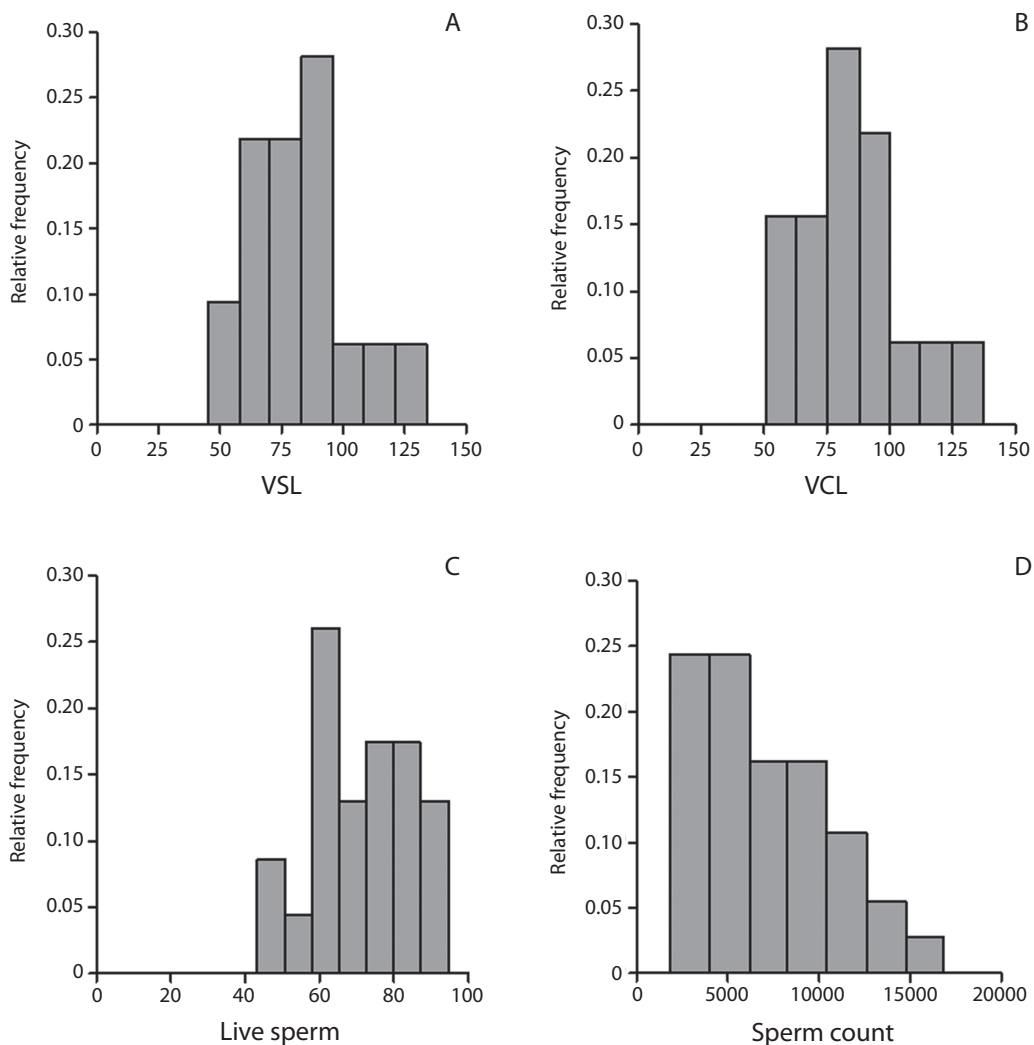
**Sperm morphometry:**  $20\mu\text{L}$  of sperm sample were fixed with 2% formaldehyde and then stained with Coomassie-blue (220% wt/vol). The microphotographs were taken at 1 000x magnification using a light microscope (Olympus® CX31) and a digital camera (Moti-cam 2300). The total sperm length (TSL), head length (HL) and midpiece length (MPL) were measured using the software Image J (version 1.42q, NIH, USA). A mean value per individual was calculated for each parameter (20 spermatozoa per male).

In order to corroborate the spermatozoa lengths, gonopodium of five males were fixed with 2% of glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1M cacodylate buffer for 2h, and then post-fixed with osmium tetroxide at 1% in the same buffer, dehydrated and embedded in Araldite. Thin sections were cut with a diamond knife on a JEOL JUM-7 ultramicrotome, mounted on nickel grids, contrasted with alcoholic uranyl acetate followed by lead citrate, and examined in a Zeiss LEO 906E electron microscope. Microphotographs of ten spermatozoa per male were taken. To ensure a more accurate measurement, only spermatozoa with flagellum insertion site in the head were considered.

Descriptive statistical measures were obtained through the software package InfoStat (2011). Values are presented as means $\pm$ standard deviation (SD).

## RESULTS

Forty-five males presented mean values of VSL and VCL of  $81.67\mu\text{m/s}$  (SD=3.53) and  $85.73\text{mm/s}$  (SD=3.55), respectively (Fig. 1A, Fig. B). A linear pattern of movement greater than 89% were observed in all sperm samples, showing a linearity between 94 and 98% in 75% of samples. A proportion of live spermatozoa higher than 60% was registered in 85% of the individuals (Fig. 1C). The mean percentage of live mobile and immobile spermatozoa were 68.28% (SD=8.32%) and 9.46% (SD=4.56%), respectively. On the other hand, the spermatozoa count showed a high



**Fig. 1.** (A) Relative frequency distribution of straight line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ); (B) Relative frequency distribution of curvilinear velocity ( $\text{mm/s}$ ); (C) Percentage of live spermatozoa; (D) Spermatozoa count ( $\text{cells}/\mu\text{L}$  sample).

variability between males, being the average value of the 5 524cells/ $\mu\text{L}$  sample ( $\text{SD}=728$ ) (Fig. 1D).

The morphometry analyses showed a total sperm length of  $46.66\mu\text{m}$  ( $\text{SD}=2.06$ ), a head length of  $3.46\mu\text{m}$  ( $\text{SD}=0.41$ ) and a midpiece region of  $9.12\mu\text{m}$  ( $\text{SD}=0.65$ ) (Table 1; Fig. 2A, Fig. 2C). The relative frequency of morphometrical values are shown in figure 3. The 65% of the individuals showed TSL values between 46 and  $49\mu\text{m}$  (Fig. 3A). A midpiece region

TABLE 1  
Morphometric parameters of  
*Jenynsia multidentata* spermatozoa

Spermatozoa Region (mm)	Mean+S.D	Min	Max
Total length	46.65+2.06	42.20	50.00
Head length	3.46+0.41	2.32	4.59
Midpiece length	9.12+0.65	8.33	10.7

Data are expressed in  $\mu\text{m}$  and derived from 20 spermatozoa per individual ( $n=45$ ). (Mean $\pm$ S.D, Min, minimum value; Max, maximum value)

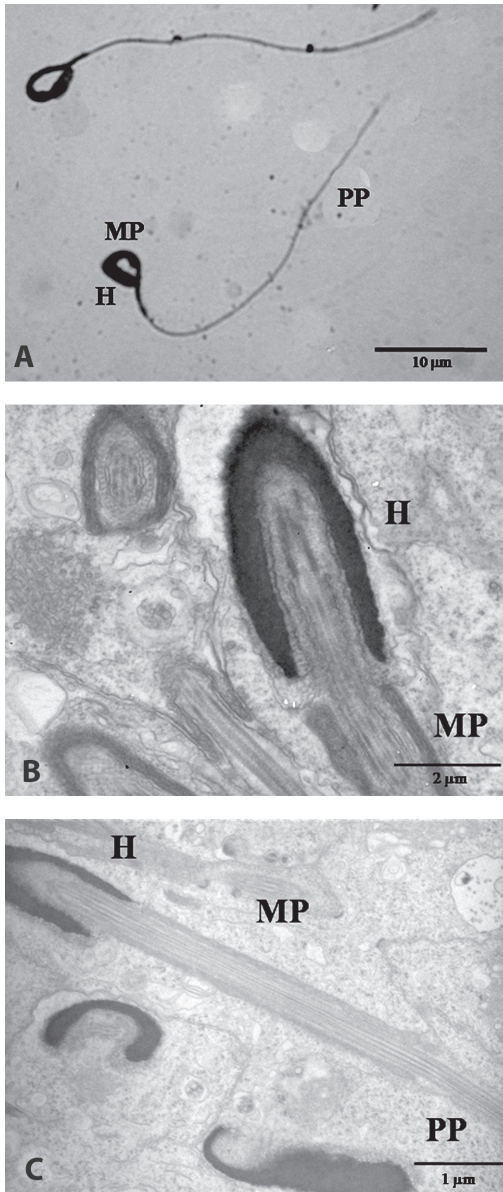
## DISCUSSION

The present work characterized the spermatozoa of *J. multidentata* through a simple protocol of semen collection. The procedure proposed in this work is not invasive, causing no further stress to the individual beyond that of the temporary immobilization and avoid the contamination of the ejaculate with faecal material.

Males of *J. multidentata* present tubular gonopodium, an enclosed tube that enables sperm transfer during copulation (Turner, 1950; Grier et al., 1981; Malabarba, Reis, Vari, Lucena, & Lucena, 1998). Therefore, spermatozoa are not packaged as spermatozeugmata or spermatophores as occurs in Poeciliidae, but they are released as clumps within mucilaginous material (Grier et al., 1981). Although the sperm ultrastructure has been described by Dadone & Narbaitz (1967), these authors did report neither morphometrical values nor dynamic parameters.

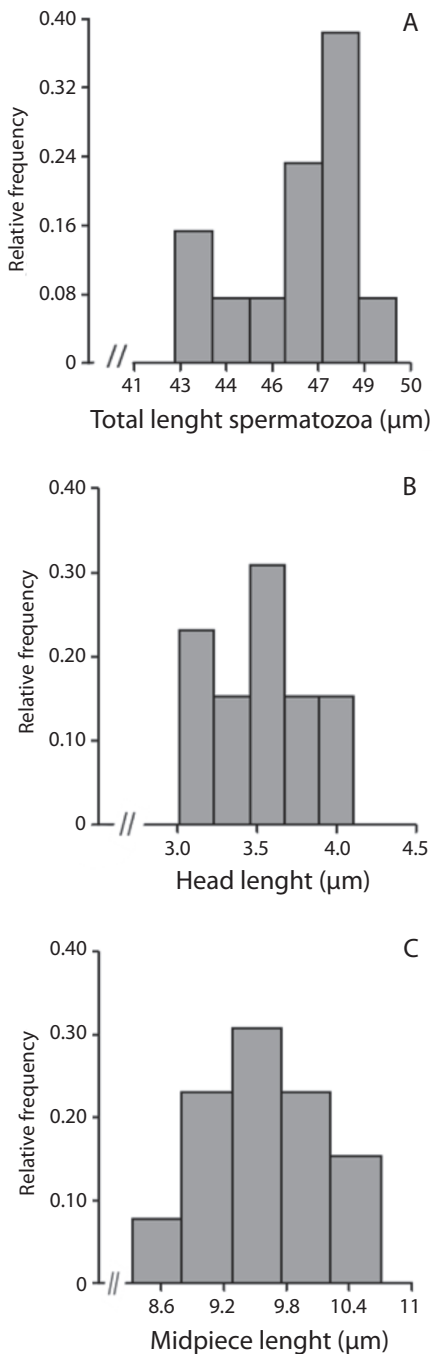
It is known that the spermatozoa of inseminating fish present some differences when compared with externally fertilizing species, which appear to be correlated with the mode of insemination (Jamieson, 1991, 2009; Burns & Weitzman, 2005). Species with internal fertilization have a more complex sperm organization, an elongated sperm nucleus and a relatively larger midpiece region compared to externally fertilizing fishes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Lahnsteiner & Patzner, 2008).

Spermatozoa of *J. multidentata* share a similar morphology with the general model described for inseminating fish. We registered a total length of spermatozoa of around 46.66 $\mu\text{m}$ . Comparing with other viviparous species within the same order, the total length is longer than in *Anableps anableps* Linnaeus, 1758 (40 $\mu\text{m}$ ) (Greven & Schmahl, 2006) but shorter than in *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (54.56 $\mu\text{m}$ ) (Skinner & Watt, 2007) and *Xiphophorus nigrensis* Rosen, 1960 (57.7 $\mu\text{m}$ ) (Smith & Ryan, 2010). Similar length (around 50 $\mu\text{m}$ ) has been registered in viviparous fish of another order such as *Cymatogaster aggregata*



**Fig. 2.** Spermatozoa of *Jenynsia multidentata* (A) Micrograph of spermatozoa showing its head, midpiece and principal piece. The spermatozoa were stained with Coomassie-blue and examined in a light microscope (B) Transmission electron micrograph of head; (C) Transmission electron micrograph of midpiece region. H, head; MP, midpiece; PP, principal piece.

length values between 9 and 10 $\mu\text{m}$  were registered in 50% of males (Fig. 3C).



**Fig. 3.** (A) Relative frequency distribution of Total length spermatozoa (µm); (B) Relative frequency distribution of head length spermatozoa (µm); (C) Relative frequency distribution of midpiece length spermatozoa. Values were obtained from 20 spermatozoa per male (n=45).

(Perciformes, Embiotocidae) (Gardiner, 1978). On the contrary, in external fertilization fish, it has been registered a high heterogeneity in this parameter, having a shorter length in this kind of fish (Jamieson, 1991, 2009; Burns & Weitzman, 2005; Lahnsteiner & Patzner, 2008).

The head length of *J. multidentata* spermatozoa presents a similar value (around 3.5µm) to the above-mentioned viviparous species, except for *X. nigrensis* which has a shorter head length (2.70µm approximately). Also, this parameter is longer than most of the external fertilization fishes which present a head length lesser than 2µm (Hadi-Alavi et al., 2009; Lahnsteiner & Patzner, 2008). An elongated head, such as the recorded in *J. multidentata*, is a common feature shared by most fishes with internal fertilization. This characteristic gives the sperm certain advantages to move into the female reproductive tract, such as the increase of the side-to-side alignment which enables the clumping of the cells allowing spermatozoa to flow together, and the increase of the directionality of cell movement (Ginzburg, 1968; Gardiner, 1978).

The midpiece of *J. multidentata* (9.12µm) is similar to that registered in *X. nigrensis* (8.94µm approximately) (Smith & Ryan, 2010) but is longer than the values recorded for *P. reticulata*, and *A. anableps* (4.79 and 3.9µm, respectively) (Greven & Schmahl, 2006; Skinner & Watt, 2007). However, the differences are noticeable when comparing with *C. aggregate* (approximately 2µm) (Gardiner, 1978) and external fertilization fishes, where the midpiece is less than 2µm (Lahnsteiner & Patzner, 2008; Hadi-Alavi et al., 2009). In viviparous fish, it has been proposed that an enlarged midpiece increases the capacity of the sperm's energy-generating mechanism and might help to prolong the life-span of the spermatozoa during storage in the ovary, as well as it may provide energy for sperm dispersal throughout the ovary (Fawcett, 1970; Pecio & Rafinsrisky, 1994; Yao, Emerson, & Crim, 1995).

Sperm fertility has been related to sperm motility in several fish species. Sperm motility, evaluated as the sperm velocity and the

percentage of motile spermatozoa, is an integrative quality parameter which combines the quality of several cellular compartments responsible for motility activation and progressive sustained movement. This parameter is extensively used to compare different experimental conditions such as collecting procedures, sperm dilution medium, sperm storage condition and assessment of the effect of xenobiotic on sperm quality (Bobe & Labbé, 2010; Kime & Nash, 1999). Although it is known that anesthesia impacts on sperm motility (Wagner, Arndt, & Hilton, 2002; Dietrich et al., 2005), in the present study, fishes were previously anesthetized to allow the survival of individuals in order to obtain sperm samples and to continue other studies.

The high sperm linearity observed in *J. multidentata* is similar to other fish species with either external or internal fertilization (Lahnsteiner & Patzner, 2008). These authors proposed that the shape of head/midpiece complex has no effect on the swimming pattern of spermatozoa, since comparing the motility pattern of many species with a wide diversity of sperm forms, spermatozoa are predominant linearly motile. It is known that the swimming pattern is mainly modulated by the symmetry of the wave of flagellar beating (Cosson, Dreanno, Billard, Suquet, & Cibert, 1999), and the flagellum is very constant in this construction (in general it is ten times longer than the head-midpiece complex) (Lahnsteiner & Patzner, 2008). The high motility percentage exhibited by *J. multidentata* could be an adaptation to sperm competition pressures. Therefore, in internally fertilizing species with female sperm storage, sperm motility would be important in determining paternity because more motile sperm can remain longer in the female tract (Snook, 2005; Evans, Pilastro, & Schlupp, 2011).

The sperm count recorded in *J. multidentata* presented a great variation among individuals. Our results were in agreement with the high heterogeneity reported by Rurangwa et al. (2004) in external fertilization fishes such as *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio* and

*Acipenser fluvescens*. These authors pointed out that sperm concentration is not a sensitive or specific measure of sperm fertilizing capacity, as the concentration can vary greatly within a fish species and across the reproductive season. Copulation in poeciliids is rapid (<1s) and does not involve male mounting or clasping that may increase male control over sperm transfer (Birkhead & Møller, 1998). In this regard, *J. multidentata* also presents the same behavior. These results suggest that female behavior is often effective in limiting the size of the ejaculate transferred by finishing the copulation early. Therefore, it has been proposed that traits that increase sperm quality, such as viability and motility (e.g. spermatozoa velocities), as well as ejaculate size or the number of sperm produced might evolve in species in which males have little control over the amount of sperm inseminated (Pilastro, Gasparini, Boschetto, & Evans, 2008; Gasparini, Simmons, Beveridge, & Evans, 2010; Smith & Ryan, 2010; Evans et al., 2011).

Several of the parameters discussed above have been used as useful tools to evaluate fish fertility (Billard & Cosson, 1992; Kime & Nash, 1999; Rurangwa et al., 2004). The evaluation of seminal quality constitutes a critical step in species management and conservation. The results of our work have established the basic parameter values to be in use in the evaluation of the reproductive potential of *J. multidentata*. Since this species is widely distributed in both polluted and non-polluted sites and has been used as a bioindicator in water quality assessment, the most of the sperm parameters characterized in the present work could be used as a sensitive set of indirect biomarkers that could provide early warning signal of reproductive alterations in polluted freshwater systems of an extensive area of the Neotropical region where this species occurs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laura V. Gatica, Héctor A. Guidobaldi and Diego R. Uñates for laboratory assistance and Cristina Maldonado for

her assistance with electron microscopy and micrographic. Fish were collected with permission of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MYNCYT), Argentina. This study was funded by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) and by the Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) of the Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. This work is part of the PhD. thesis of M. A. Roggio, who gratefully acknowledges fellowships from CONICET.

## RESUMEN

**Caracterización de parámetros espermáticos del pez vivíparo *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae).** Diversos parámetros espermáticos han sido utilizados para evaluar la fertilidad de peces. Dentro de los peces teleosteos, aproximadamente el 3% de las especies son vivíparas. El orden Cyprinodontiformes incluye varias especies con fecundación interna. Dentro de este orden la mayor parte de los estudios sobre la calidad del esperma se han centrado principalmente en la familia Poeciliidae. El pez vivíparo *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) habita una extensa área de la región Neotropical y ha sido utilizado como un exitoso modelo de laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los espermatozoides de esta especie a través de un simple protocolo de recolección de esperma. La población de espermatozoides mostró una linealidad superior al 89% y el 70% de los peces tienen una velocidad lineal y curvilínea entre 50 y 100µm/s. Aunque el 85% de los individuos mostró una proporción de espermatozoides vivos de más del 60%, se observó una alta heterogeneidad en el recuento espermático. Los análisis morfométricos mostraron una longitud total de espermatozoides de 46.66±2.06µm y una longitud de la cabeza de 3.46±0.41µm. Los espermatozoides presentan una pieza media larga (9.12±0.65µm) lo que puede indicar una alta capacidad de producción de energía. El presente estudio establece valores básicos de parámetros que pueden ser útiles para evaluar el potencial reproductivo de las poblaciones de *J. multidentata*.

**Palabras clave:** parámetros espermáticos, morfometría, motilidad espermática, peces vivíparos, *Jenynsia multidentata*.

## 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.
- Bianco, R. A., Guyón, N. F., & Bistoni, M. A. (2012). Ciclo reproductivo de las hembras de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) en la cuenca del Río Suquia, Córdoba, Argentina. XI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. III Reunión Argentina de Ciencias Naturales, Córdoba, Argentina.
- Billard, R. & Cosson, M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261, 122-131.
- Birkhead, T. R. & Möller, A. P. (1998). *Sperm competition and sexual selection*. London: Academic Press.
- Bisazza, A., Manfredi, S., & Pilastro, 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.
- Bobe, J. & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General Comparative Endocrinology*, 165, 535-548.
- Burness, G., Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Moyes, C. D., & Montgomerie, R. (2004). Sperm swimming speed and energetic vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56, 65-70.
- Burns, J. R., & Weitzman, S. H. (2005). Insemination in Ostariophysan Fishes. In M. C. Uribe & H. J. Grier (Eds.), *Viviparous Fishes* (pp. 105-132). Mexico: New Life Publications.
- Cazenave, J., Nores, M. L., Miceli, M., Díaz, M. P., Wunderlin, D. A., & Bistoni, M. A. (2008). Changes in the swimming activity and glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research*, 42, 1299-1307.
- Constantz, G. D. (1984). Sperm competition in Poeciliidae fishes. In R. L. Smith (Ed.), *Sperm competition and the evolution of animal mating systems* (pp. 465-485). New York: Academic Press.
- Cosson, J., Dreanno, C., Billard, R., Suquet, M., & Cibert, C. (1999). Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In C. Gagnon (Ed.), *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications* (pp. 161-186). St Louis, USA: Ache River Press.
- Dadone, L. & Narbaitz, R. (1967). Submicroscopic Structure of Spermatozoa of a Cyprinodontiform Teleost, *Jenynsia lineate*. *Zeitschrift für Fischkunde*, 8, 214-219.
- Dietrich, G. J., Kowalski, R. M., Wojtczak, S., Dobosz, K., Goryczko, K., & Ciereszko, A. (2005). Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31, 1-9.
- Evans, J. P., Pilastro, A., & Ramnarine, I. W. (2003). Sperm transfer through forced matings and its evolutionary

- implications in natural guppy (*Poecilia reticulata*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78, 605-612.
- Evans, J. P., Pilastro, A., & Schlupp, I. (2011). *Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes*. Chicago: University of Chicago Press.
- Fawcett, D. W. (1970). A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction*, 2, 90-127.
- Gage, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B., & Parker, G. A. (2004). Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology*, 14, 44-47.
- Galindo-Villegas, J. & Sosa-Lima, F. (2002). Gonopodial system review and a new fish record of *Poeciliopsis infans* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) for Lake Patzcuaro, Michoacan, central Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 50(4), 1151-1157.
- Gardiner, D. M. (1978). Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost *Cymatogaster aggregata*. *Journal of Fish Biology*, 13, 435-438.
- Gasparini, C., Simmons, L. W., Beveridge, M., & Evans, J. P. (2010). Sperm swimming velocity predicts competitive fertilization success in the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Plos One*, 5(8), 1-5.
- Ghedotti, M. J. (1998). Phylogeny and classification of the Anablepidae (Cyprinodontiformes: Teleostei). In L. Malabarba, R. Reis, R. Vari, Z. Lucena, & C. Lucena (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp. 561-582). Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS.
- Ginzburg, A. S. (1968). *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Moscow: Acad Sci USSR.
- Greven, G., & Schmahl, G. (2006). A note on the spermatozoon ultrastructure of the four-eyed fish *Anableps anableps* (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes). *Z. Fischkunde*, 83-88.
- Grier, H. J. (1973). Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna*. Spermogenesis with reference to the intercentriolar lamellated body. *Journal of Ultrastructure Research*, 45, 82-92.
- Grier, H. J. (1975). Spermogenesis in the teleost *Gambusia affinis* with particular reference to the role played by microtubules. *Cell Tissue Research*, 165, 89-102.
- Grier, H. J., Burns, J. R., & Flores, J. A. (1981). Testis structure in three species of teleosts with tubular gonopodia. *Copeia*, 797-801.
- Hadi-Alavi, S. M., Rodina, M. A., Viveiros, T. M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., & Linhart, O. (2009). Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology*, 72, 32-43.
- 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., Oberhofer, S., & Bistoni, M. A. (2012). Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup®) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 107-117.
- Infostat. (2011). Grupo InfoStat. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jamieson, B. G. M. (2009). *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes, (Agnathans and Bony Fishes)*. Volume 8A of the series: Reproductive Biology and Phylogeny. U.S.A: Science Publishers, Enfield, NH.
- Kime, D. E. & Nash, J. P. (1999). Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Science of Total Environment*, 233, 123-129.
- Lahnsteiner, F., & Patzner, R. (2008). Sperm Morphology and ultrastructure in fish. In S. M. Hadi-Alavi, J. J. Cosson, K. Coward, & G. Raffee (Eds.), *Fish Spermatology* (pp. 1-61). Oxford, U.K: Alpha Science International.
- Malabarba, L., Reis, R., Vari, R., Lucena, Z., & Lucena, C. (1998). *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS.
- Mai, A. C. G., Garcia, A. M., Vieira, J. P., & Mai, M. G. (2007). Reproductive aspects of the one-sided live-bearer *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes) in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 2(1), 40-46.
- Marti, G. A., Azpelicueta, M. M., Tranchida, M. C., Pelizza, S. A., & Garcia, J. J. (2006). Predation efficiency of indigenous larvivorous fish species on *Culex pipiens* L. larvae (Diptera: Culicidae) in drainage ditches in Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 31, 102-106.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 3038-3055.
- Meffe, G. K. & Snelson, F. F. (1989). *The Ecology and Evolution of Livebearing Fishes (Poeciliidae)*. USA: Prentice Hall.
- Meyer, A., & Lydeard, C. (1993). *The Evolution of Copulatory Organs, Internal Fertilization, Placentae and*

- Viviparity in Killifishes (Cyprinodontiformes) Inferred from a DNA Phylogeny of the Tyrosine Kinase Gene X-src. *Proceedings of the Royal Society London B. Biological Sciences*, 254, 153-162.
- Parenti, L. R. (2005). The Phylogeny of Atherinomorphs: Evolution of a Novel Fish Reproductive System. In M. C. Uribe & H. J. Grier (Eds.), *Viviparous Fishes* (pp. 105-132). Mexico: New Life Publications.
- Pecio, A. & Rafirisky, J. (1994). Structure of the testes, spermatozoa and spermatozeugmata of *Mimagoniastes barberi* Regan 1907 (Teleostei: Characidae) an internally fertilizing, oviparous fish. *Acta Zoologica*, 75, 179-185.
- Pilastro, A., Gasparini, C., Boschetto, C., & Evans, J. P. (2008). Colorful male guppies do not provide females with fecundity benefits. *Behavioral Ecology*, 19(2), 374-381.
- Ringuelet, R. A., Aramburu, R. H., & de Aramburu, A. (1967). *Los peces argentinos de agua dulce*. Buenos Aires, La Plata: Comité de Investigaciones Cientificas y Provinciales.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1-28.
- Skinner, A. M. J. & Watt, P. J. (2007). Phenotypic correlates of spermatozoon quality in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology*, 18, 47-52.
- Smith, C. C. & Ryan, M. J. (2010). Evolution of sperm quality but not quantity in the internally fertilized fish *Xiphophorus nigrensis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 1759-1771.
- Snook, R. R. (2005). Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 46-53.
- Turner, C. L. (1950). The skeletal structure of the gonopodium and gonopodial suspensorium of *Anableps anableps*. *Journal of Morphology*, 86, 329-366.
- Wagner, E., Arndt, R., & Hilton, B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, 211, 353-366.
- World Health Organization. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen*. 5th edn. WHO Press.
- Wourms, J. (2005). Functional morphology, development, and evolution of trophotaeniae. In M. C. Uribe & H. J. Grier (Eds.), *Viviparous Fishes* (pp. 238-262). Mexico: New Life Publications.
- Yao, Z., Emerson, C. J., & Crim, L. W. (1995). Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean pout (*Macrozoarces americanus*), an internally fertilizing marine fish. *Molecular Reproduction Development*, 42, 58-64.