



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**“Estudio de la perturbación del desarrollo sexual de
Cnesterodon decemmaculatus (Pisces, Poeciliidae) por
compuestos con actividad estrogénica”**

Tesista:

Lic. Brian Jonathan Young

Directores:

**Dr. Pedro Carriquiriborde
Dr. Gustavo Manuel Somoza**

Año:

2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	V
PREMIOS.....	VI
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN DE CARACTERES SEXUALMENTE DIMÓRFICOS Y DE LA MORFOGÉNESIS DEL GONOPODIO EN <i>C. decemmaculatus</i>	23
Introducción.....	24
Hipótesis.....	29
Materiales y métodos.....	30
Asignación de estadios de morfogénesis de la aleta anal.....	37
Análisis de datos.....	39
Resultados.....	39
Discusión.....	72
CAPÍTULO 2. DESARROLLO GONADAL.....	77
Introducción.....	78
Hipótesis.....	86
Objetivos.....	86
Materiales y métodos.....	86
Resultados.....	90
Discusión.....	106
CAPÍTULO 3. EXPOSICIÓN DE JUVENILES A UN COMPUESTO ESTROGÉNICO	111
Introducción.....	112

Objetivo	116
Materiales y métodos	116
Resultados	119
Discusión	136
CAPÍTULO 4. EXPOSICIÓN DE MACHOS ADULTOS A UN COMPUESTO ESTROGÉNICO	143
Introducción	144
Hipótesis	146
Objetivo	146
Materiales y métodos	146
Resultados	150
Discusión	167
DISCUSIÓN GENERAL	171
CONCLUSIONES GENERALES	179
REFERENCIAS	182
ANEXO 1. Recomendaciones sobre el uso de solventes en experimentación con juveniles de <i>C. decemmaculatus</i>	222
ANEXO 2. Muestreos exploratorios de peces en un ambiente impactado por compuestos estrogénicos	223
Índice de tablas	229
Índice de figuras	230

RESUMEN

En las últimas décadas, los compuestos con capacidad para afectar el sistema endocrino y la reproducción de los organismos han despertado gran preocupación en el mundo entero. Tales sustancias se conocen como perturbadores endocrinos o EDCs (del inglés, *Endocrine Disrupting Chemicals*) y se caracterizan por inducir efectos adversos a muy bajas concentraciones, manifestar consecuencias adversas en momentos diferentes a los de la exposición y actuar en determinadas etapas del ciclo de vida. Un grupo de EDCs conocidos como compuestos estrogénicos, tienen la capacidad de mimetizar la acción del estradiol, hormona esteroidea asociada principalmente al sexo femenino, y regular las funciones del sistema endocrino. Históricamente, los peces han sido utilizados como organismos centinela para evaluar contaminación acuática por EDCs, dado que su ciclo de vida es completamente acuático y su sistema endocrino presenta semejanzas con los vertebrados tetrápodos. En particular, en varias especies de la familia Poeciliidae se ha observado que el desarrollo del gonopodio (modificación de la aleta anal en machos, usada como órgano copulador) puede ser alterado por concentraciones ambientalmente relevantes de EDCs en el agua. Menos estudiado ha sido su acción sobre la histología gonadal, no habiéndose informado previamente, por ejemplo, la inducción de intersexos.

El objetivo de este trabajo fue entonces estudiar los efectos del xenoestrógeno modelo, 17α -etinilestradiol (EE_2), sobre los caracteres sexuales secundarios y las gónadas de *Cnesterodon decemmaculatus* en distintas etapas del ciclo de vida.

Para ello, en primer lugar, fue necesario estudiar la morfogénesis de la aleta anal y el desarrollo de las gónadas de machos y hembras en condiciones normales. De esta manera, de acuerdo con los caracteres sexuales secundarios, se describieron y caracterizaron 3 fenotipos sexuales: individuos indiferenciados, machos y hembras. A su vez, de acuerdo a la morfogénesis del gonopodio en los machos, se caracterizaron 4 estadios de desarrollo. También se describieron 5 estadios de desarrollo gonadal para el testículo y el ovario, y se los relacionó con distintos parámetros de condición general y de los caracteres sexuales secundarios.

Luego, se estudiaron los efectos de exposiciones crónicas a EE_2 , sobre la histología gonadal y los caracteres sexuales secundarios en distintos momentos del ciclo de vida (juveniles y adultos). Entre los efectos observados sobre ejemplares en estadios tempranos del desarrollo, se observó una toxicidad letal relativamente alta

(CL₅₀-13 semanas = 109,9 ng/L), disminución en la proporción de machos y aumento de ejemplares indiferenciados, alteración de la histología tanto del testículo y del ovario conduciendo a una gónada morfológicamente alterada e indiferenciable, retraso en el desarrollo del gonopodio y ausencia de machos con gonopodio completamente maduro. Además, se encontró que el EE₂ fue capaz de inducir una llamativa pigmentación en la zona perianal. Dicho efecto se observó también en muestreos realizados en cursos de agua receptores de efluentes cloacales en los que se documentaron niveles de compuestos estrogénicos relativamente altos. Ello indicaría que tal pigmentación podría ser utilizada como un potencial biomarcador de exposición a este tipo de compuestos.

En el caso de los adultos, las exposiciones crónicas a EE₂ no indujeron alteraciones en la morfología del gonopodio, pero sí indujeron alteraciones a nivel de la histología gonadal, encontrándose ejemplares intersexos o *testis-ova* (elementos de la línea oogenética dentro del testículo) tanto de manera tiempo- como concentración-dependiente.

De esta forma, el EE₂ y probablemente otros compuestos estrogénicos, son capaces de inducir distintas alteraciones en *C. decemmaculatus* dependiendo del momento del ciclo de vida en el que son expuestos los peces. Para este tipo de compuestos, los efectos serían observables en las gónadas debido a que afectan su desarrollo y el posterior desarrollo de los caracteres secundarios o la maduración de los individuos. Por el contrario, el gonopodio una vez desarrollado, pareciera ser insensible a la acción del EE₂. Los efectos observados tanto sobre la gónada como sobre la pigmentación perianal, sugeriría que esta especie resultaría útil como organismo de prueba para evaluar efectos estrogénicos inducidos por contaminantes ambientales. Los efectos sobre juveniles se observaron a concentraciones de EE₂ que fueron detectadas en los ambientes donde habita *C. decemmaculatus*. Si bien resultaría menos probable hallar 100 ng/L de EE₂ en los cuerpos de agua naturales, es importante resaltar que la presencia de oocitos en el testículo de machos adultos (*testis-ova*) podría comprometer la reproducción de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Me resulta difícil redactar la inmensa cantidad de agradecimientos que quisiera dar, sin ponerme a pensar en todos y cada uno de los momentos que he vivido en estos años.

Quisiera empezar agradeciendo a mis grandes amigos del colegio secundario por la gran cantidad de vivencias compartidas: Nacho, Seba, Lucas, Marco, Tete, Pablo, Pato y Fer. Así como también, a l@s amig@s que conocí durante la licenciatura en Ciencias Ambientales: Aman, Checha, Dany, Eli, Marce, Euge y Cris.

Al grupo del Laboratorio de Transformación de Residuos del INTA, con quienes trabajamos juntos hace muchos años: Nico, Diana, Cris, Patri, Mauro, Euge y en especial a mi gran amigo Pedro, con quien compartí los mejores y peores momentos que me tocaron vivir en esta etapa de mi vida. Así como también, a tod@s l@s estudiantes y pasantes que compartimos un tiempo juntos.

A mis directores, Pedro y Gustavo, quienes confiaron en mí, dándome la oportunidad de avanzar en mi carrera y mi formación, guiándome tanto en la tesina de licenciatura como en la tesis de doctorado.

A l@s compañer@s del Centro de Investigaciones del Medioambiente (La Plata) y del INTECH (Chascomús), que siempre tuvieron muy buena onda conmigo, especialmente a Ane, Nadia, Pame, Agus, Juanma, Cari, Maca, Jeza, Vivi y Pato. A Nina que siempre supo aconsejarme sabiamente y que se la extraña.

A l@s integrantes del grupo del Dr. Fernando Delgado del Instituto de Patobiología del INTA, especialmente a Claudia y María de Carmen. Así como también les agradezco a los integrantes del Laboratorio de Contaminantes del Instituto de Tecnología de Alimentos del INTA: Diego y Dante.

A tod@s l@s estudiantes y profes que conocí como docente de la Facultad de Agronomía (UBA). A Armando, María y l@s compañer@s de la Cátedra de Acuicultura, estoy muy agradecido por la amistad de tantos años. También les agradezco por su compañerismo y amistad a Agustín, Martha y Maira, con quienes compartimos una muy linda experiencia con el dictado de Química de la Contaminación y Toxicología.

¡Un especial agradecimiento a Lu, mi compañera de viaje, estoy muy feliz de recorrer el camino a tu lado!

Dejé para el final a la parte más importante de todo esto. ¡Gracias a mis viejos, a Ale y a Ludmi! En especial a mi vieja, que la vida nos separó hace un tiempo... ¡No sé si existe

algún otro lugar a donde vamos, pero deseo que así sea, para volver a abrazarte! También un especial agradecimiento a mi otra guía espiritual, mi tía Norma, quien supo brindarme todo de ella y que está más presente que nunca. ¡Eternamente gracias a ambas!! Este logro también ha sido su obra.

Brian

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados de esta tesis forman parte de los siguientes trabajos publicados o en preparación:

- **Young BJ**, López GC, Cristos DS, Crespo D, Somoza GM, Carriquiriborde P, 2017. Intersex and liver alterations induced by long-term sublethal exposure to 17 α -ethinylestradiol in adult male *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 36 (7), 1738-1745.
- **Young BJ**, López GC, Cristos DS, Crespo D, Somoza GM, Carriquiriborde P. Gonadal alterations and anal pigmentation induced by long-term sublethal exposure to 17 α -ethinylestradiol in male and female juvenile *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Trabajo en preparación.
- **Young BJ**, Carriquiriborde P, López GC, Crespo D, Somoza GM. Morphogenesis of the gonads and secondary sexual characteristics in *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Trabajo en preparación.

A su vez, los resultados han sido presentados en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- **Young BJ**, 2018. Peces nativos como organismos de prueba en ecotoxicología. Tercer Congreso Latinoamericano de Métodos Alternativos al Uso de Animales (COLAMA). Buenos Aires, Argentina. 30 de octubre-1 de noviembre.
- Somoza GM, Pérez MR, **Young BJ**, Strüssmann C, Carriquiriborde P, 2017. Effects of waterborne xenoestrogens on feminization of the testicular structure of two neotropical fish. XX Congresso Brasileiro de Toxicologia. Goiânia, Brazil. October 8-10.
- Somoza GM, **Young BJ**, Carriquiriborde P, 2017. Implications of xenoestrogens on the physiology of the Neotropical fish, *Cnesterodon decemmaculatus*. Reproduction and sex differentiation. SETAC Latin America 12th Biennial Meeting, Santos, Brazil. September 7-10.
- **Young BJ**, 2017. Peces nativos como organismos de prueba en ecotoxicología. Primer Jornada de Métodos Alternativos al uso de Animales de Experimentación “Implementación de las 3R's”. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 17 de octubre de 2017.

- Somoza GM, Perez M, **Young BJ**, Strüssmann C, Carriquiriborde P, 2017. Effects of 17 α -ethynylestradiol on the testicular structure of two neotropical fish species. SETAC Latin America 12th Biennial Meeting, Santos, Brazil. September 7-10.
- **Young BJ**, Gasulla J, López GC, Crespo D, Somoza GM, Carriquiriborde P, 2016. Effects of ethynylestradiol on morphology, gonadal histology and sex ratio at different life stages of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces). 5th Young Environmental Scientist Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America (SETAC-NA). Gainesville, Florida, USA. February 28 - March 2nd.
- **Young B.J.**, Gasulla J., López G.C., Crespo D., Somoza G.M., Carriquiriborde P., 2014. El etinilestradiol altera la relación de sexos, la histología gonadal y la morfología externa en juveniles de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces). Libro de resúmenes del congreso, pp 77. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC Argentina). Ciudad de Neuquén. 22-25 de octubre.

PREMIOS

En el transcurso de la presente tesis, se obtuvieron los siguientes premios para participación en congresos internacionales:

- Student award, SETAC Latin America 12th Biennial Meeting, Santos, Brazil. September 7-10, 2017.
- Student travel award, 5th Young Environmental Scientist Meeting. Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America (SETAC-NA). Gainesville, Florida, USA. February 28 - March 2nd, 2016.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Problemática ambiental

En el transcurso de su historia, el ser humano ha sido capaz de modificar su hábitat para obtener alimento, refugio y todo otro recurso que consideró necesario para su bienestar. Desde la revolución industrial, el progreso en química y tecnología ha traído beneficios económicos y sociales. Sin embargo, los efectos adversos de estas acciones sobre el ambiente se fueron haciendo cada vez más notorios. Este perjuicio sobre el ambiente ha llegado al extremo de afectar el normal funcionamiento de los ecosistemas y de los organismos que los habitan.

Anualmente, se introducen al mercado mundial una gran diversidad de sustancias químicas sin que se conozcan sus potenciales efectos sobre el ambiente y los seres vivos. A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestran los niveles de producción de sustancias peligrosas para el ambiente durante los últimos años en Europa. A su vez, Wilson y Schwarzman (2009) sostienen que la producción mundial de sustancias químicas se duplicará en los próximos 24 años y remarcan la necesidad de mejorar la regulación y el control, en pos de reducir el impacto sobre la salud humana y el ambiente. En este sentido, diversas actividades económicas presentan una importante fuente de incorporación de compuestos al ambiente. Por ejemplo, el creciente uso de pesticidas en agricultura y de fármacos en medicina humana y veterinaria. Un problema similar es el que plantean las descargas de efluentes industriales y domésticos con un tratamiento inadecuado o directamente crudos a los ambientes acuáticos.

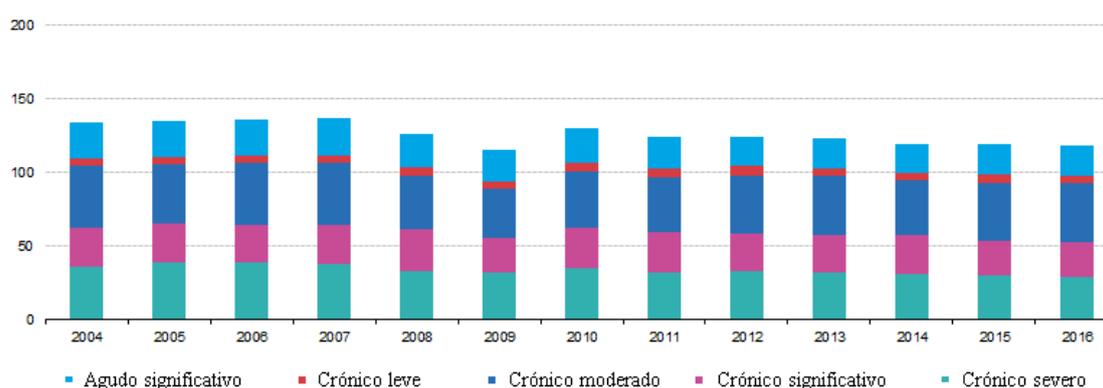


Figura 1. Producción de sustancias peligrosas para el ambiente (en millones de toneladas) entre 2004 y 2016 en Europa. Las diferentes clases de químicos están clasificados de acuerdo con su efecto en el ambiente desde el más peligroso (crónico severo) al menos peligroso (agudo significativo). Adaptado de las estadísticas publicadas por Eurostat (2018).

Particularmente, el ambiente acuático es altamente complejo y diverso. Esto incluye distintos tipos de ecosistemas que se caracterizan por una gran diversidad de componentes bióticos y abióticos: cuerpos de agua dulce como lagos, embalses y ríos; estuarios; aguas costeras marinas y oceánicas. Dado que los cuerpos de agua actúan como sumideros naturales y destino final de este tipo de compuestos, la diversidad biológica y la dinámica de la estructura de las comunidades puede ser afectada.

En sentido amplio, se define a la contaminación acuática como la alteración de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de las aguas, ya sea tanto por causas naturales o antrópicas (Laws, 2000). En el medio acuático, los organismos están continuamente expuestos a compuestos provenientes de las actividades antrópicas, lo que les plantea un desafío constante para su vida (Örn *et al.*, 2006; Fick *et al.*, 2009).

Las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes determinan su distribución y persistencia en los compartimentos ambientales: suelo, aire, sedimento y agua (Rand *et al.*, 1995). De esta forma, la respuesta del ecosistema resulta muy variable debido a la complejidad de estos sistemas naturales.

Los perturbadores endócrinos

Es hoy sabido que algunos contaminantes ambientales, tales como productos químicos industriales y agrícolas, metales y medicamentos, pueden afectar los procesos de regulación hormonal de la fauna acuática (Kime, 1999; Zeilinger *et al.*, 2009). En los últimos años, varias de estas sustancias han despertado especial preocupación por su capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino de los organismos, dando lugar a efectos adversos sobre la salud, crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos, de su progenie o de las poblaciones que constituyen (Chapin *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 2000; Kuster *et al.*, 2005; Sumpter y Johnson, 2005b). Estos compuestos son denominados perturbadores endócrinos, nombre que deriva del inglés, *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs). En 1991, se introdujo este término por un grupo de expertos durante una conferencia (*Wingspread Conference*) en la cual se trató la conexión entre los efectos observados en animales y humanos expuestos a perturbadores endócrinos (Colborn y Clement, 1992). Estos científicos concluyeron que muchos compuestos introducidos en el ambiente por la actividad humana son capaces de alterar el sistema endocrino. El fenómeno al que dan origen los EDCs, alteración de la función

endocrina, recibe el nombre de perturbación endocrina. La perturbación endocrina puede ocasionar cambios severos debido al papel crucial que juegan las hormonas en la fisiología de los organismos (Hotchkiss *et al.*, 2008). Años después, la Organización Mundial de la Salud amplió la definición de los EDCs como “sustancias exógenas que alteran la función del sistema endocrino y consecuentemente causan efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto, de su progenie, o de sus poblaciones” (WHO/IPCS, 2002). Posteriormente, Wayne y Trudeau (2011) introdujeron el concepto de perturbador neuroendocrino, definiéndolo como aquellos contaminantes presentes en el ambiente que son capaces de actuar como agonistas/antagonistas/moduladores de la síntesis y/o metabolismo de neuropéptidos, neurotransmisores o neurohormonas, que subsecuentemente alteran diversos procesos fisiológicos, comportamentales u hormonales que afectan la capacidad de los individuos a desarrollarse, reproducirse, crecer, adaptarse y enfrentar las situaciones de estrés. La definición de perturbación neuroendocrina, de esta forma, engloba tanto los efectos directos como los indirectos a través de una cascada de eventos.

A diferencia de otros contaminantes ambientales, los EDCs se caracterizan por: 1) inducir efectos adversos a concentraciones muy bajas; 2) ser capaces de revelar los efectos en el organismo en momentos diferentes a los que se produce la exposición; e 3) actuar en ciertos estadios del ciclo de vida y en otros no (Kendall y Dickerson, 1996; Katsiadaki *et al.*, 2006; Ankley *et al.*, 2009; Ankley *et al.*, 2010). La relevancia ambiental de la contaminación acuática por EDCs puede ser ejemplificada a partir de los trabajos de Purdom *et al.* (1994) y Sumpter (1995) que demostraron la presencia de peces intersexos aguas abajo de efluentes cloacales.

En las últimas dos décadas ha aumentado la preocupación acerca de los posibles efectos adversos en los seres humanos y la vida silvestre por la exposición a sustancias químicas que pueden interferir con el sistema endocrino. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos o USEPA (del inglés, *United States Environmental Protection Agency*), estos efectos pueden incluir:

- malformaciones del desarrollo,
- interferencia con la reproducción,
- aumento del riesgo de contraer cáncer, y
- alteraciones en la función del sistema inmune y nervioso.

Se ha publicado también que diversas sustancias químicas alteran el sistema endocrino de los animales en estudios de laboratorio, y hay evidencias acerca de la asociación entre la exposición a ciertos químicos en el ambiente y los efectos adversos sobre el desarrollo y la reproducción de peces y otros animales silvestres. Sin embargo, la relación entre las alteraciones del sistema endocrino en humanos y la exposición a contaminantes ambientales, es aún científicamente controversial (Kavlock *et al.*, 1996; Harding *et al.*, 2006; USEPA, 2018).

En el caso de los animales salvajes, existen claras evidencias sobre los efectos fisiológicos en organismos expuestos a EDCs (Tyler *et al.*, 1998). Se han documentado efectos en mamíferos (Facemire *et al.*, 1995; Tillitt *et al.*, 1996), aves (Fry y Toone, 1981; Fry *et al.*, 1987; Tillitt *et al.*, 1993; Giesy *et al.*, 1994), reptiles (Guillette *et al.*, 1994; Guillette Jr *et al.*, 1996), anfibios (Lambert *et al.*, 2015; Haselman *et al.*, 2018; Jackman *et al.*, 2018), peces (Bortone y Davis, 1994; Purdom *et al.*, 1994; Harries *et al.*, 1996; Jobling *et al.*, 1998; De Metrio *et al.*, 2003; Game *et al.*, 2006; Jobling *et al.*, 2006; Leusch *et al.*, 2006) e invertebrados (Hallers-Tjabbes *et al.*, 1994; Oehlmann *et al.*, 1996; Markman *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2011).

Mecanismo de acción de los perturbadores endocrinos

Los perturbadores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos mecanismos (Kime, 2001; Denslow y Sepúlveda, 2007; Ankley *et al.*, 2009; Ankley *et al.*, 2010; Waye y Trudeau, 2011):

1. Mimetizando el efecto de las hormonas endógenas: Algunas sustancias se comportan como agonistas de determinados receptores hormonales. El DDT, PCBs y fitoestrógenos afectan por este mecanismo a los receptores de estrógenos, generando la respuesta fisiológica característica de estas hormonas.
2. Bloqueando su acción: Los compuestos anti-estrogénicos o anti-androgénicos actúan como antagonistas de receptores hormonales. Por ejemplo, el Vinclozolin o el DDE, un metabolito del DDT, actúan como anti-andrógenos.
3. Modificando la síntesis, transporte y metabolismo de hormonas endógenas y/o de sus receptores por lo que modulan o interfieren en los niveles fisiológicos, aumentando o disminuyendo sus concentraciones en circulación general. Es el

caso de los cambios en la expresión génica de los receptores de estrógenos y andrógenos, que son regulados por esteroides sexuales.

Los EDCs pueden tener efectos distintos sobre los estadios embrionarios, juveniles o adultos. En general, los estadios de vida más tempranos suelen ser más sensibles ante la exposición a EDCs, ya que durante el desarrollo ocurren diversos eventos críticos de diferenciación celular y molecular únicos que moldean al organismo en un período corto de tiempo (McKim, 1995). Durante esta etapa del ciclo de vida ocurre también el proceso de diferenciación gonadal, que inducirá la morfogénesis de las gónadas y la posterior manifestación de los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual (Nakamura *et al.*, 1998). La exposición a EDCs resulta crítica cuando tiene lugar durante esta etapa del ciclo de vida, dando la posibilidad a que los efectos se manifiesten durante la adultez.

La exposición a bajas concentraciones de sustancias que interactúan con los receptores hormonales puede interferir con la reproducción, el desarrollo y otros procesos regulados hormonalmente. Puesto que las hormonas se encuentran en el organismo a concentraciones bajas (pg-ng/mL en plasma), los EDCs inducen sus efectos adversos también a bajas concentraciones.

Compuestos estrogénicos

Los estrógenos son esteroides de 18 átomos de carbono con función hormonal, clásicamente asociados al sistema reproductor femenino (Neill, 2006). Los estrógenos naturales estrona (E_1), 17 β -estradiol (E_2) y estriol (E_3), reciben su denominación debido a la cantidad de grupos hidroxilos que contiene su molécula (Figura 2). En mamíferos, el E_2 que es principalmente producido por los ovarios, es el principal estrógeno, mientras que E_1 es el estrógeno más común en mujeres postmenopáusicas y E_3 , producido principalmente durante el embarazo, es el de menor actividad estrogénica (Gruber *et al.*, 2002). El estrógeno con función más conocida es el E_2 que en vertebrados, está asociado al crecimiento folicular y en peces y aves al proceso de diferenciación sexual (Gruber *et al.*, 2002; Nagahama y Yamashita, 2008; Guiguen *et al.*, 2010). En humanos, la afinidad relativa del estradiol sobre sus receptores (α y β) es de alrededor de 5 veces más potente que el estriol y de 2 veces más que la estrona en sus efectos estrogénicos (Gruber *et al.*,

2002). Los estrógenos sintéticos, producidos por distintas compañías farmacéuticas, son hoy utilizados para el control de la natalidad o para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, desordenes menstruales, osteoporosis, entre otros. Otras sustancias también actúan como agonistas de los receptores de estrógenos, por lo que se consideran “compuestos estrogénicos”. Por lo tanto, esta denominación, se aplica a cualquier sustancia, natural o sintética, que induce efectos biológicos característicos de hormonas estrogénicas ováricas (Fan *et al.*, 2015).

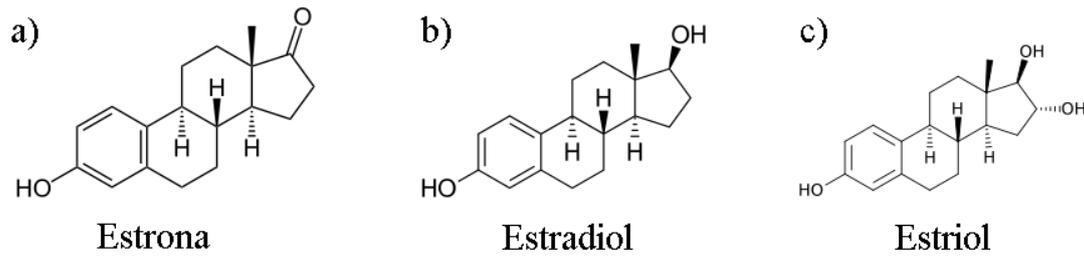


Figura 2. Estructura molecular de los estrógenos naturales: a) estrona (E_1), b) 17β -estradiol (E_2), y c) estriol (E_3).

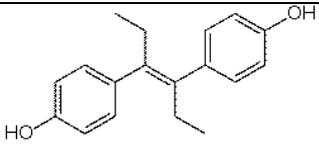
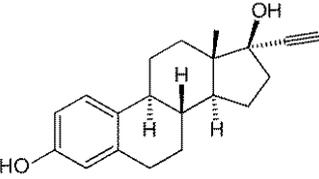
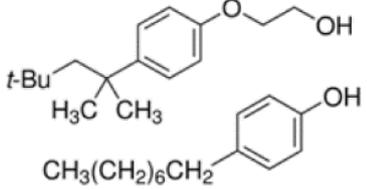
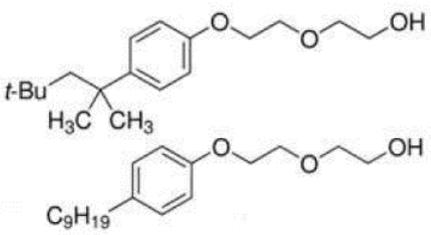
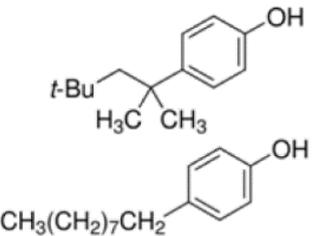
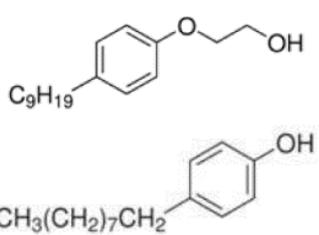
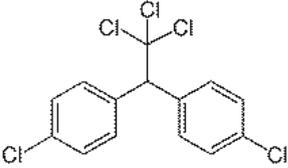
Desde una perspectiva histórica, se puede mencionar el trabajo de Dodds y Lawson (1936) quienes reportaron las propiedades estrógeno-miméticas de diversas sustancias químicas industriales. Burlington y Lindeman (1950) documentaron los efectos del DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) sobre los testículos y caracteres sexuales secundarios en gallos. Así como también se pueden mencionar los trabajos de Bitman *et al.* (1968) y Bitman y Cecil (1970), quienes estudiaron los efectos estrogénicos de 54 compuestos en ratas, entre los cuales se encontraba el DDT, stilbestrol (estrógeno sintético) y bifenilos policlorados (PCBs). Posteriormente, cabe resaltar el informe de Herbst *et al.* (1971) que relaciona al tratamiento prenatal con un estrógeno sintético, el dietilestilbestrol (DES), con el cáncer en mujeres durante la pubertad cuyas madres tomaron el medicamento durante el embarazo, con el fin de evitar abortos espontáneos (Schrager y Potter, 2004). Esto generó que se investiguen los efectos retardados de tales exposiciones a compuestos estrogénicos sobre la descendencia. Se demostró que el DES es un compuesto

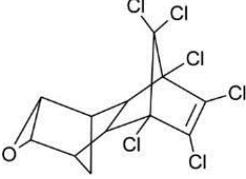
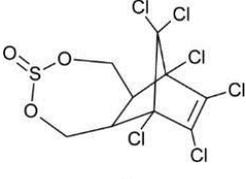
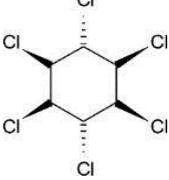
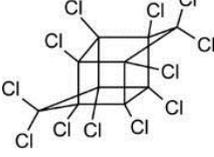
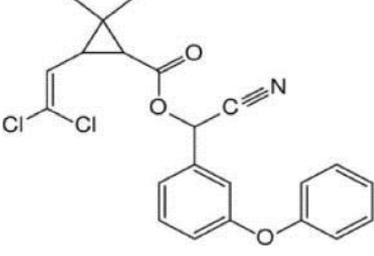
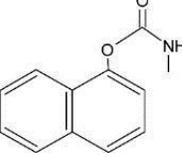
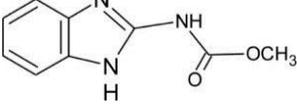
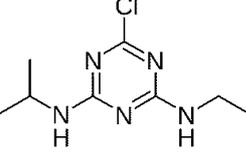
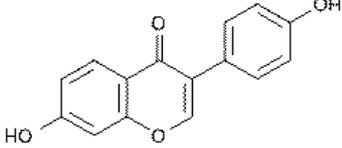
carcinógeno¹, teratógeno² y un perturbador endocrino (McLachlan, 2016). En este estudio se menciona que el DES era utilizado como promotor de crecimiento y anabólico (suplemento hormonal) en la producción ganadera, principalmente en vacas y gallinas. Desde la Primera Reunión sobre Estrógenos en el Ambiente en 1979 (McLachlan y Korach, 1995), se han reportado una amplia diversidad de contaminantes ambientales con actividad estrogénica. Muchos de los compuestos estrogénicos no necesariamente tienen estructura química de naturaleza esteroidea. Entre los principales compuestos estrogénicos, se encuentran los alquifenoles, pesticidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), fármacos (estrógenos sintéticos), fitoestrógenos (flavonas, isoflavonas, cumestanos, lignanos), micoestrógenos, parabenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), metaloestrógenos, PCBs y PCBs-ligados a dioxinas y furanos (Soto *et al.*, 1995; Denslow y Sepúlveda, 2007; Rocha y Rocha, 2015). En la Tabla 1 se observan algunos de ellos. Como producto de la actividad humana, tanto estrógenos sintéticos como naturales, alcanzan los ecosistemas acuáticos debido a la descarga de efluentes domiciliarios o agropecuarios (Adeel *et al.*, 2017). Actualmente, también se sabe que muchos de estos compuestos estrogénicos son carcinogénicos (Fucic *et al.*, 2012).

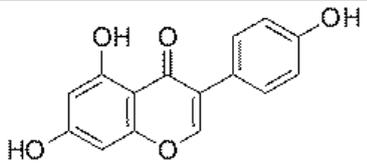
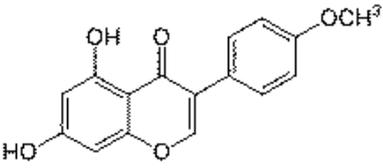
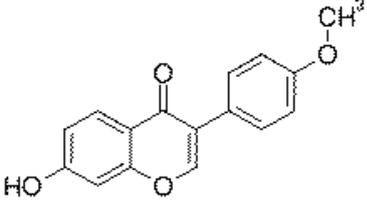
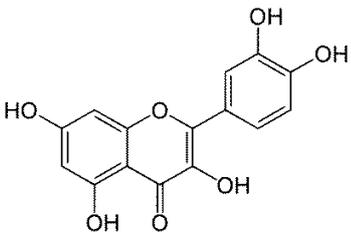
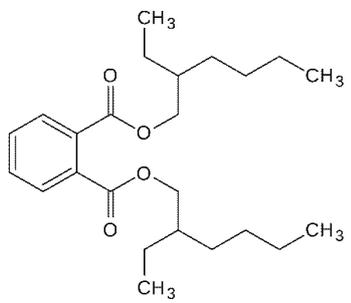
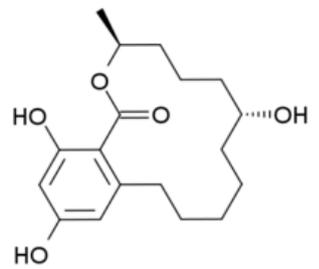
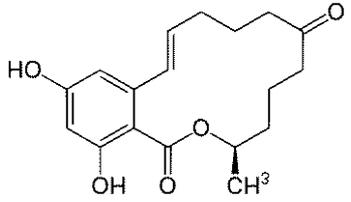
¹ Carcinógeno: Agente físico o químico que causa una modificación del material genético, produciendo la pérdida de sensibilidad de la célula a factores que regulan el crecimiento y replicación celular. A estos agentes se los denomina iniciadores de la carcinogénesis.

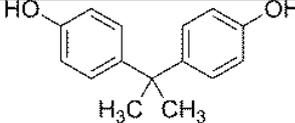
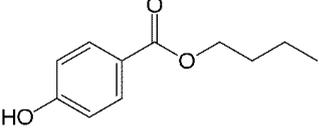
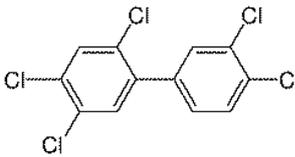
² Teratógeno: Agente que tiene la capacidad de producir anomalías congénitas (malformaciones anatómicas macroscópicas) o defectos funcionales durante el desarrollo embrionario y no se transmiten a la siguiente generación. A este proceso se lo denomina teratogénesis.

Tabla 1. Principales compuestos estrogénicos

Clase	Ejemplo	Estructura molecular	Fuente de contaminación
Estrógenos sintéticos	Dietilestilbestrol (DES)		Orina y heces domiciliarias y ganaderas
	Etinilestradiol (EE ₂)		
Etoxilatos de alquilfenol (EOAFs)	Etoxilatos de octilfenoles y nonilfenoles		Industrial, doméstica y como aditivo de pesticidas
	Dietoxilatos de octilfenoles y nonilfenoles		
Alquilfenoles (AF)	Octilfenoles		Degradación ambiental de EOAFs
	Nonilfenoles (NF)		
	Dicloro difenil tricloroetano (DDT)		

Clase	Ejemplo	Estructura molecular	Fuente de contaminación
	Dieldrin		
	Endosulfan		
	Lindano		
	Mirex		
Pesticidas	Cipermetrina		Insecticida piretroide en agricultura
	Carbaril		Insecticida carbamato en agricultura
	Carbendazim		Fungicida en agricultura
	Atrazina		Herbicida en agricultura
Fitoestrógenos (Isoflavonas)	Daidzeina		Plantas vasculares (origen natural)

Clase	Ejemplo	Estructura molecular	Fuente de contaminación
	Genisteína		y efluentes de la industria de pasta de celulosa y papel
	Biochanina A		
	Formononetina		
Fitoestrógenos (Flavonoide)	Quercetina		Frutas y verduras (origen natural)
Ftalatos	Dietilhexil ftalato (DEHP)		Degradación ambiental del plástico y efluentes industriales
Micoestrógenos	Zeranol		Promotor de crecimiento en medicina veterinaria
	Zearalenona		Producidos por especies de <i>Fusarium</i> (natural)

Clase	Ejemplo	Estructura molecular	Fuente de contaminación
Fenoles	Bisfenol A (BPA)		Industrial y doméstica
Parabenos	Butil parabeno		Productos de cuidado personal
Metales y metaloides	Aluminio (Al)	n.c.	Suelos y aguas (origen natural).
	Cadmio (Cd)	n.c.	Minería, industrial y urbano
	Arsénico (As)	n.c.	
Bifenilos policlorados (PCBs)	PCB 118 (PCB ligado a dioxinas)		

n.c.: no corresponde. Son elementos sin estructura molecular

Las distintas vías de ingreso de los compuestos estrogénicos al ambiente son ejemplificadas en la Figura 3. Estos compuestos provienen de efluentes domiciliarios, agrícola-ganaderos, industriales o basurales y pueden alcanzar cuerpos de agua superficiales y subterráneos, que son utilizados por las poblaciones humanas. Por ejemplo, en efluentes ganaderos provenientes de producciones bovinas y porcinas, se han detectado distintos compuestos estrogénicos (Hanselman *et al.*, 2006; Hutchins *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008; Mansell *et al.*, 2011) y se ha verificado su actividad biológica (Furuichi *et al.*, 2006; Shappell *et al.*, 2007). Otro caso es el de los fitoestrógenos, compuestos no esteroideos presentes en vegetales (Reinli y Block, 1996; Rearick *et al.*, 2014).

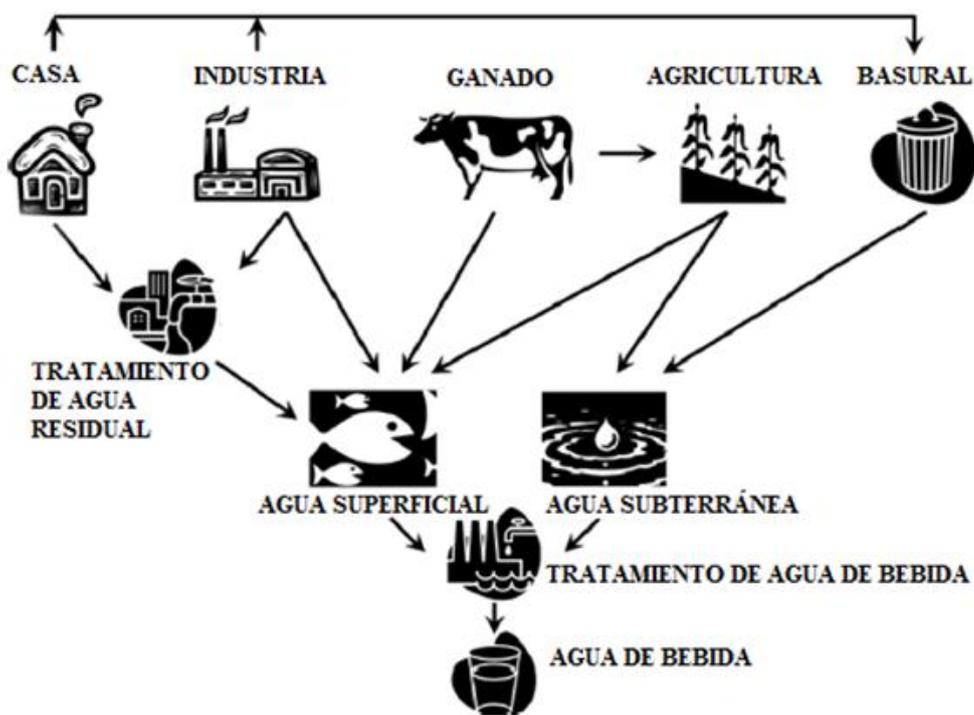


Figura 3. Diagrama de las vías de ingreso de compuestos estrogénicos al suministro de agua de bebida. Modificado de Wise *et al.* (2011).

Presencia de compuestos estrogénicos en Argentina

En Argentina, se han documentado concentraciones de distintos compuestos estrogénicos en efluentes cloacales y cuerpos de aguas receptores (Tabla 2). Esta problemática se ha puesto de manifiesto en nuestro país recientemente, debido al creciente número de estudios que demuestran la presencia de perturbadores endocrinos con acción estrogénica conocida. Por ejemplo, las concentraciones de E_2 en cuerpos de agua superficiales pueden alcanzar hasta 369 ng/L y en efluentes cloacales hasta 631 ng/L, mientras que las concentraciones de EE_2 en cuerpos de agua superficiales llegaron a 43 ng/L y en efluentes cloacales 187 ng/L (Martínez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2015; Scala-Benuzzi *et al.*, 2018). Otros autores publicaron que las concentraciones de E_1 y E_3 en muestras de aguas de la Ciudad de Rosario (Santa Fe) y las ciudades de La Plata, San Miguel del Monte y Chascomús (Buenos Aires), se encontraron por debajo de los límites de detección del método (Perez y Escandar, 2014; Valdés *et al.*, 2015), mientras que en aguas del Río Primero (Córdoba) se encontraron concentraciones de 6 ng/L de E_1 (Valdés

et al., 2014). También se cuenta con publicaciones sobre la presencia de nonilfenol (NF), un compuesto que se utiliza para la fabricación de detergentes y además es producto de la degradación ambiental de los etoxilatos de alquilfenoles, el cual presenta actividad estrogénica (Babay *et al.*, 2008; Babay *et al.*, 2014). Si embargo, no se hallaron publicaciones sobre concentraciones de Bisfenol A en ambientes argentinos.

Tabla 2. Concentraciones (ng/L) de compuestos estrogénicos en muestras de agua para consumo humano, cuerpos de agua superficiales y efluentes cloacales de la Argentina.

Sitio de muestreo	Sustancia	Tipo de muestra	Concentración	Referencia
Potrero de los Funes (San Luis)	EE ₂	Agua de río	12,07 ± 0,26	1
Potrero de los Funes (San Luis)	EE ₂	Agua de río	9,36 ± 0,19	2
Trapiche (San Luis)	EE ₂	Agua de río	8,92 ± 0,15	1
Trapiche (San Luis)	EE ₂	Agua de río	6,55 ± 0,23	2
Volcán (San Luis)	EE ₂	Agua de río	5,91 ± 0,13	1
Volcán (San Luis)	EE ₂	Agua de río	3,91 ± 0,13	2
San Luis (San Luis)	EE ₂	Agua corriente	2,07 ± 0,07	1
San Luis (San Luis)	EE ₂	Agua corriente	1,64 ± 0,07	2
San Luis (San Luis)	EE ₂	Agua de río	14,56 ± 0,32	2
La Plata (Buenos Aires)	EE ₂	Efluente cloacal	80	3
Chascomús (Buenos Aires)	EE ₂	Efluente cloacal	65	3
Chascomús (Buenos Aires)	EE ₂	Agua de arroyo	43	3
San Miguel del Monte (Buenos Aires)	EE ₂	Efluente cloacal	187	3
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	4,60 ± 0,09	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	5,91 ± 0,13	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	2,75 ± 0,08	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	3,77 ± 0,08	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	8,92 ± 0,15	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua de río	12,47 ± 0,26	4
Provincia de San Luis*	EE ₂	Agua corriente	2,17 ± 0,05	4
Río Primero (Córdoba)	E ₁	Agua de río	6	5
San Miguel del Monte (Buenos Aires)	E ₂	Efluente cloacal	170	3
Chascomús (Buenos Aires)	E ₂	Efluente cloacal	631	3
La Plata (Buenos Aires)	E ₂	Efluente cloacal	122	3
Chascomús (Buenos Aires)	E ₂	Agua de arroyo	369	3
Morón (Buenos Aires)	NF	Efluente cloacal	35000	6
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	27000	6
Quilmes (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	900 ± 200	7
Quilmes (Buenos Aires)	NF	Agua de canal	1600 ± 100	7
Quilmes (Buenos Aires)	NF	Agua de canal	700 ± 100	7
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	1900 ± 100	7
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	2300 ± 200	7
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	500 ± 20	7
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	6200 ± 600	7

Sitio de muestreo	Sustancia	Tipo de muestra	Concentración	Referencia
Morón (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	4200 ± 900	7
Luján (Buenos Aires)	NF	Agua de arroyo	100 ± 5	7
Luján (Buenos Aires)	NF	Agua de río	400 ± 30	7
Luján (Buenos Aires)	NF	Efluente cloacal	7000 ± 300	7
Luján (Buenos Aires)	NF	Agua de río	3000 ± 60	7
Luján (Buenos Aires)	NF	Agua de río	300 ± 30	7

E₁: estrona; E₂: 17β-estradiol; EE₂: 17α-etinilestradiol; NF: 4-nonilfenol. Referencias:

¹ Martínez *et al.* (2012), ² Scala-Benuzzi *et al.* (2018), ³ Valdés *et al.* (2015), ⁴ Martínez *et al.* (2010), ⁵ Valdés *et al.* (2014), ⁶ Babay *et al.* (2008), ⁷ Babay *et al.* (2014). * No especifica el sitio de muestreo. § No especifica tipo de agua superficial.

Herramientas de evaluación

La ecotoxicología una disciplina científica avocada al estudio de los efectos de los contaminantes sobre el ecosistema, en un contexto integrado (Truhaut, 1977). Los ecosistemas acuáticos resultan particularmente vulnerables a la contaminación ambiental, ya que actúan como sumideros naturales y destino final de gran parte de los contaminantes (Rand *et al.*, 1995). Aunque el término “perturbación endócrina” ha sido introducido hace casi tres décadas, existen numerosos antecedentes de perturbación endócrina en organismos acuáticos, incluyendo invertebrados y vertebrados (Sumpter, 2002). Los efectos documentados en organismos acuáticos expuestos a EDCs, incluyen desde *imposex* inducido por tributilo de estaño (TBT) en moluscos marinos hasta la masculinización o feminización de algunas especies de peces que habitan aguas abajo de la zona de descarga de efluentes de la industria papelera (Bryan *et al.*, 1986; Cody y Bortone, 1997; Brockmeier *et al.*, 2014) y de efluentes cloacales (Purdom *et al.*, 1994; Jobling *et al.*, 2006), respectivamente.

La mayoría de los estudios de laboratorio sobre EDCs se han llevado a cabo en un número limitado de animales. Sin embargo, se considera que los animales de laboratorio podrían ser representativos de especies silvestres. Por lo tanto, los efectos de EDCs observados en el laboratorio pueden ser utilizados para predecir o interpretar los efectos que ocurren o que pueden ocurrir en la naturaleza (Tyler *et al.*, 1998). Una de las herramientas de evaluación más utilizadas en ecotoxicología es el bioensayo normalizado de toxicidad (Ronco *et al.*, 2004). La protocolización de estos bioensayos permite la comparación,

validación y confiabilidad entre los resultados de distintos compuestos o especies. Por esta razón, diferentes organismos internacionales han estado promoviendo la utilización de bioensayos normalizados (Gourmelon y Ahtiainen, 2007).

El uso de ensayos *in vivo* resulta una herramienta muy útil para evaluar riesgo ambiental de potenciales EDCs (Pawlowski *et al.*, 2004). Por esto, el desarrollo de nuevas pruebas para evaluar perturbación endocrina en peces ha sido promovido por organismos internacionales (USEPA, 1998; Hutchinson *et al.*, 2003; OECD, 2011, 2012). Estos bioensayos proporcionan herramientas metodológicas susceptibles de ser incorporadas en las evaluaciones de riesgo y estrategias de monitoreo, cubriendo una necesidad actual de los organismos de regulación y control.

Otra de las herramientas utilizadas en ecotoxicología son los biomarcadores. Éstos han sido definidos como respuestas biológicas a nivel sub-individual (bioquímico, fisiológico, morfológico y/o histológico) en organismos expuestos a contaminantes, que actúan como señales de alerta temprana antes que los efectos sean irreversibles (Van Gestel y Van Brummelen, 1996). Existen distintas respuestas biológicas que han demostrado ser útiles como biomarcadores por exposición a EDCs, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schlenk, 1999; Sumpter, 2002; Sumpter y Johnson, 2005b; Hutchinson *et al.*, 2006). Un ejemplo de ello, resulta la cuantificación de los niveles plasmáticos de la proteína vitelogenina, o su expresión génica en el hígado ya que es específicamente inducida allí por acción estrogénica (Kime *et al.*, 1999).

Los peces como organismos de prueba

Los peces han sido ampliamente utilizados como organismos centinela para evaluar contaminación acuática por EDCs dado que su ciclo de vida es completamente acuático y su sistema endocrino presenta semejanzas con los vertebrados tetrápodos (Kime *et al.*, 2001). Por consiguiente, el uso de los peces como organismo de estudio no sólo brinda información sobre una de las comunidades más conspicuas del ecosistema acuático y un importante recurso económico para el ser humano, sino que también puede ser útil para evaluar potenciales efectos de los EDCs sobre otros vertebrados. Además, dado que los peces constituyen una importante fuente de alimento para el ser humano, la acumulación de los EDCs en ellos, representa una potencial ruta de exposición indirecta a tales contaminantes (Kime, 2001).

Los efectos de diferentes EDCs en peces teleósteos han sido ampliamente estudiados, habiéndose demostrado que la exposición a estos compuestos afecta, entre otras funciones, a la reproducción y el desarrollo, disminuyendo la fertilidad, alterando la morfología gonadal y el proceso de diferenciación sexual (Jobling *et al.*, 1998; Tyler *et al.*, 1998; van Aerle *et al.*, 2002; Kuster *et al.*, 2005; Piferrer y Guiguen, 2008).

Dentro de las respuestas que demostraron poseer mayor valor ecotoxicológico se pueden mencionar la presencia de *testis-ova*, fenómeno comúnmente conocido como intersexos, y los niveles plasmáticos de vitelogenina en machos expuestos a compuestos estrogénicos (Jobling *et al.*, 2006). La verificación de intersexos requiere del sacrificio de los organismos, debido que la presencia de oocitos en los testículos se determina mediante histología (Nash *et al.*, 2004). Por otra parte, los métodos no invasivos como la detección de vitelogenina en machos resulta, no sólo costosa, sino también no practicable en todas las especies dado que suelen utilizarse métodos de inmunodetección (ej. ELISA) que son, en general, especie específicos y además, cuyos anticuerpos no están disponibles para cualquier especie o los existentes no presentan reactividad cruzada con los antígenos de la especie a estudiar (Kime *et al.*, 1999; Fenske *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2009).

En Argentina, se cuenta con información documentada sobre la distribución geográfica y ecología de los peces locales (Liotta, 2005). Si bien, se ha incrementado la información sobre la respuesta en peces frente a la presencia de contaminantes ambientales a nivel mundial, aún son pocas las especies nativas que se han estudiado y en particular, en relación con los EDCs. Por ejemplo, Pérez *et al.* (2012) y Gárriz *et al.* (2015) documentaron efectos de E₂ y EE₂ sobre la feminización, calidad espermática, fecundación y alteración en la abundancia de mensajeros de genes en las gónadas del pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Por otro lado, Genovese *et al.* (2011; 2012; 2014) evaluaron efectos del detergente octilfenol sobre la expresión de genes que responden a la exposición de estrógenos en *Cichlasoma dimerus*. Roggio *et al.* (2014) documentaron efectos de EE₂ sobre la expresión de aromatasa cerebral (enzima que cataliza la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, en el cerebro de peces), comportamiento reproductivo y calidad espermática en *Jenynsia multidentata*. Mientras que González *et al.* (2015) publicaron efectos de 5 α -dihidrotestosterona (DHT) sobre la expresión de genes relacionados a la esteroidogénesis y la espermatogénesis durante el período de determinación y diferenciación sexual de *O. bonariensis*.

Perturbación endocrina inducida en poecílicos

Los poecílicos son una familia de peces de agua dulce ovovivíparos. Las especies de esta familia poseen un marcado dimorfismo sexual, hormono-dependiente, siendo las hembras generalmente de mayor tamaño que los machos y éstos últimos poseen los radios de la aleta anal modificados en un órgano copulador denominado gonopodio (Turner, 1941a; Peden, 1972; Howell y Denton, 1989). El desarrollo del gonopodio se encuentra regulado por andrógenos, especialmente 11-cetotestosterona (11-KT), secretados por los testículos (Angus *et al.*, 2001; Ogino *et al.*, 2018). Generalmente, en estadios de vida tempranos mientras ocurre el proceso de diferenciación sexual, se considera máxima la acción de EDCs (Leet *et al.*, 2011).

Se ha observado que tanto el desarrollo de las gónadas como los caracteres sexuales secundarios de los poecílicos pueden ser alterados por concentraciones ambientalmente relevantes de EDCs en el agua (Drèze *et al.*, 2000; Doyle y Lim, 2002). Por ejemplo, en el caso de poecílicos machos de los géneros *Gambusia* y *Xiphophorus*, se ha mostrado que el desarrollo del gonopodio puede ser alterado por concentraciones ambientalmente relevantes de EDCs en el agua, como el 4-nonilfenol (Drèze *et al.*, 2000), E₂ (Doyle y Lim, 2002, 2005) y EE₂ (Angus *et al.*, 2005). También, se ha demostrado la capacidad de los EDCs de inducir masculinización de la aleta anal de las hembras expuestas a efluentes de la industria papelera (Drysdale y Bortone, 1989; Brockmeier *et al.*, 2014), 11-KT (Angus *et al.*, 2001), androstenediona (Stanko y Angus, 2007), levonorgestrel (Frankel *et al.*, 2016b), 17β-trembolona (Brockmeier *et al.*, 2013), etiniltestosterona y 17α-metiltestosterona (Turner, 1942b; Amiri-Moghaddam *et al.*, 2010). De esta forma, la estructura del gonopodio ha demostrado ser un indicador útil de efecto adverso inducido por los EDCs y su análisis no requiere de infraestructura sofisticada ni de reactivos costosos.

Cnesterodon decemmaculatus como modelo de investigación

C. decemmaculatus (Jenyns, 1842), vulgarmente conocido como “madrecita de agua” pertenece al Orden Cyprinodontiformes, familia Poeciliidae, subfamilia Poeciliinae (Figura 4). Se encuentra filogenéticamente emparentado con *Gambusia*, *Xiphophorus* y *Poecilia* (Rosen y Bailey, 1963; Ghedotti, 2000; Lucinda, 2005; Hrbek *et al.*, 2007;

Pollux *et al.*, 2014), que han sido utilizadas en el Hemisferio Norte exitosamente para evaluar efectos de EDCs en bioensayos de laboratorio y ambientes naturales.

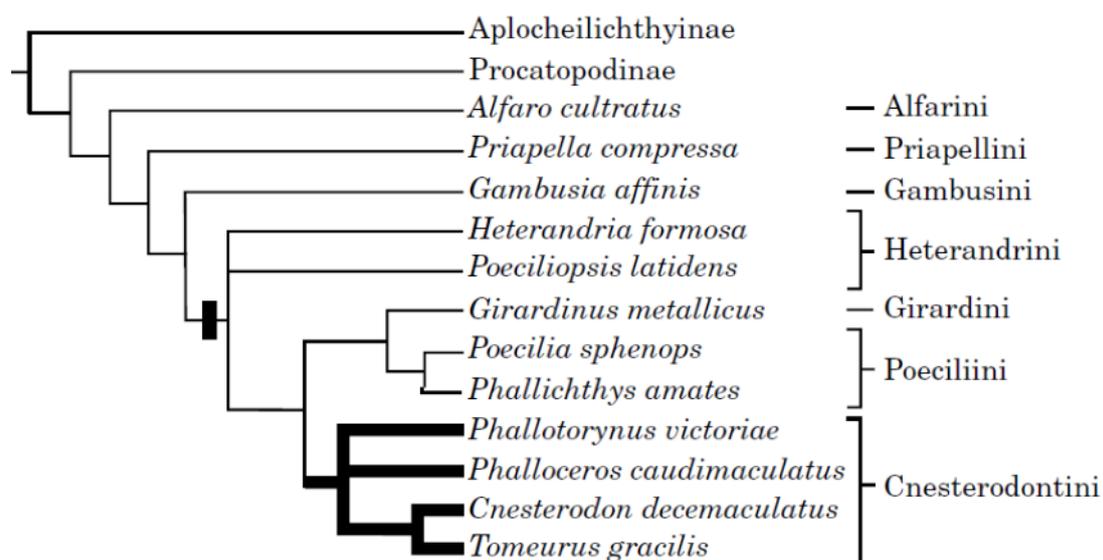


Figura 4: Relaciones filogenéticas de la familia Poeciliidae con énfasis en la subfamilia Poeciliinae (Ghedotti, 2000).

Además, *C. decemmaculatus* es una especie nativa que se encuentra ampliamente distribuida en Argentina, Brasil y Uruguay (Liotta, 2005; Froese y Pauly, 2018) y ha sido introducida en Chile. Esta especie es omnívora y su alimentación se compone principalmente de zooplancton, perifiton, fitoplancton y detritos (Quintans *et al.*, 2009). Se caracteriza por ser tolerante a diferentes factores ambientales y, por consiguiente, se la encuentra en cuerpos de agua con niveles de contaminación relativamente elevados (de la Torre *et al.*, 2002, 2005). Esta especie presenta un gran éxito reproductivo, de rápido crecimiento y corta vida generacional (Molero y Pisanó, 1987). Además, puede ser mantenida fácilmente en condiciones de laboratorio (Somma *et al.*, 2011). Por esta razón, esta especie ha sido propuesta como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda (de la Torre *et al.*, 1997; García *et al.*, 1998) y ha sido ampliamente utilizada en estudios ecotoxicológicos (Di Marzio y Tortorelli, 1994; Di Marzio *et al.*, 2005; Carriquiriborde *et al.*, 2007; Marchese *et al.*, 2008; Candiotti *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista de su biología reproductiva *C. decemmaculatus* posee, como todos los poecílidos, reproducción ovovivípara, por lo que la cría nace completamente formada, morfológicamente similar a los adultos, pero con la aleta anal indiferenciada (Siccardi,

1954). Los machos adultos pueden ser visualmente diferenciados de las hembras por sus caracteres sexuales secundarios. La morfología gonadal de machos adultos ha sido descrita por Sotelo y Trujillo-Cenóz (1958) y luego ampliada por Parenti *et al.* (2010). Sin embargo, aún se conoce muy poco sobre el proceso de diferenciación gonadal y de los caracteres sexuales secundarios de *C. decemmaculatus*. Se desconocen efectos inducidos por EDCs con actividad estrogénica sobre su reproducción y si existe una ventana de tiempo en la que la especie pueda ser más sensible a la acción de tales compuestos.

La utilización de especies autóctonas en bioensayos normalizados de toxicidad permite no sólo analizar niveles de sensibilidad particulares de nuestras especies, sino también evaluar si los efectos adversos se manifiestan en sus ambientes naturales. En Argentina, *Cnesterodon decemmaculatus* es una de las especies de poecílicos nativos más frecuentemente encontradas en ambientes acuáticos dulceacuícolas neotropicales. Esta especie presenta un dimorfismo sexual externo muy marcado (Nelson *et al.*, 2016) y, por lo tanto, podría ser un modelo biológico potencial para evaluar efectos de los EDCs. Si bien en nuestro país existe un protocolo normalizado para evaluar efectos letales agudos utilizando *C. decemmaculatus* (IRAM, 2008), hasta el momento no se cuenta con un bioensayo normalizado para evaluar el impacto de los EDCs utilizando esta u otra especie nativa y por consiguiente el desarrollo de esta herramienta podría ser de gran utilidad práctica para la industria, productores agropecuarios, centros de investigación y desarrollo, asesores técnicos, organismos públicos o privados encargados de la regulación y el control, agencias de protección ambiental y ONGs, entre otros.

HIPÓTESIS

Las sustancias con actividad estrogénica alteran la morfogénesis de la gónada y del gonopodio en Cnesterodon decemmaculatus (Pisces, Poeciliidae) y esas respuestas son utilizadas como puntos finales para evaluar perturbación estrogénica en estudios ecotoxicológicos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la morfogénesis de las gónadas y del gonopodio de *C. decemmaculatus* desde el nacimiento hasta la adultez, evaluar cómo éste es afectado por perturbadores endocrinos e identificar respuestas biológicas útiles para evaluar perturbación estrogénica en estudios ecotoxicológicos.

**CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN DE CARACTERES SEXUALMENTE
DIMÓRFICOS Y DE LA MORFOGÉNESIS DEL GONOPODIO EN *C.
decemmaculatus***

Introducción

Estrategias reproductivas y dimorfismo sexual en peces

Existen aproximadamente 30.000 especies de peces teleósteos que habitan en diversos tipos de ambientes acuáticos y presentan una gran diversidad de estrategias reproductivas (Devlin y Nagahama, 2002; Guiguen *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2016). Esta diversidad se visualiza claramente en que habitan todos los ecosistemas acuáticos conocidos, los modos de fecundación, el comportamiento reproductivo, la inversión de sexos, el cuidado parental, entre otros (Breder y Rosen, 1966; Godwin, 2010; Munakata y Kobayashi, 2010). La mayoría de los teleósteos son ovíparos y presentan fecundación externa de los oocitos que la hembra libera al medio (Wourms *et al.*, 1988; Parenti *et al.*, 2010). Sin embargo, hay teleósteos que presentan fecundación interna y la hembra libera al medio los oocitos ya fecundados o gesta al embrión dentro del ovario (Wourms, 1981; Wourms *et al.*, 1988; Grier *et al.*, 2005; Parenti *et al.*, 2010). También hay especies que presentan partenogénesis espermato-dependiente (Lamatsch y Stöck, 2009) y el hermafroditismo no es infrecuente en teleósteos (De Mitcheson y Liu, 2008).

La reproducción exitosa de un individuo depende del desarrollo normal de sus gónadas y de la manifestación de los caracteres sexuales secundarios, un proceso de desarrollo que comienza en etapas tempranas en la vida (Strüssmann y Nakamura, 2002). Durante estas primeras etapas del ciclo de vida, los peces teleósteos atraviesan por una serie de cambios morfológicos y fisiológicos (Berlinsky *et al.*, 2004; Al Hazzaa y Hussein, 2007; Fujimura y Okada, 2007; Murphy *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2008). En este sentido, el desarrollo de las gónadas y de los caracteres sexuales secundarios pueden ser influenciados por fluctuaciones en factores intrínsecos, tales como el crecimiento y comportamiento, o por factores ambientales, tales como temperatura y xenobióticos (Strussmann *et al.*, 2010; Chalde *et al.*, 2011). Los caracteres sexuales secundarios generalmente aparecen en la pubertad y evidencian las diferencias externas entre sexos (dimorfismo sexual).

Los caracteres sexuales secundarios son diferencias fenotípicas que se desarrollan bajo la influencia de esteroides gonadales (Jalabert *et al.*, 2000). La expresión del fenotipo masculino está regulada por andrógenos, mientras que el femenino se encuentra regulada por los estrógenos. En mamíferos, los principales andrógenos son la testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), los cuales, entre otras cosas, regulan el desarrollo de los genitales externos masculinos (Murakami y Mizuno, 1986; Yamada *et al.*, 2003). En amniotas y algunos peces, se han desarrollado varios tipos de órganos copuladores para

el transporte del esperma. En peces, es sabido que el principal andrógeno es la 11-KT, la cual está presente en niveles elevados en el plasma de los machos adultos y estimula la morfogénesis de los caracteres sexuales secundarios (Miura *et al.*, 1991; Kime, 1993; Angus *et al.*, 2001). Por ejemplo, en elasmobranquios, un carácter sexual secundario son los *claspers*, que son modificaciones de las aletas pélvicas de los machos para ayudar en la cópula y su morfogénesis también es inducida por andrógenos (O'Shaughnessy *et al.*, 2015; Awruch, 2016). Los machos de algunas especies de peces teleósteos desarrollan aspectos tan diversos como el alargamiento de aletas, la hipertrofia renal, el aumento del grosor de la epidermis, la presencia de coloraciones llamativas, los tubérculos reproductivos, las verrugas grasas (del inglés, *fat pads*) o las aletas modificadas en órganos copuladores, denominados gonopodio (Borg, 1994; Künzler y Bakker, 2001; Ogino *et al.*, 2011; Ogino *et al.*, 2018). Los machos de especies como *Oryzias latipes* presentan radios alargados en la aleta anal (Yamamoto y Suzuki, 1955). La diversificación morfológica la aleta anal ha evolucionado en otras especies como una adaptación a la fecundación interna. El desarrollo de los órganos copuladores implica un proceso de organogénesis dependiente de andrógenos (Ogino *et al.*, 2004; Ogino *et al.*, 2018).

Caracteres sexuales secundarios en Poecílidos

Existen descripciones morfológicas y funcionales de los caracteres sexuales secundarios en poecílidos desde hace un siglo, documentadas principalmente para los géneros *Gambusia* (comúnmente conocido como mosquitofish o pez mosquito), *Xiphophorus* (especies de este género son comúnmente conocidas como espaditas y platys) y *Poecilia* (especies de este género son comúnmente conocidas como mollys y lebistes). En machos de *Gambusia affinis*, se han descrito los cambios morfológicos que ocurren durante la transición de aleta anal juvenil a un gonopodio maduro, donde esta estructura presenta un alargamiento de la región anterior de la aleta anal (Kuntz, 1914; Turner, 1941a; Rosa-Molinar y Burke, 2002; Zauner *et al.*, 2003) y una serie de elementos esqueléticos que sirven de soporte axial y apendicular (Turner, 1942a; Rosa-Molinar *et al.*, 1994; Rosa-Molinar *et al.*, 1996). Estas estructuras anatómicas también fueron documentadas en *Gambusia regani* (Kobelkowsky y Alva-García, 2000). Breder (1926) sostenía que la alteración estructural del soporte apendicular es necesaria para el desarrollo normal de un gonopodio funcional. El gonopodio sirve para transferir los paquetes de esperma

(espermatozeugmatas) al seno urogenital de la hembra (Rosen y Gordon, 1953; Peden, 1972; Rosa-Molinar *et al.*, 1996). En la Figura 5 se muestra una representación del comportamiento sexual del macho durante la copulación, donde realiza un movimiento del gonopodio desde una posición posterior hacia anterior (tomado de Ogino *et al.* (2004)).

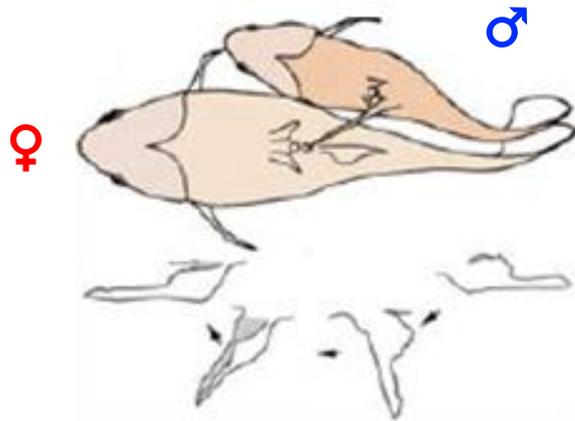


Figura 5. Durante la copulación, el gonopodio se mueve hacia adelante y transfiere los cúmulos de espermatozoides, las espermatozeugmatas, directamente al poro urogenital femenino. Tomado de Ogino *et al.* (2004).

La morfogénesis del gonopodio en *G. affinis* se subdivide en una primera etapa de elongación y segmentación de los radios tercero, cuarto y quinto, y una etapa posterior de diferenciación del extremo distal, con la formación de sierras, ganchos y cirros (Turner, 1941a, 1942a). Se ha observado que las hembras tratadas con andrógenos desarrollan un gonopodio (Turner, 1942a; 1942b), así como también los machos a los cuales se le extirpó el gonopodio, tenían la capacidad de regenerar esta estructura (Turner, 1941b). Años más tarde, se documentó el rol de los andrógenos en este proceso organogénico (Turner, 1947, 1960). Rosa-Molinar *et al.* (1994; 1996) publicaron que este proceso requiere del desarrollo de estructuras óseas anexas al gonopodio que sirven de soporte esquelético, las cuales también son sexualmente dimórficas.

Por otro lado, algunos machos del género *Xiphophorus* presentan, además del gonopodio, una modificación de la aleta caudal, conocida como espada. Se sabe que esta estructura, aunque no participa en la cópula, está involucrada en la selección sexual que realiza la hembra, atraída por el largo de la espada y su coloración (Rosenthal y Evans, 1998; Basolo y Trainor, 2002). Tanto la morfogénesis de la espada, como la del gonopodio, son

inducidas por andrógenos (Offen *et al.*, 2008). En *Xiphophorus helleri*, la formación de la espada involucra la elongación de los radios ventrales de la aleta caudal y una pigmentación característica. Estas extensiones de la porción ventral de la aleta caudal, también se han observado menos marcadas en machos de mollys (*Poecilia*) (Parzefall, 1969). Estudios de filogenia molecular demostraron que las especies de este género, tanto aquellas que presentan espada (del inglés, *swortail fish*: pez cola de espada) como las que no (platys), descienden de un antecesor común con espada (Meyer *et al.*, 1994; Meyer, 1997; Meyer *et al.*, 2006).

Por otro lado, tanto en *X. helleri* como en el platy *X. maculatus*, la formación del gonopodio involucra la elongación de los radios 3, 4 y 5 de la aleta anal (Gordon y Rosen, 1951). Se cree que los machos platy perdieron la espada durante la evolución porque los costos en términos de selección natural son mayores que las ganancias por elección sexual (Offen *et al.*, 2008). Sin embargo, las hembras de algunas especies platy aún tienen preferencia por los machos con espada que por los machos sin espada de sus propias especies (Basolo, 1990; 1995).

Mecanismos moleculares involucrados en la morfogénesis de los caracteres sexuales secundarios

Las hormonas esteroideas gonadales juegan un rol clave en el desarrollo de los caracteres sexuales de los vertebrados. En los órganos sexualmente dimórficos de los machos, la señalización de andrógenos puede activar la expresión de genes de la familia *hedgehog*, que es necesaria tanto para la morfogénesis temprana como para el posterior desarrollo sexual (Miyagawa *et al.*, 2011). El gen *sonic hedgehog* (*Shh*) se expresa en los epitelios de numerosos sitios con interacciones epitelio-mesenquimales en vertebrados (Bitgood y McMahon, 1995; Ingham y McMahon, 2001). En ratones, *Shh* se expresa en los genitales durante todo el desarrollo embrionario y es indispensable para la protrusión del precursor del tubérculo genital durante la embriogénesis temprana (Haraguchi *et al.*, 2001; Miyagawa *et al.*, 2009). Otro de los genes de esta familia es *Indian hedgehog* (*Ihh*), que también es responsable para el desarrollo de los genitales externos masculinos (Zheng *et al.*, 2015). A su vez, el desarrollo de la próstata es dependiente de DHT (Cunha *et al.*, 1980), que induce la expresión de *Shh* en el epitelio del seno urogenital que forma el brote de próstata naciente (Podlasek *et al.*, 1999).

En los últimos años, se han estudiado los mecanismos moleculares dependientes de andrógenos, involucrados en la morfogénesis de los caracteres sexuales secundarios en poecílidos (Zauner *et al.*, 2003; Ogino *et al.*, 2004; Offen *et al.*, 2008; Offen *et al.*, 2009; Ogino *et al.*, 2011; Brockmeier *et al.*, 2013; Ogino *et al.*, 2014; Ogino *et al.*, 2018). Se sabe que los receptores de andrógenos (R α y R β) se expresan en la porción distal de los radios de la aleta anal durante la morfogénesis del gonopodio en *G. affinis* y la expresión de *shh* induce la elongación de esta estructura (Ogino *et al.*, 2004; Ogino *et al.*, 2011). Los niveles de andrógenos y la expresión de *shh* regulan la proliferación celular, contribuyendo al desarrollo de nuevos segmentos óseos durante la morfogénesis del gonopodio (Ogino *et al.*, 2018). En otros peces también se ha descrito que *shh* juega diversos roles en la formación de las aletas. Por ejemplo, en el pez cebra, *Danio rerio*, su expresión es necesaria para el patrón de desarrollo antero-posterior de las aletas (Neumann *et al.*, 1999), el crecimiento y mantenimiento del blastema y el patrón de los radios de las aletas en adultos, como sucede después de la amputación de la aleta (Laforest *et al.*, 1998; Quint *et al.*, 2002; Iovine, 2007).

Por otro lado, se sabe que la expresión de los genes *fgfr1* y *msxC* está asociada al crecimiento de la espada y del gonopodio en machos de 4 especies del género *Xiphophorus* (Zauner *et al.*, 2003; Offen *et al.*, 2008). Offen *et al.* (2009) identificaron 128 secuencias con alta homología con los genes *rack1*, *dusp1*, *klf2* y *tms β* que se expresaron durante el desarrollo y la regeneración de la espada y el gonopodio. Sin embargo, algunos de estos genes presentaron diferentes perfiles de expresión en estas dos estructuras, sugiriendo diferencias en la cascada de genes involucrados en las modificaciones que sufren las aletas anal y caudal durante el desarrollo.

Caracteres sexuales secundarios de *C. decemmaculatus*

Como se mencionó previamente, *C. decemmaculatus* posee reproducción ovovivípara (Siccardi, 1954). Por ello, las crías nacen completamente formadas, morfológicamente similares a los adultos, aunque con la aleta anal indiferenciada. En este estadio de vida, los sexos no presentan diferencias fenotípicas y se sabe que los machos adultos pueden ser visualmente diferenciados de las hembras por el desarrollo del gonopodio (Lucinda, 2005). Ghedotti (2000) publicó una descripción morfológica del gonopodio en machos adultos. Allí documentó que las sierras se ubican en el margen superior de la ramificación posterior del cuarto radio, el gancho se encuentra en el extremo distal de la ramificación

anterior del quinto radio, y el par de cirros laterales, que en esta especie se encuentran osificados, se ubica en el extremo distal del tercer radio (Figura 6). Sin embargo, la morfogénesis de los caracteres sexuales secundarios en ambos sexos aún no ha sido descrita.

Se sabe que en poecílidos hay una importante variación en el tamaño de los machos relacionada con la edad de primera maduración (Hughes, 1985; Livingston *et al.*, 2014), de forma tal que probablemente el desarrollo gonopodial esté más relacionado con el desarrollo gonadal que con el tamaño y la edad del pez. Sin embargo, en otro poecílido, *G. holbrooki*, el tamaño del gonopodio se correlaciona con el tamaño corporal (Horth *et al.*, 2010).

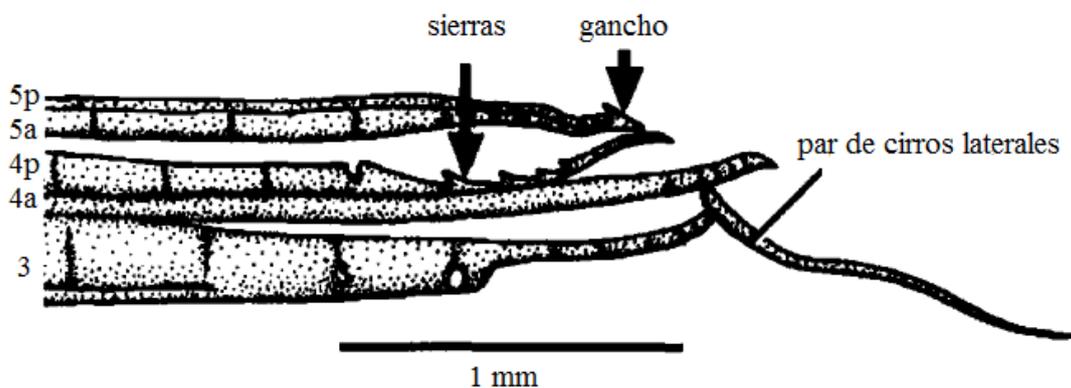


Figura 6. Extremo distal del gonopodio de un macho adulto de *Cnesterodon decemmaculatus*. En la izquierda de la figura se indican los números de los radios, donde a = ramificación anterior y p = ramificación posterior. Barra=1 mm (Adaptado de Ghedotti, 2000).

En este contexto es que se plantean la hipótesis y los objetivos en este capítulo del trabajo de tesis.

Hipótesis

Es posible identificar distintas etapas durante la morfogénesis del gonopodio de C. decemmaculatus. El grado de desarrollo de este está relacionado con la talla de los individuos.

Objetivos

- Describir la morfogénesis normal del gonopodio en contraste con la aleta anal de las hembras, identificando etapas características del desarrollo.
- Estudiar la relación existente entre dichas etapas, la edad y la talla de los individuos.

Materiales y métodos

Organismos

Los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) se obtuvieron del acuario establecido en el Sector de Ecotoxicología del Laboratorio de Transformación de Residuos (IMYZA-INTA) desde 2009. Esta línea de peces provino del Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), donde ya contaba con 10 años de producción en acuario. En la Figura 7 se muestra un sistema de cría de *C. decemmaculatus* bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperiodo (16 horas de luz:8 horas de oscuridad). Mientras que en la Figura 8, se muestra el sistema de cría masivo sin condiciones controladas de luz y temperatura.



Figura 7. Vista del sistema de cría de *C. decemmaculatus* bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (16L:8O).



Figura 8. Vista del acuario de *C. decemmaculatus* en piletas de 350 L. de capacidad dentro de un invernadero (IMYZA, INTA).

Diseño experimental

Los ejemplares obtenidos en el acuario fueron apartados y mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio en una sala mantenida a una temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (16L:8O). En la dieta diaria, se incorporó una mezcla de alimento balanceado Shulet® formulado en escamas y flotante con alimento vivo, compuesto por neonatos del cladóceros *Daphnia magna*. Esta especie fue criada también en las mismas condiciones controladas. Se utilizó agua de perforación clorada, la cual debió ser declorada y aireada durante más de 48 horas, antes de ser utilizada en el acuario. Periódicamente se midió el pH, conductividad y cloro libre en el agua.

Esta etapa del estudio comprendió la realización de experiencias en las cuales se criaron ejemplares desde su nacimiento hasta la madurez sexual. Para ello, se aislaron grupos de machos y hembras adultas en peceras de 40 L, con el fin de utilizarlos como reproductores. Antes de la alimentación diaria, se revisaron estas peceras y en los casos de registrarse una cohorte recién nacida, ésta fue colectada y aislada en peceras de 5 L. Se tuvo en cuenta que la densidad de peces no supere los 500 mg de peso total por cada litro de agua en ningún momento de la experiencia, de acuerdo a sugerencias de organismos internacionales (USEPA, 1996). Cada pecera fue rotulada con la cantidad de ejemplares que componían la cohorte y la fecha de nacimiento. Periódicamente, se

registró el número de individuos vivos, la edad y se determinó la proporción de sexos por observación visual en cada cohorte. También se realizaron mediciones de distintas variables morfológicas como la talla y las longitudes del cuarto y sexto radio de la aleta anal y se registró el peso corporal. Previamente, los ejemplares fueron anestesiados con frío y colocados sobre una caja de Petri, empleando un microscopio estereoscópico (Leica GZ6) con un dispositivo para iluminación *trans*. Con estos datos, se calcularon los índices gonopodial (IG), de elongación (IE) y de condición corporal (factor *K*) (Ver más adelante).

Todos los procedimientos se realizaron bajo el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA. Los residuos químicos y biológicos se descartaron como residuos especiales y patogénicos respectivamente, los cuales fueron colectados por una empresa encargada de su tratamiento.

Modelos de crecimiento individual

Se describieron dos modelos de crecimiento individual en las condiciones controladas bajo estudio (temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16L:8O). Para ello, se ajustaron los modelos de crecimiento de Von Bertalanffy y de la relación largo-peso, utilizando las Ecuaciones 1 y 2 respectivamente. La ecuación exponencial del modelo de Von Bertalanffy se basa en una hipótesis fisiológica, ya que considera que el crecimiento es el resultado de la diferencia entre factores anabólicos y catabólicos. En cambio, la relación largo-peso permite establecer si el crecimiento en ambas variables es isométrico o alométrico (Le Cren, 1951; Hayes *et al.*, 1995; Schnute y Richards, 2002; Mancini y Grosman, 2008).

$$LE_{(t)} = L_{\infty} [1 - \exp^{-k(t-t_0)}] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $LE_{(t)}$ es el largo estándar a una determinada edad, L_{∞} es la máxima longitud teórica esperada, k es la tasa de crecimiento bajo las condiciones de cría empleadas, t es la edad y t_0 es el tiempo hipotético en el cual la longitud es nula.

$$W = a \times LE^b \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde W es el peso fresco, y los coeficientes a (ordenada al origen) y b (pendiente) se obtuvieron mediante un análisis de regresión no lineal. Si el coeficiente $b = 3$ indica crecimiento isométrico (crecimiento en longitud y en peso son proporcionales), mientras que $b > 3$ indica crecimiento alométrico positivo y $b < 3$ negativo.

Parámetros de condición general

Crecimiento en talla

La talla fue evaluada mediante la medición del largo estándar (LE), obtenido como la distancia comprendida desde el extremo frontal de la cabeza hasta el final de la columna vertebral, donde se inserta la aleta caudal (Strauss y Bond, 1990), como se observa en la Figura 9. De acuerdo a Young (2011), LE puede reemplazar la medición del largo total (distancia comprendida desde el extremo frontal de la cabeza hasta el extremo posterior de la aleta caudal) en ejemplares de *C. decemmaculatus* debido a que, independientemente del sexo, presentan una relación lineal y una correlación de $R^2 = 0,99$. Las mediciones se realizaron empleando un calibre digital electrónico (Schwyz), con una precisión de 0,1 mm.

Peso corporal

Se midió el peso (W) del individuo vivo luego de ser anestesiado y colocado sobre papel absorbente para quitar el exceso de agua. Este parámetro se obtuvo empleando una balanza digital Ohaus con una precisión de 0,2 mg.

Proporción de sexos por observación visual

Se evaluó como la relación de individuos sexualmente indiferenciados, machos o hembras, basándose en la presencia o ausencia de gonopodio en diferentes estados de desarrollo, respecto a la cantidad total de ejemplares y el dato se expresó en porcentaje.

Morfogénesis de la aleta anal

Parámetros morfológicos

Se realizaron mediciones de la longitud de los radios 4^{to} y 6^{to} del gonopodio (R4 y R6 respectivamente), utilizando un calibre digital electrónico (Schwyz) con una precisión de 0,1 mm (Figura 9).

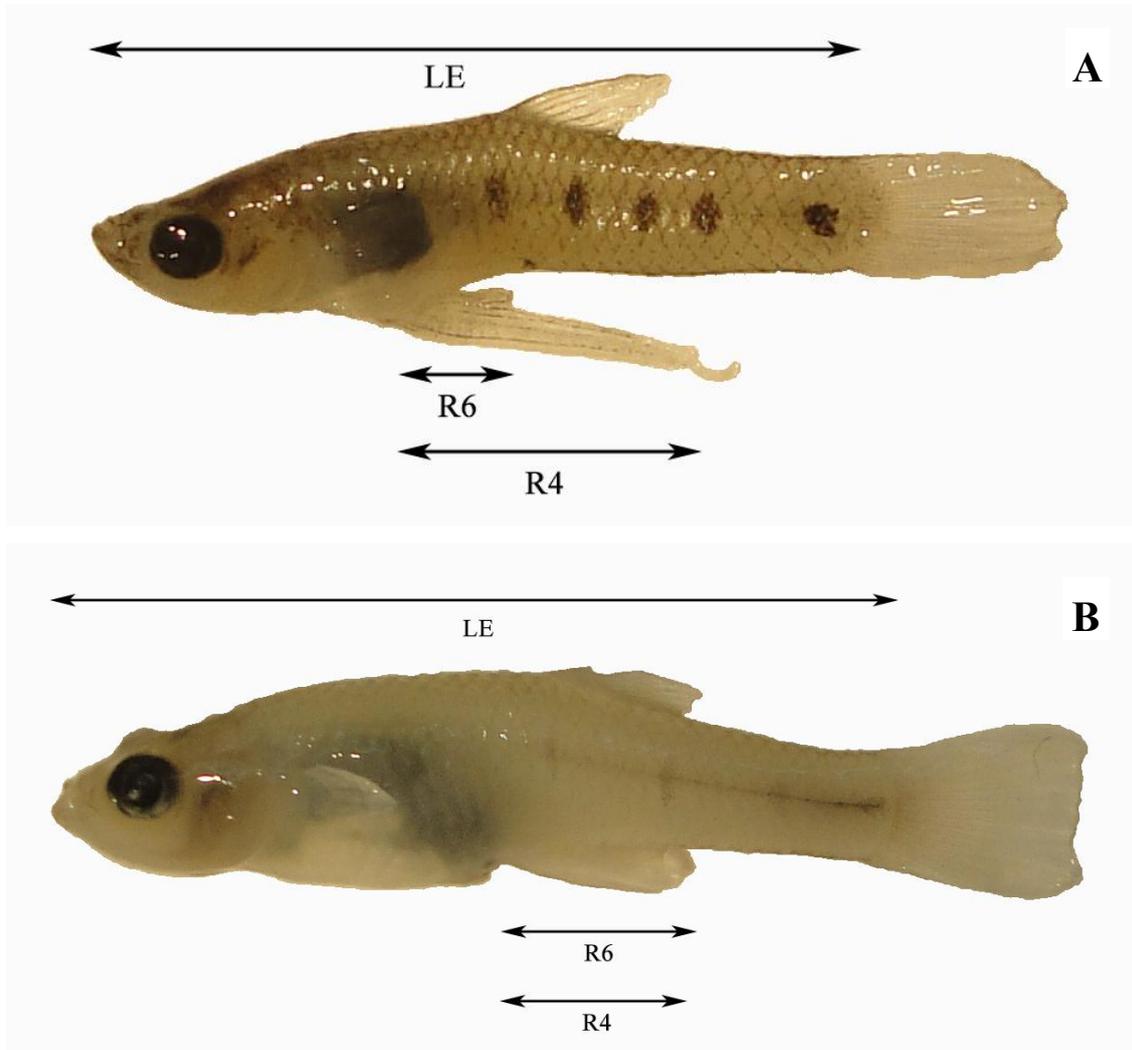


Figura 9. Parámetros morfológicos medidos en ejemplares de *C. decemmaculatus*. A: macho (LE promedio = $16,95 \pm 3,21$ mm; $n = 203$). B: hembra (LE promedio = $24,10 \pm 3,25$ mm; $n = 82$). LE: largo estándar, R4: longitud del cuarto radio de la aleta anal, R6: longitud del sexto radio de la aleta anal.

Se registraron los siguientes caracteres morfológicos de la aleta anal: longitud, osificación, número de radios y la presencia o ausencia de atrofia del primer y segundo radio, engrosamiento del tercer y sexto radio, fusión/reabsorción del noveno y décimo

radio, anquilosis en la base de los radios, primordio gonopodial (PG) y sierras, gancho y cirros (SGC) utilizando los criterios establecidos por Turner (1941) para *Gambusia affinis*.

Anatomía de la aleta anal

Las estructuras cartilaginosas y óseas de los radios de las aletas se caracterizaron luego de la diafanización de los tejidos, utilizando una tinción *in toto* con Alcian-blue y Alizarine-red, respectivamente. Esta coloración se realizó basándose en los protocolos publicados por Chalde *et al.* (2011) y Piovesana *et al.* (2014), ajustándose los tiempos y condiciones para *C. decemmaculatus*. Brevemente, los peces fueron sacrificados con una sobredosis de benzocaína, se realizaron las mediciones correspondientes, y se fijaron luego en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS) 1M durante 24 hs a 4°C. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se conservaron en una solución de etanol 70%. Luego, los peces se colocaron durante 12 horas bajo agitación suave en la solución de Alcian-blue (20 mg en 70 ml de etanol 100% y 30 ml de ácido acético). En este paso, se colorearon los cartílagos y los mucopolisacáridos ácidos que se encuentran sobre las escamas y aletas de los peces. Luego, se neutralizó el pH colocando las muestras en etanol 100% durante 3 días, con renovaciones diarias del medio. La maceración se llevó a cabo transfiriendo los peces a una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3% (3 g en 100 ml de agua deionizada). Las muestras se mantuvieron en esta etapa del proceso de diafanización, hasta que se distinguió claramente el esqueleto a través de las partes blandas del cuerpo. En general, la duración del tratamiento fue de 7 días aproximadamente, dependiendo del tamaño del animal. Posteriormente, la coloración del hueso se realizó colocando las muestras en una solución de Alizarine-red al 0,02% (preparada en agua deionizada con KOH al 1%) bajo agitación suave durante 30 min. A continuación, se lavaron dos veces en PBS durante 5 minutos, y luego se colocaron en la solución transparentadora de Mall al 3% (3 g. de KOH, 20 ml de glicerina, 50 µl de H₂O₂ y 79 ml de agua deionizada) durante 1 a 3 días, dependiendo del tamaño del animal. Se volvieron a lavar dos veces en PBS durante 5 minutos, antes de transferirlos por una serie de soluciones crecientes de glicerina en KOH al 0,5% (en relaciones 1:3, 1:1 y 3:1) durante 2 hs en cada una. Finalmente, la preservación de los ejemplares se realizó almacenándolos en glicerina 100% dentro de tubos Eppendorf de 1,5 ml, listos para su posterior observación.

Antes de proceder a la toma de las fotografías, los peces se colocaron sobre una caja de Petri con 5 gotas de etanol 96% para fluidificar la glicerina. Para facilitar el manejo y la orientación de los peces, se utilizó una solución de agarosa 0,15% en agua deionizada dispuesta sobre otra caja de Petri.

Las estructuras fueron observadas con microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) y se fotografiaron con cámara digital (Evolution BF fase cool color 12 bits) adosada al mismo. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Image-Pro-Plus 4.5.

Cálculo de índices morfométricos

Con los datos registrados por la medición de parámetros de condición general y de la morfología de la aleta anal, se calcularon tres índices: índice gonopodial (IG) (Game *et al.*, 2006), índice de elongación (IE) (Angus *et al.*, 2001) e índice de condición corporal (Factor *K* de Fulton) (Fulton, 1911; Ricker, 1975), ampliamente utilizado en distintos estudios de peces. Estos índices se calcularon en base a las Ecuaciones 3, 4 y 5 respectivamente.

$$IG (\%) = \frac{R4 \times 100}{LE} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$IE = \frac{R4}{R6} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Factor } K = \frac{W \times 100}{LE^3} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde LE es el largo estándar, R4 es la longitud del radio 4 de la aleta anal, W es el peso corporal y R6 es la longitud del radio 6 de la aleta anal.

Asignación de estadios de morfogénesis de la aleta anal

Con los datos registrados por la medición y observación de parámetros de condición general y de la morfología de la aleta anal, así como también de los índices calculados, se establecieron 4 estadios de la morfogénesis del gonopodio, que se diferenciaron de las hembras por observación visual.

Además, se calculó el índice de desarrollo del gonopodio (IDG) propuesto por Young (2011) con el fin de validar la efectividad de su uso. Este índice toma como base del modelo numérico, la relación entre el IG y el IE. Sin embargo, sólo el uso de esta relación no permite segregar entre estadios, ya que no fue suficiente para identificar unívocamente individuos en cada uno de ellos. Por consiguiente, se consideró necesario introducir no sólo variables cuantitativas, sino también cualitativas. Las variables cualitativas que se agregaron al modelo fueron: 1) la aparición de PG; y 2) la aparición de SGC en el extremo del gonopodio. A estas variables cualitativas, se les asignó valores numéricos para convertirlas en cuantitativas. La transformación de las variables cualitativas se realizó asignando un valor arbitrario de 0,3 a la aparición de PG (coeficiente PG), en aquellos individuos que ya desarrollaron un primordio gonopodial y, un valor de 0,25, a aquellos que poseen sierras, ganchos y cirros en el extremo del gonopodio (coeficiente SGC). Estos coeficientes fueron utilizados para transformar tanto al IE como al IG. Las variables transformadas se denominaron IG* y IE*, donde se ponderaron los valores de las variables cualitativas como se indica en las ecuaciones 6 y 7.

$$IE * = IE + coef PG + 4 \times coef SGC \quad \text{Ecuación 6}$$

$$IG * = \frac{IG}{100} + 0,4 \times coef PG + coef SGC \quad \text{Ecuación 7}$$

Como existe una función lineal entre las variables transformadas IG* e IE* con un $R^2 = 0,98$ (Young, 2011), el IDG se calculó luego de la aplicación del logaritmo a la suma de estas variables transformadas, como se muestra en la Ecuación 8.

$$IDG = \log(IG * + IE *) \quad \text{Ecuación 8}$$

Por último, el modelo quedó representado entonces por la Ecuación 9, donde las ecuaciones 6 y 7 se reemplazan en 8, generando la escala definitiva de IDG.

$$IDG = \log\left(\frac{IG}{100} + 1,4 \times coef PG + 5 \times coef SGC + IE\right) \quad \text{Ecuación 9}$$

Este índice fue calculado para cada ejemplar de los distintos estadios del ciclo de vida estudiados. La validación de IDG contempló la efectividad del modelo y se pusieron a

prueba los valores asignados como límites inferior y superior para cada estadio. Se comprobó la potencia del modelo en función a su eficiencia predictiva: número de éxitos en función del total de ejemplares analizados, expresado en porcentaje.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación de medias, a través de la prueba de Tukey. Las variables fueron transformadas a una escala logarítmica, cuando no cumplieron con los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad. Estos análisis se realizaron utilizando el software Prism Graphpad 5.0 y los análisis de correlación, utilizando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Resultados

Modelos de crecimiento y parámetros de condición general

Modelo de crecimiento de Von Bertalanffy

El crecimiento, expresado como LE, presentó una gran variabilidad con la edad ($n = 289$; $R^2 = 0,712$; Figura 10). Los parámetros del modelo de crecimiento de Von Bertalanffy, estimados a través de la Ecuación 1, se muestran en la Tabla 3. Para la realización de esta tabla, se tomaron ambos sexos debido a la imposibilidad de diferenciar visualmente entre machos y hembras en individuos que no presentaban caracteres sexuales secundarios distintivos.

Tabla 3. Parámetros del modelo de crecimiento de Von Bertalanffy, estimados a través de la Ecuación 1

Parámetros del modelo	Valor
L_{∞}	36,11 mm
k	0,0027 días ⁻¹
t_0	-78,81 días

L_{∞} es la máxima longitud teórica esperada, k es la tasa de crecimiento bajo las condiciones de cría empleadas, t es la edad y t_0 es el tiempo hipotético en el cual la longitud es nula.

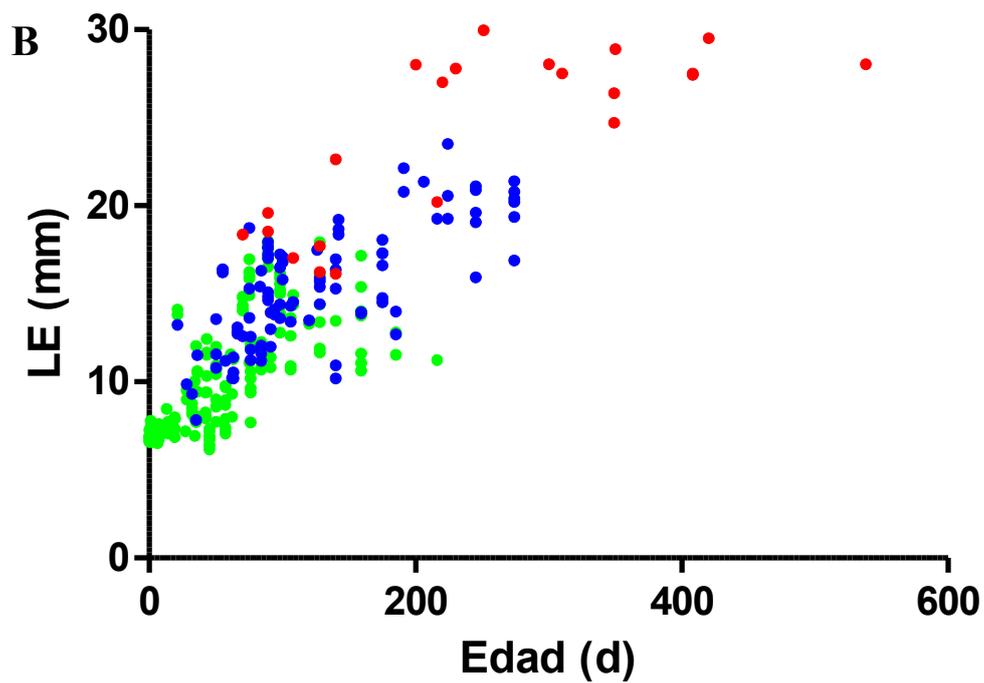
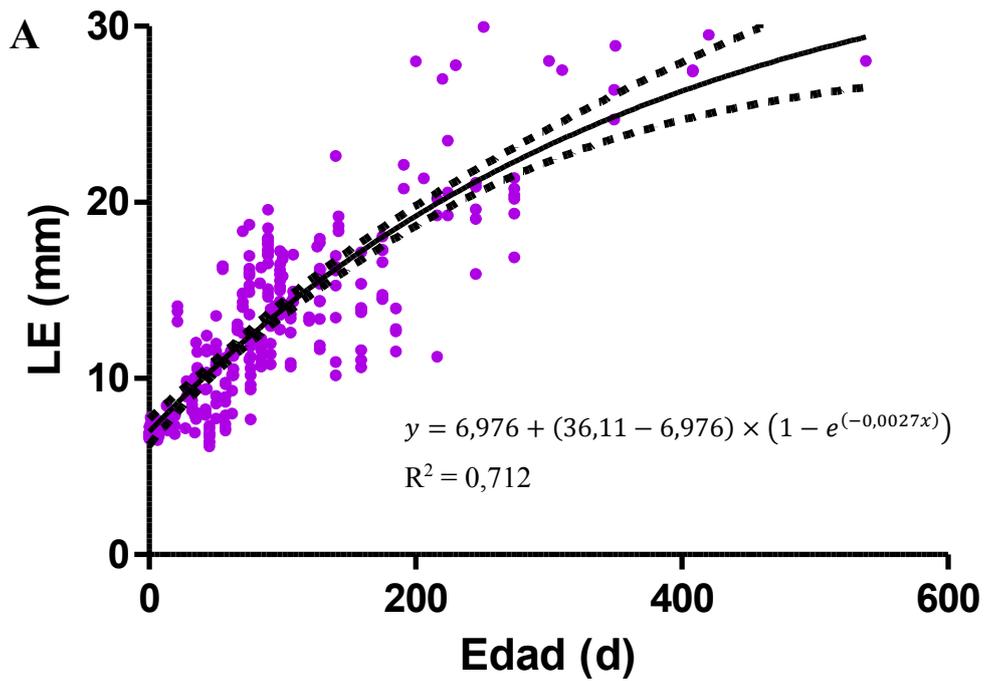


Figura 10. Diagrama de dispersión del largo estándar en función de la edad. A: La línea ajusta el modelo de crecimiento de Von Bertalanffy ($n = 289$; $R^2 = 0,712$). Líneas punteadas indican los límites inferior y superior del intervalo de confianza 95%. B: \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras.

Largo estándar

Los valores registrados del largo estándar se muestran discriminados por sexos en la Figura 11 ($n = 275$). Contemplando ejemplares del mismo rango de edades, las hembras adultas presentaron mayor tamaño que los machos adultos, y éstos mayor que los individuos indiferenciados ($p < 0,01$). En el muestreo, el largo estándar de las hembras fue igual a $24,10 \pm 3,25$ mm ($n = 82$), mientras que el de los machos alcanzaba a $16,95 \pm 3,21$ mm ($n = 203$).

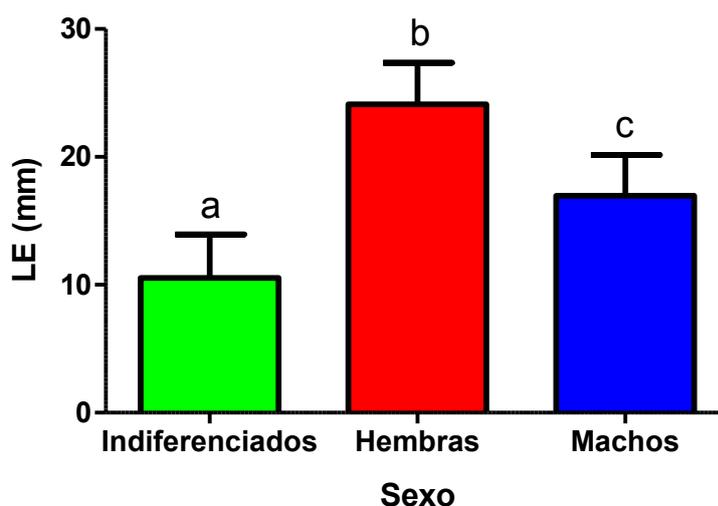


Figura 11. Media del largo estándar (LE) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.

Peso corporal

Los valores promedios del peso corporal, discriminados por sexos se visualizan en la Figura 12 ($n = 292$). Contemplando ejemplares del mismo rango de edades, el peso de las hembras adultas fue significativamente mayor que el observado en los ejemplares sexualmente indiferenciados y en los machos ($p < 0,01$). Las hembras registraron valores promedio de $297,8 \pm 173,1$ mg ($n = 35$), mientras que los machos $61,8 \pm 33,3$ mg ($n = 119$).

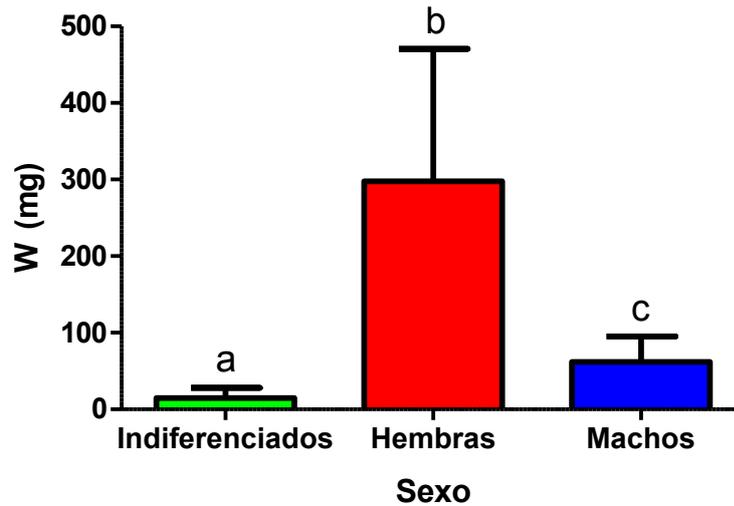


Figura 12. Media del peso corporal (W) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.

Modelo de crecimiento de la relación largo-peso

La relación entre el largo estándar y el peso corporal, discriminadas por sexo se muestran en la Figura 13A, mostrando que en general las hembras presentan mayor tamaño y peso que los machos. Independientemente del sexo, existe una relación no lineal entre el peso corporal y el largo estándar ($R^2 = 0,947$; $n = 292$; Figura 13B). Esta relación puede seguir una relación lineal aplicando el logaritmo neperiano ($R^2 = 0,987$; $n = 292$; Figura 13C). A partir de esta última figura, se estimaron los coeficientes del modelo de crecimiento de la relación largo-peso usando los parámetros definidos en la Ecuación 2 y se muestran en la Tabla 4.

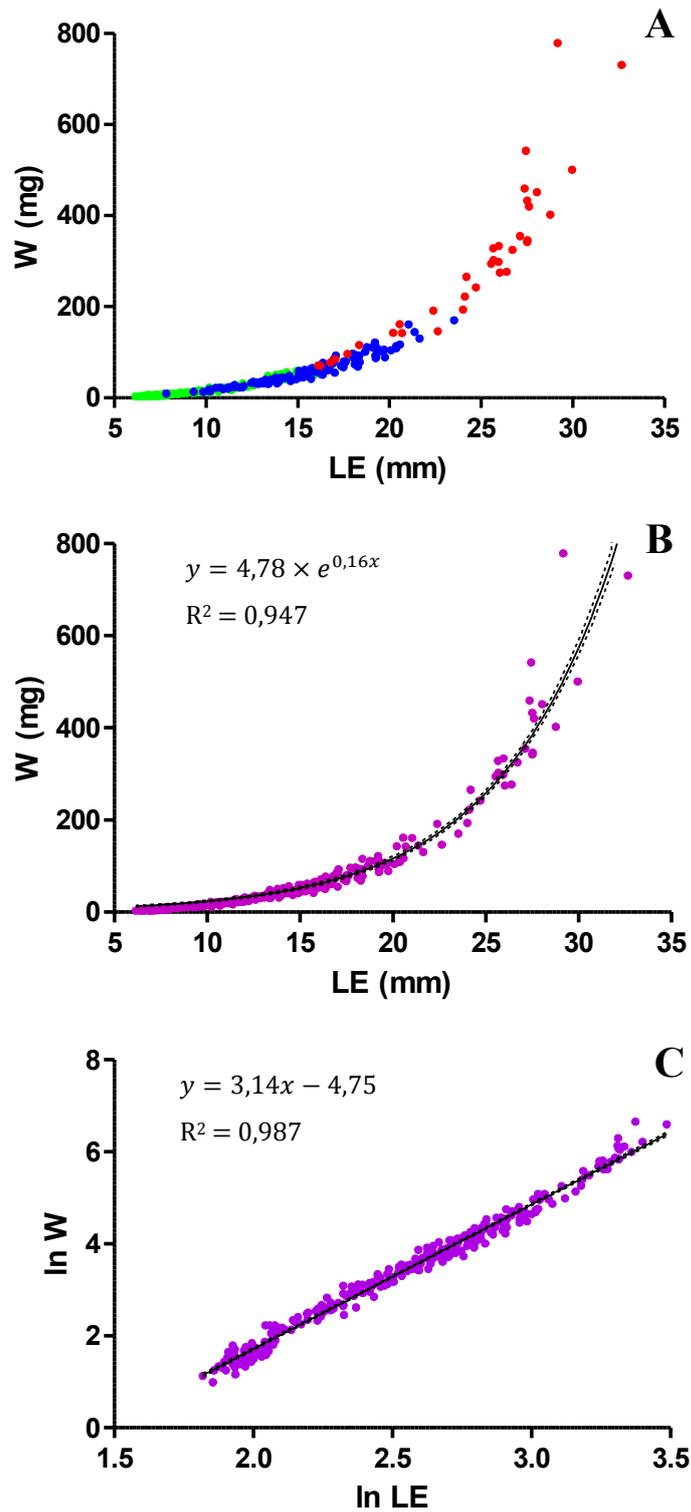


Figura 13. Diagrama de dispersión del peso corporal (W) en función del largo estándar (LE) ($n = 292$). A: \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. B: Curva de regresión no lineal entre W y LE. C: Curva de regresión lineal entre los logaritmos neperianos de W y LE. B-C: Líneas punteadas indican los límites inferior y superior del intervalo de confianza 95%.

Tabla 4. Coeficientes del modelo de crecimiento de la relación largo-peso estimados a través de la Ecuación 2

Coeficientes del modelo	Valor
<i>A</i>	1,51 (LE = 4,54 mm)
<i>B</i>	3,14

Los coeficientes *A* y *B* indican el valor de la ordenada al origen y de la pendiente de la regresión, respectivamente.

Condición corporal

Contemplando ejemplares del mismo rango de edades, se observó que las hembras presentan un índice de condición corporal significativamente mayor que los machos y los ejemplares sexualmente indiferenciados ($p < 0,01$; $n = 292$; Figura 14). El valor del factor *K* en hembras fue $1,82 \pm 0,34 \text{ mg mm}^{-3}$ ($n = 35$), mientras que en machos fue $1,46 \pm 0,18 \text{ mg mm}^{-3}$ ($n = 119$).

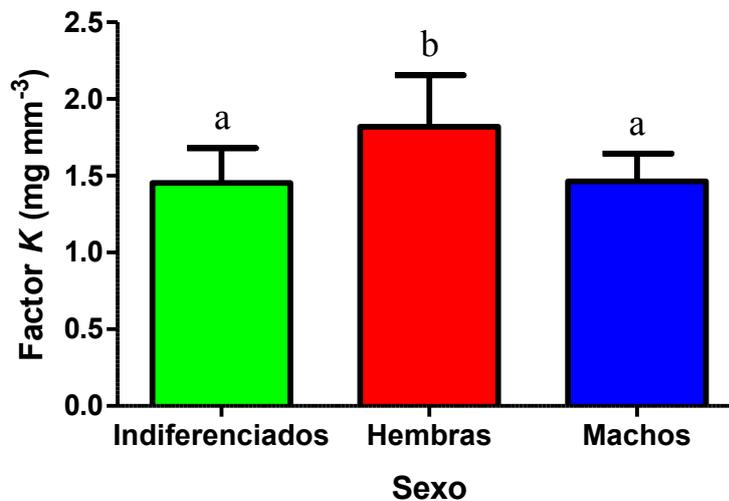


Figura 14. Media del índice de condición corporal (Factor *K*) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.

Criterios para la determinación del fenotipo sexual

La aleta anal de los ejemplares sexualmente indiferenciados se encuentra formada por 10 radios, al igual que en las hembras. Sin embargo, en ellas la aleta anal aumenta su tamaño

conforme lo hace el crecimiento en peso y talla. Independientemente del sexo, los valores de R4 y R6 correlacionaron positivamente con W ($R^2 = 0,84$ y $0,77$ respectivamente; $n = 35$; $p \leq 0,01$). La relación entre R4 y W discriminada por sexos se visualiza en la Figura 15A. Esto podría usarse para estimar un modelo de crecimiento del radio 4, tanto en hembras (Figura 15B: $R^2 = 0,965$; $n = 162$) como en machos (Figura 15C: $R^2 = 0,836$; $n = 243$).

En machos, sin embargo, los valores de R4 correlacionaron positivamente con la talla y el peso con R^2 igual a $0,86$ y $0,83$ respectivamente, mientras que los valores de R6 correlacionaron con R^2 igual a $0,87$ y $0,92$ respectivamente ($n = 191$; $p \leq 0,01$).

Por otra parte, el desarrollo del gonopodio involucra una serie de cambios morfológicos que, ordenados ontológicamente, se pueden resumir en:

- Atrofia del primer y segundo radio.
- Engrosamiento del tercer radio.
- Formación del primordio gonopodial.
- Elongación alométrica de los radios tercero, cuarto y quinto respecto a los radios sexto, séptimo y octavo.
- Osificación completa de los radios.
- Fusión/reabsorción del noveno y décimo radio
- Anquilosis en la base de los radios
- Engrosamiento del sexto radio.
- Aparición de sierras, ganchos y cirros.

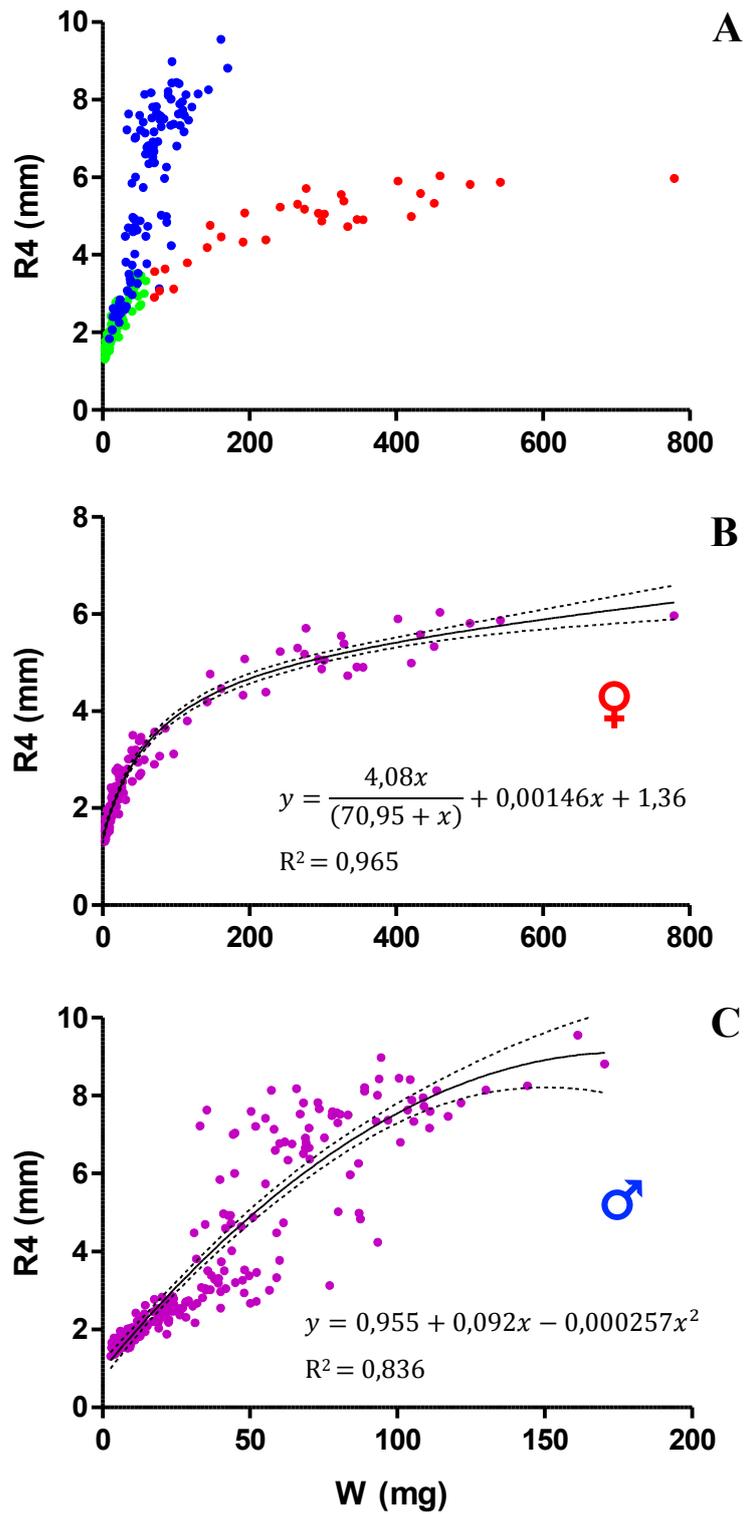


Figura 15. Relación entre la longitud del radio 4 de la aleta anal (R4) y el peso corporal (W). A: Diagrama de dispersión discriminado por sexos: ◆ individuos sexualmente indiferenciados, ◆ machos y ◆ hembras. B: Modelo de crecimiento en hembras ($R^2 = 0,965$; $n = 162$). C: Modelo de crecimiento en machos ($R^2 = 0,836$; $n = 243$).

Teniendo en cuenta los distintos parámetros cuantitativos y cualitativos estudiados, en la Tabla 5 se detalla un resumen de los criterios que permiten determinar el fenotipo sexual de *C. decemmaculatus*. La relación entre estos parámetros fue posteriormente confirmada por histología gonadal (ver capítulo N°2).

Tabla 5. Criterios que permiten determinar el fenotipo sexual de *C. decemmaculatus*

Fenotipo sexual	Característica	Figura
Sexualmente indiferenciado	Ausencia de PG y LE < 18 mm	n.c.
Macho	Presencia de PG y cualquier valor de LE	n.c.
	IG > 21% e IE > 1,25	Figura 16
	IG > 27,2% y cualquier valor de W	Figura 17
	IE > 1,36 y cualquier valor de W	Figura 18
	IE > 1,36 y cualquier valor de R4	Figura 19
	IE > 1,36 y cualquier valor de R6	Figura 20
	IG > 28% y cualquier valor de LE	Figura 21
Hembra	Ausencia de PG y LE > 18 mm	n.c.
	IG < 23% y W > 85 mg	Figura 17
	IE < 1,15 y W > 85 mg	Figura 18
	IE < 1,36 y R4 > 4,6 mm	Figura 19
	IE < 1,36 y R6 > 3,8 mm	Figura 20
	IG < 24% y LE > 18 mm	Figura 21

PG: primordio gonopodial; IG: índice gonopodial; IE: índice de elongación; LE: largo estándar; W: peso corporal; R4: longitud del cuarto radio de la aleta anal; R6: longitud del sexto radio de la aleta anal; n.c: no corresponde a parámetros cuantitativos.

En base a estos criterios, a continuación, se muestra de manera individual cada una de las relaciones entre parámetros presentadas en la Tabla 5. En el caso de la relación entre el índice gonopodial y el índice de elongación ($R^2 = 0,84$; $n = 197$), se puede identificar inequívocamente a los machos cuando el índice de elongación es mayor que 1,25 y el índice gonopodial es mayor que 21% (Figura 16). Sin embargo, cabe aclarar que, aunque algunos machos presentan valores por debajo de estos parámetros, no pueden ser diferenciados de las hembras y los individuos indiferenciados. Este es el criterio utilizado para analizar la relación entre el resto de los parámetros.

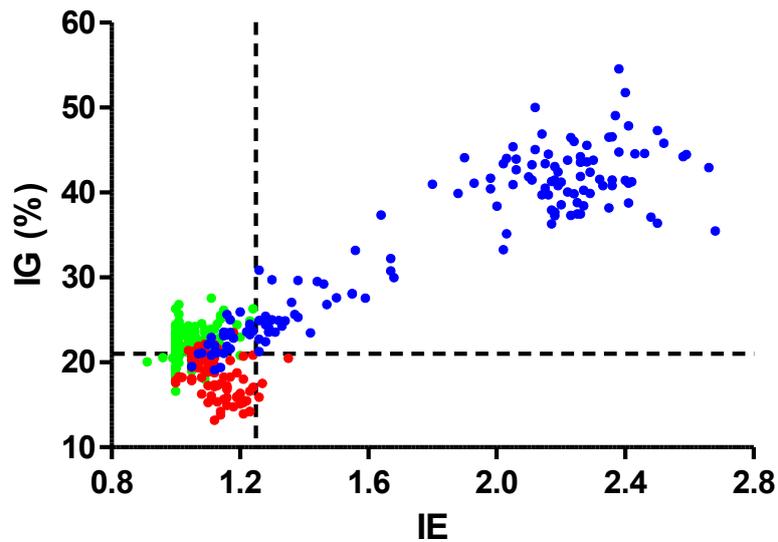


Figura 16. Diagramas de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del índice de elongación (IE). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. Líneas de corte: IG = 21% e IE = 1,25. De esta figura se puede establecer el siguiente criterio: IG > 21% e IE > 1,25 son machos.

Cuando se observa la relación entre el índice gonopodial y el peso corporal, se identifican inequívocamente a los machos cuando el IG es mayor que 27,2%, independientemente del peso (Figura 17). Mientras que las hembras presentan un IG menor que 23%, independientemente del peso, pero pueden ser identificadas inequívocamente cuando éste es mayor que 85 mg.

A su vez, en el caso de la relación entre el índice de elongación y el peso corporal, se puede observar un comportamiento de los datos similar a los descritos anteriormente (Figura 18). Las hembras pueden ser identificadas cuando se registra un peso del animal mayor que 85 mg y un IE menor que 1,15; mientras que los individuos que presentan un IE mayor que 1,36 son machos, independientemente del peso corporal.

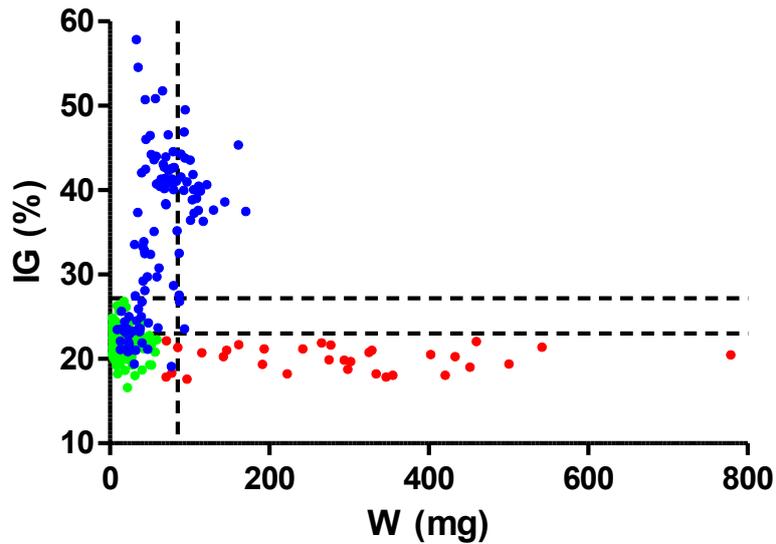


Figura 17. Diagrama de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del peso corporal (W). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. Líneas de corte: IG = 23% y 27,2%; Peso = 85 mg. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) IG < 23% y W > 85 mg son hembras; 2) IG > 27,2% son machos, independientemente del peso corporal.

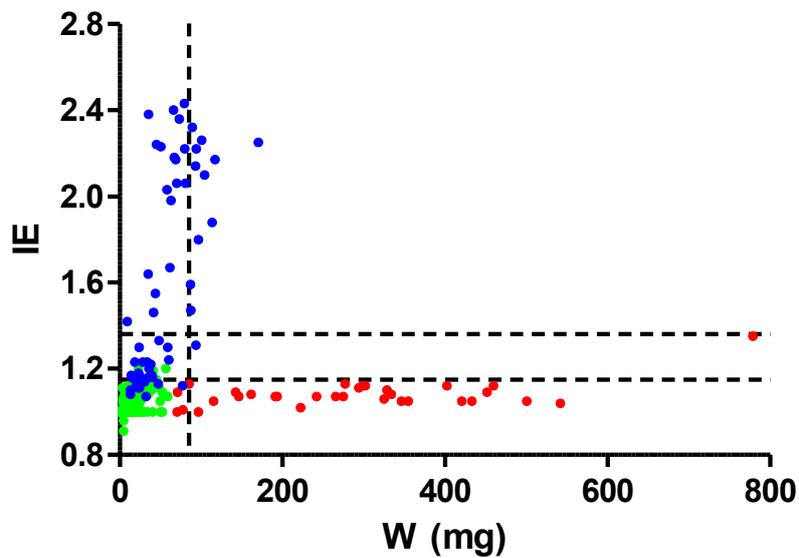


Figura 18. Diagrama de dispersión del índice de elongación (IE) en función del peso corporal (W). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. Líneas de corte: IE = 1,15 y 1,36; W = 85 mg. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) W > 85 mg y IE < 1,15 son hembras; 2) IE > 1,36 son machos, independientemente del peso corporal.

Al observar la relación entre la longitud del radio 4 de la aleta anal con el índice de elongación, se puede identificar inequívocamente a los machos cuando el IE presenta

valores mayores que 1,36 (Figura 19). Mientras que resulta más difícil identificar a las hembras y a los ejemplares sexualmente indiferenciados. En el caso de las hembras, esto solamente puede lograrse cuando el R4 es mayor que 4,6 mm y el IE es menor que 1,36. En el caso de los machos, una tendencia similar a la descrita anteriormente presenta la relación entre la longitud del radio 6 de la aleta anal con el índice de elongación (Figura 20). Mientras que las hembras solamente pueden ser identificadas cuando el R6 es mayor que 3,8 mm y el IE es menor que 1,36.

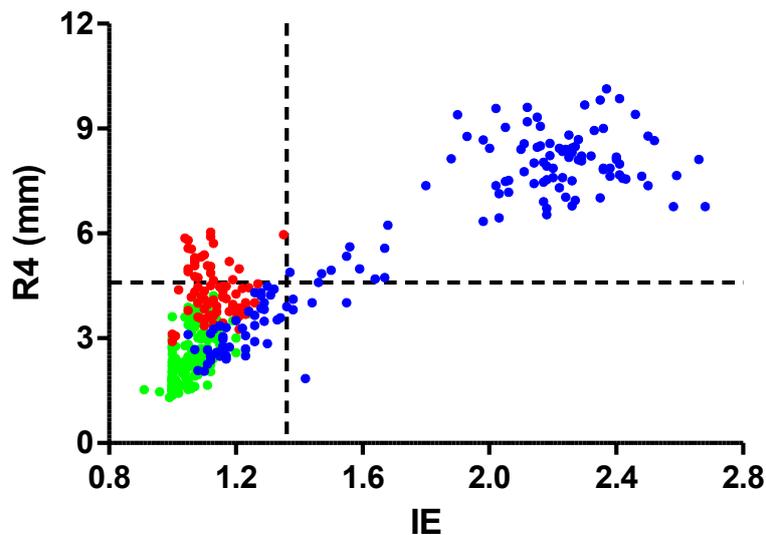


Figura 19. Diagrama de dispersión de la longitud del radio 4 de la aleta anal en función del índice de elongación (IE). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. Líneas de corte: $R4 = 4,6$ mm; $IE = 1,36$. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) $R4 > 4,6$ mm e $IE < 1,36$ son hembras; 2) $IE > 1,36$ son machos, independientemente de la longitud del radio 4 de la aleta anal.

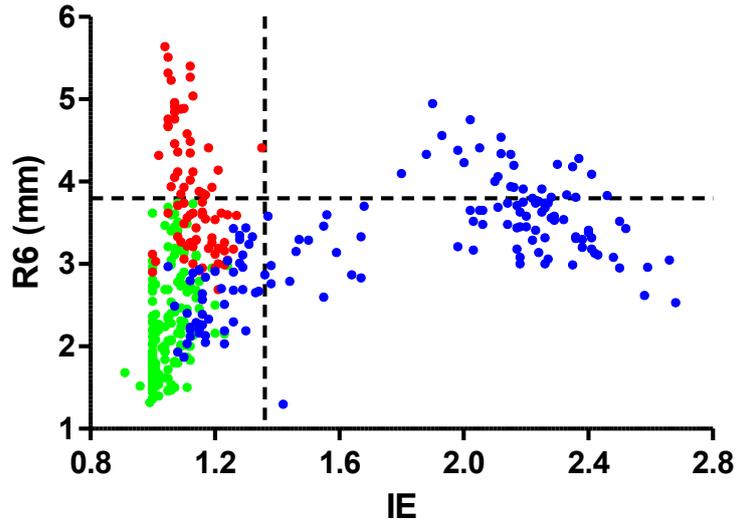


Figura 20. Diagrama de dispersión de la longitud del radio 6 de la aleta anal en función del índice de elongación (IE). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras. Líneas de corte: $R6 = 3,8$ mm; $IE = 1,36$. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) $R6 > 3,8$ mm e $IE < 1,36$ son hembras; 2) $IE > 1,36$ son machos, independientemente de la longitud del radio 6 de la aleta anal.

Finalmente, la relación entre el índice gonopodial y el largo estándar muestra dos grupos bien diferenciados, donde se pueden identificar claramente a los machos cuando se obtienen valores de IG mayores que 28%, independientemente de la talla (Figura 21). Mientras que las hembras se asocian con bajos valores de IG (menores que 24%) y altos valores de LE (mayores que 18 mm). Sin embargo, tal como se evidencia también en los gráficos anteriores, los ejemplares sexualmente indiferenciados no pueden ser identificados inequívocamente de los fenotipos macho y hembra.

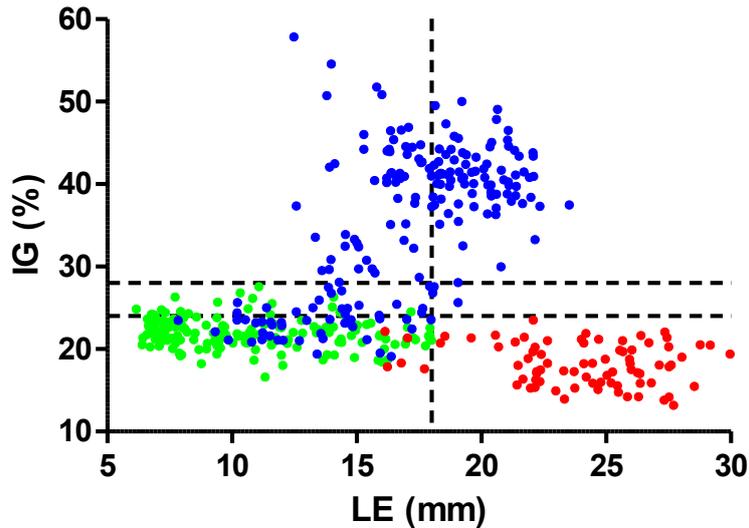


Figura 21. Diagrama de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del largo estándar (LE). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: IG = 24% y 28%; LE = 18 mm. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) IG < 24% y LE > 18 mm son hembras; 2) IG > 28% son machos, independientemente de la talla.

Relación entre los parámetros morfológicos de la aleta anal y la talla o la edad, discriminada por fenotipos sexuales

Longitud del cuarto radio de la aleta anal

Los resultados muestran que, para esta especie, la longitud del 4^{to} radio de la aleta anal de los machos adultos ($8,03 \pm 0,88$ mm; $n = 91$) puede llegar a duplicar al de las hembras ($4,36 \pm 0,76$ mm; $n = 79$) siendo estadísticamente diferente ($p < 0,01$). Esta diferenciación puede observarse en la variación de este parámetro con respecto al largo estándar ($n = 443$, Figura 22A) y a la edad ($n = 450$, Figura 22B). Como se puede observar en las figuras, la diferencia de este parámetro entre sexos es más clara cuando se expresa en función de la talla. En las hembras, la longitud del 4^{to} radio crece proporcionalmente a la talla, mientras que en los machos existe una inflexión en la elongación de este radio a partir de una talla de 12,6 mm para los ejemplares que se diferencian fenotípicamente temprano y de 16,4 mm para los tardíos.

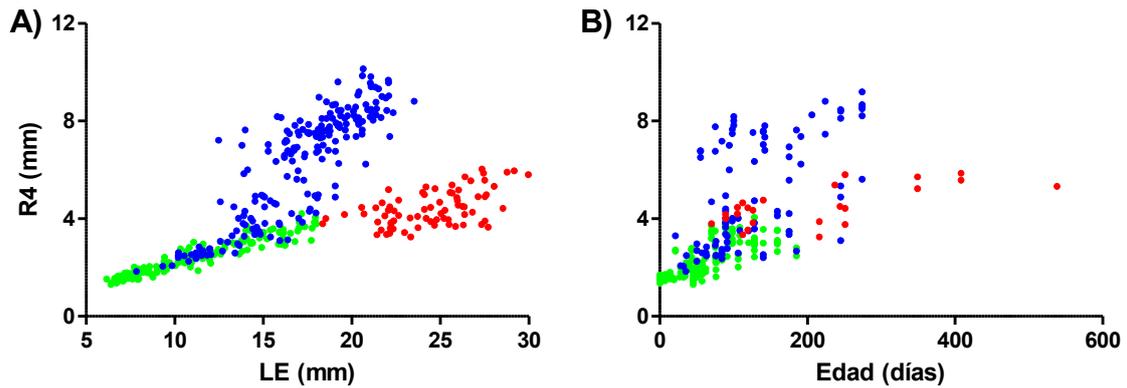


Figura 22. Diagrama de dispersión donde se observa la longitud del radio 4 de la aleta anal en función de la talla (A) y la edad (B). ◆ individuos sexualmente indiferenciados, ◆ machos y ◆ hembras.

Longitud del sexto radio de la aleta anal

La longitud promedio del 6^{to} radio de la aleta anal en los machos adultos midió $3,68 \pm 0,49$ mm ($n = 67$) y en las hembras $3,87 \pm 0,75$ mm ($n = 79$) y no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($n = 146$; $p > 0,05$). En la Figura 23A y B se muestra la variación de este parámetro en función del largo estándar ($n = 392$) y a la edad ($n = 399$), respectivamente.

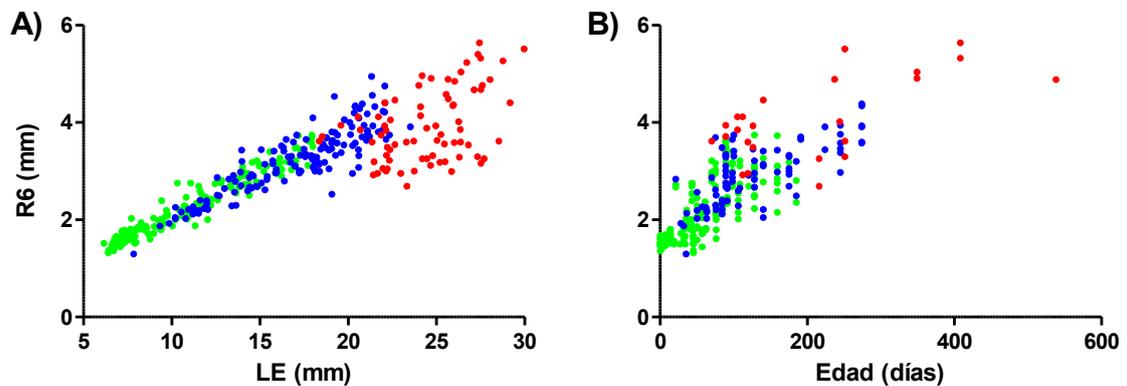


Figura 23. Diagrama de dispersión donde se observa la longitud del radio 6 de la aleta anal en función de la talla (A) y la edad (B). ◆ individuos sexualmente indiferenciados, ◆ machos y ◆ hembras.

Índice gonopodial

El índice gonopodial en los machos que presentaban el gonopodio completamente desarrollado, mostró valores promedio de $41,48 \pm 3,89 \%$ ($n = 91$), que se diferenciaron significativamente ($n = 170$; $p < 0,01$) de las hembras $18,22 \pm 3,49 \%$ ($n = 79$). La divergencia de los valores del IG entre machos y hembras en función del largo estándar ($n = 443$) y de la edad ($n = 450$) puede ser observada en la Figura 24A y B, respectivamente.

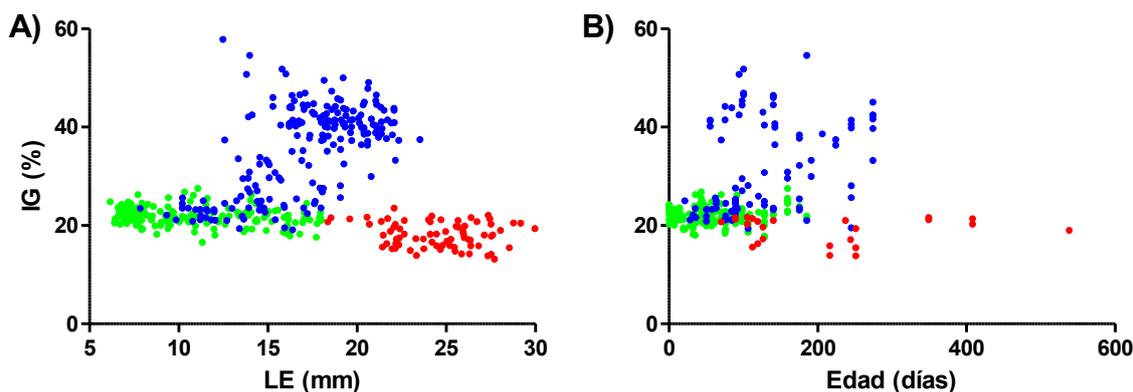


Figura 24. Diagrama de dispersión donde se observa el índice gonopodial en función de la talla (A) y la edad (B). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.

Índice de elongación

El índice de elongación de los machos adultos se diferenció con significancia estadística del de las hembras ($n = 146$; $p < 0,01$), registrando valores promedio de $2,25 \pm 0,17$ ($n = 67$) y $1,13 \pm 0,07$ ($n = 79$), respectivamente. Esta diferenciación puede observarse en la variación de este parámetro con respecto al largo estándar ($n = 392$, Figura 25A) y a la edad ($n = 399$, Figura 25B).

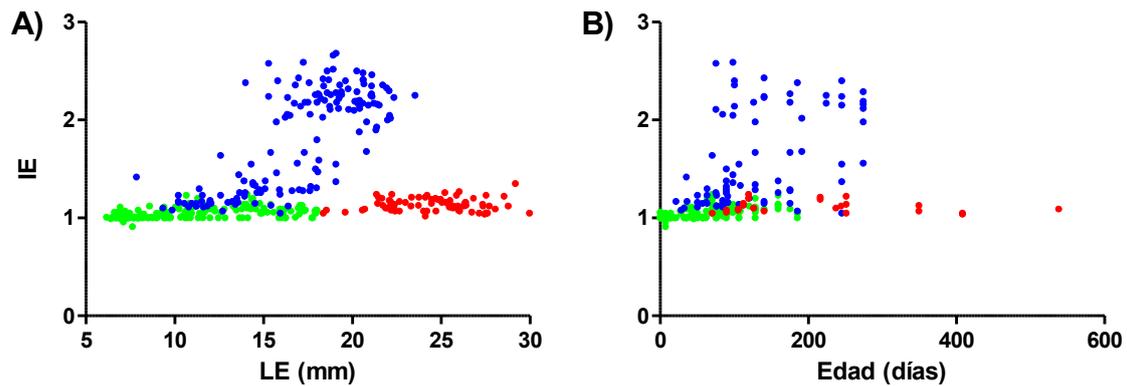


Figura 25. Diagrama de dispersión donde se observa el índice de elongación en función de la talla (A) y la edad (B). \blacklozenge individuos sexualmente indiferenciados, \blacklozenge machos y \blacklozenge hembras.

Asignación de estadios de la morfogénesis del gonopodio y diferenciación con la aleta anal de las hembras

En función a las características previamente descritas, se definieron cuatro estadios de morfogénesis del gonopodio, diferenciándolos de la aleta anal de las hembras.

Aleta anal de ejemplares sexualmente indiferenciados y Estadio 1 del gonopodio

La aleta anal de los peces que no pueden ser diferenciados por su fenotipo, se caracteriza por poseer una forma semilobular sin signos de elongación de los radios 3^{ro}, 4^{to} y 5^{to}. Por lo tanto, machos y hembras presentarán estos caracteres desde su nacimiento y hasta que se produzca la diferenciación.

En el presente estudio, se asignaron estas características a la etapa más temprana de la morfogénesis del gonopodio, el cual fue denominado como Estadio 1, característico de individuos fenotípicamente indiferenciados sexualmente. La leve coloración roja de los radios se debe a una osificación débil (Figura 26).

Los animales que se encuentran en este estadio, se caracterizan por presentar en promedio una aleta anal con 5, 7 y 12 segmentos en los radios 1, 2 y 3, respectivamente; 17 y 18 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 4, respectivamente; 16 segmentos en cada una de las secciones anterior y posterior del radio 5; 17 y 18 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 6, respectivamente; 14 y 13 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 7, respectivamente; 11 segmentos en cada una de las secciones anterior y posterior del radio 8; 9 segmentos en cada una de las secciones

anterior y posterior del radio 9; y finalmente, 6 y 3-4 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 10, respectivamente.

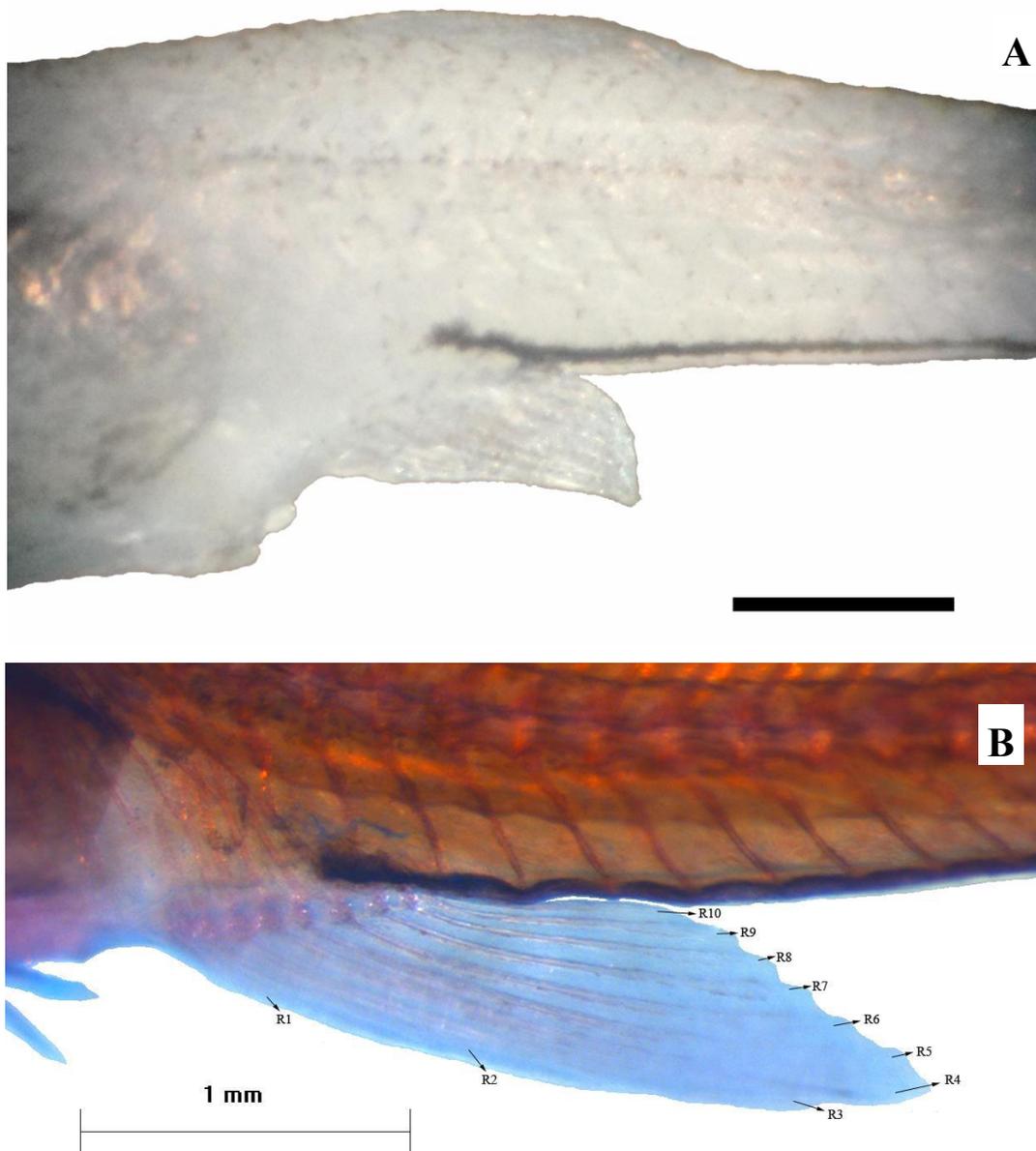


Figura 26. Aleta anal representativa de ejemplares sexualmente indiferenciados que corresponde al Estadio 1 de machos fenotípicos. A: Fotografía de un ejemplar sexualmente indiferenciado. B: Coloración de las estructuras cartilaginosas se observan coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).

La distribución de frecuencias de tallas de los peces que se encuentran en este estadio 1, se caracterizó por presentar asimetría positiva (0,65) y curtosis negativa (-0,78) (Figura

27). Por ello, estos datos se ajustaron a una distribución de tipo gamma. Estos ejemplares presentaron valores promedio de IG de $21,93 \pm 1,79\%$ ($n = 167$); IE de $1,08 \pm 0,05$ ($n = 167$); LE de $15,35 \pm 2,69$ mm ($n = 175$) y edad de 105 ± 35 días ($n = 169$).

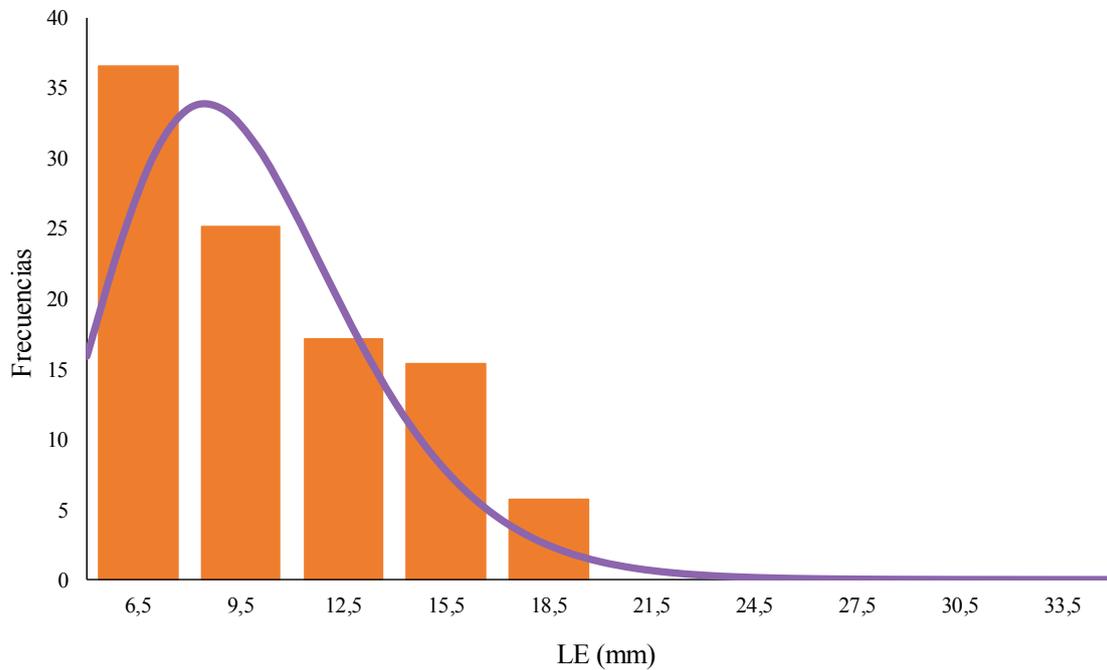


Figura 27. Distribución de frecuencias de las tallas de ejemplares sexualmente indiferenciados, considerados como Estadio 1 de la morfogénesis del gonopodio ($n = 175$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Estadio 2 del gonopodio

Este estadio se caracterizó por el engrosamiento del tercer radio y el comienzo de la elongación de los radios tercero, cuarto y quinto, que determinaron la formación del primordio gonopodial (Figura 28A). En este estadio, se pudieron observar machos desde la aparición del primordio gonopodial (Figura 28B) hasta la consecuente elongación de los radios mencionados anteriormente (Figura 28C).

En este estudio, se han registrado machos en Estadio 2 con valores de talla desde los 7,84 mm (21 días de edad) hasta los 19,06 mm (274 días de edad).

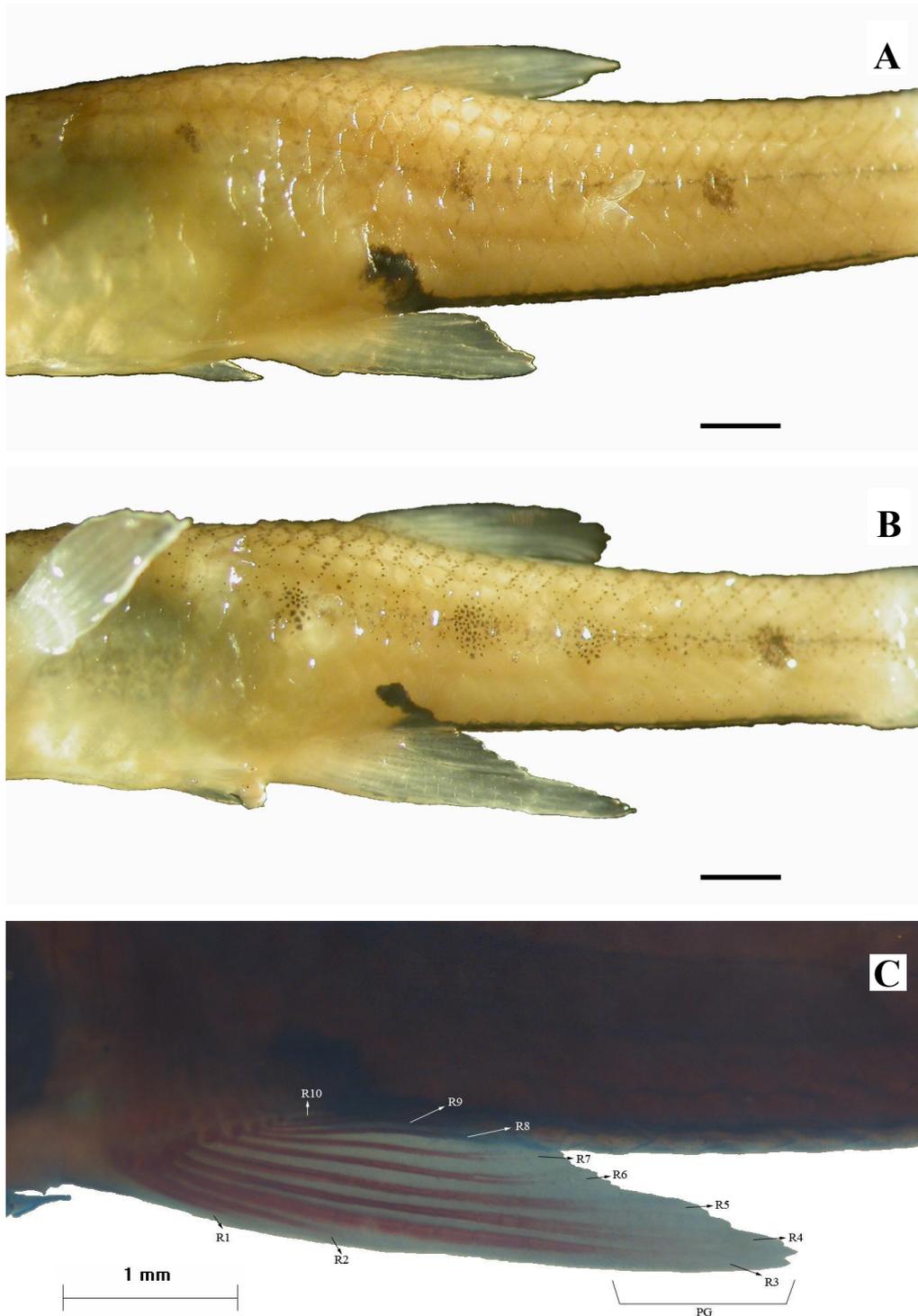


Figura 28. Gonopodio representativo de machos fenotípicos en Estadio 2. A-B: Fotografías de machos donde se observa la aparición del primordio gonopodial (A) y la consecuente elongación de los radios tercero, cuarto y quinto (B). C: Coloración de las estructuras cartilaginosa se observan coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal. PG = primordio gonopodial (Barra = 1 mm).

La distribución de frecuencias de tallas de los peces en estadio 2, presentó una distribución normal simétrica (Figura 29). En estos ejemplares, los valores promedio de IG se encuentran en $24,26 \pm 2,93\%$ ($n = 60$); IE en $1,26 \pm 0,13$ ($n = 60$); LE en $13,89 \pm 2,69$ mm ($n = 60$) y edad en $104,67 \pm 58,15$ días ($n = 52$).

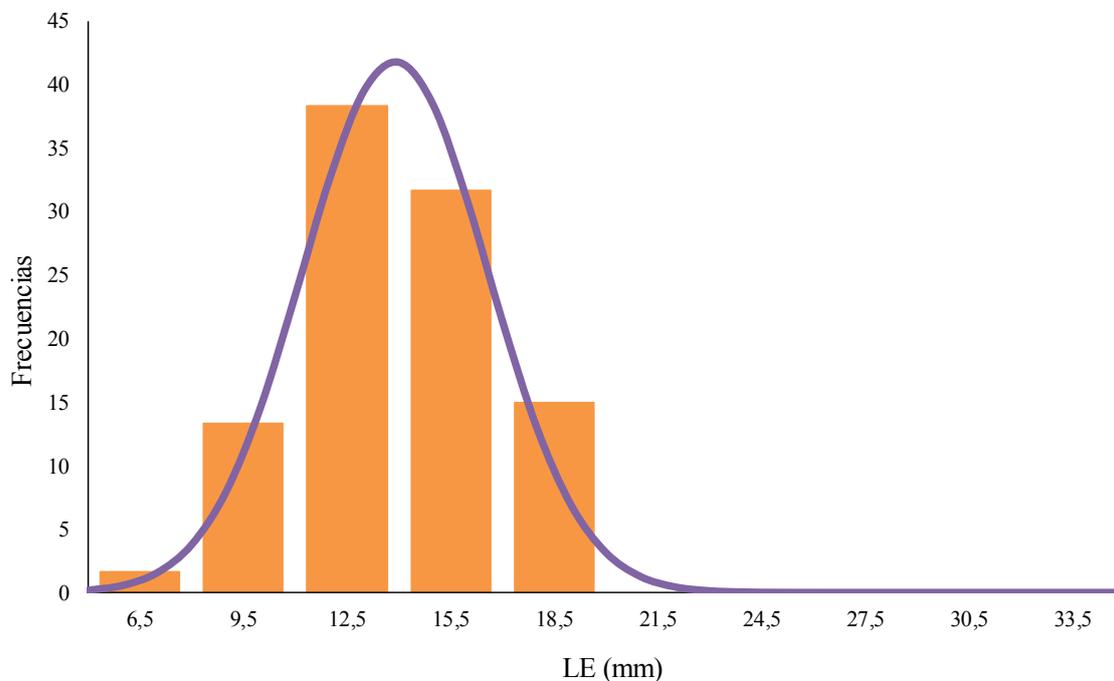


Figura 29: Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 2 ($n = 60$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Estadio 3 del gonopodio

Se caracterizó por un gonopodio prominente debido a la elongación alométrica progresiva de los radios 3ro, 4to y 5to respecto a los radios 6to, 7mo y 8vo. Sin embargo, no se observó osificación completa de los radios, ni presencia de sierras, ganchos y cirros en el extremo distal de la aleta (Figura 30A y B).

En este estudio, se han registrado machos en Estadio 3 con valores de talla desde los 12,58 mm (45 días de edad) hasta los 20,79 mm (274 días de edad).

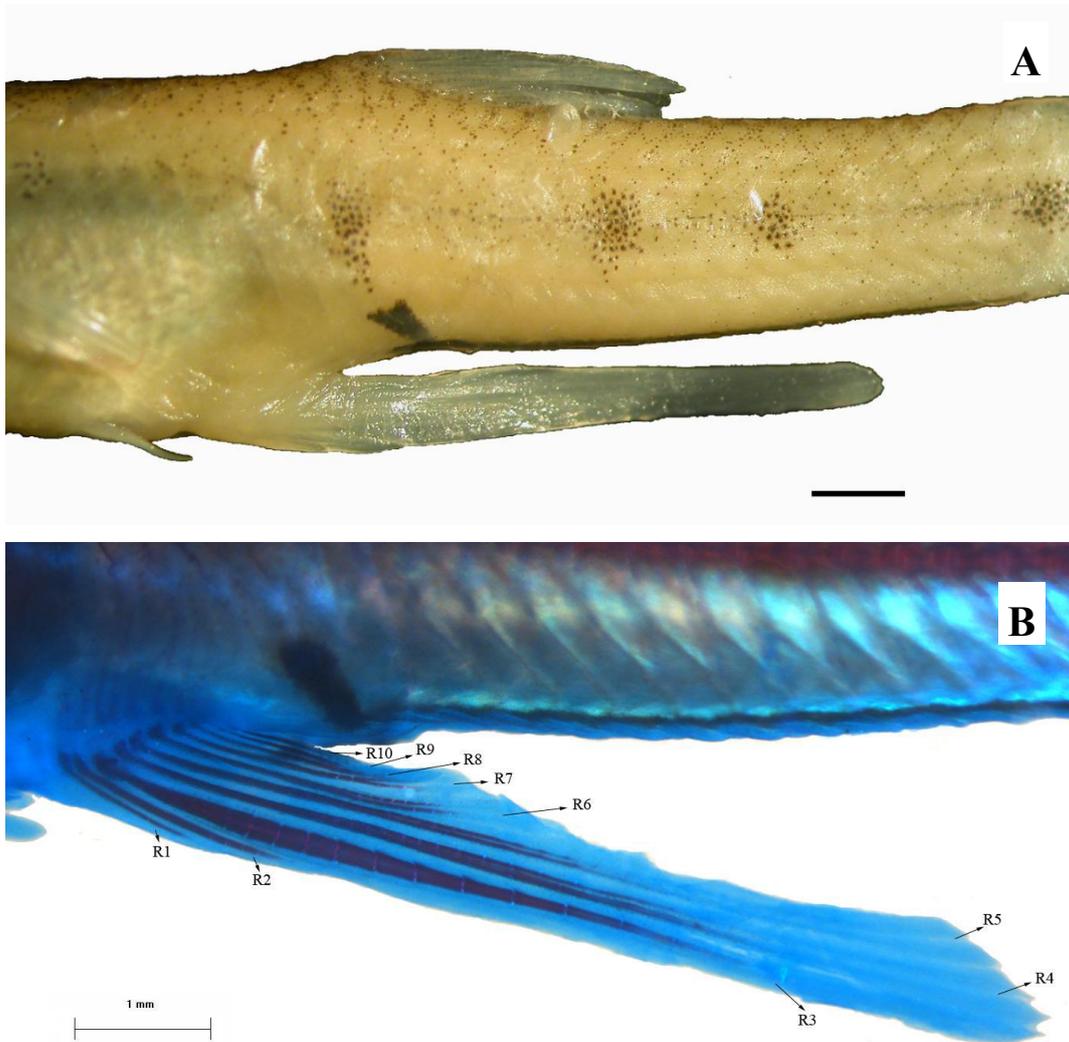


Figura 30. Machos representativos de Estadío 3. A: Fotografía de un macho con el gonopodio elongado. B: Coloración *in toto* del gonopodio. Las estructuras cartilaginosas se encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).

La distribución de frecuencias de tallas de los peces en Estadío 3, presentó una distribución normal simétrica (Figura 31). Estos ejemplares presentaron un aumento significativo en IG con valores promedio de $40,48 \pm 5,22\%$ ($n = 24$); IE de $2,08 \pm 0,31$ ($n = 17$); LE de $16,59 \pm 1,81$ mm ($n = 24$) y edad de $106,00 \pm 41,89$ días ($n = 14$).

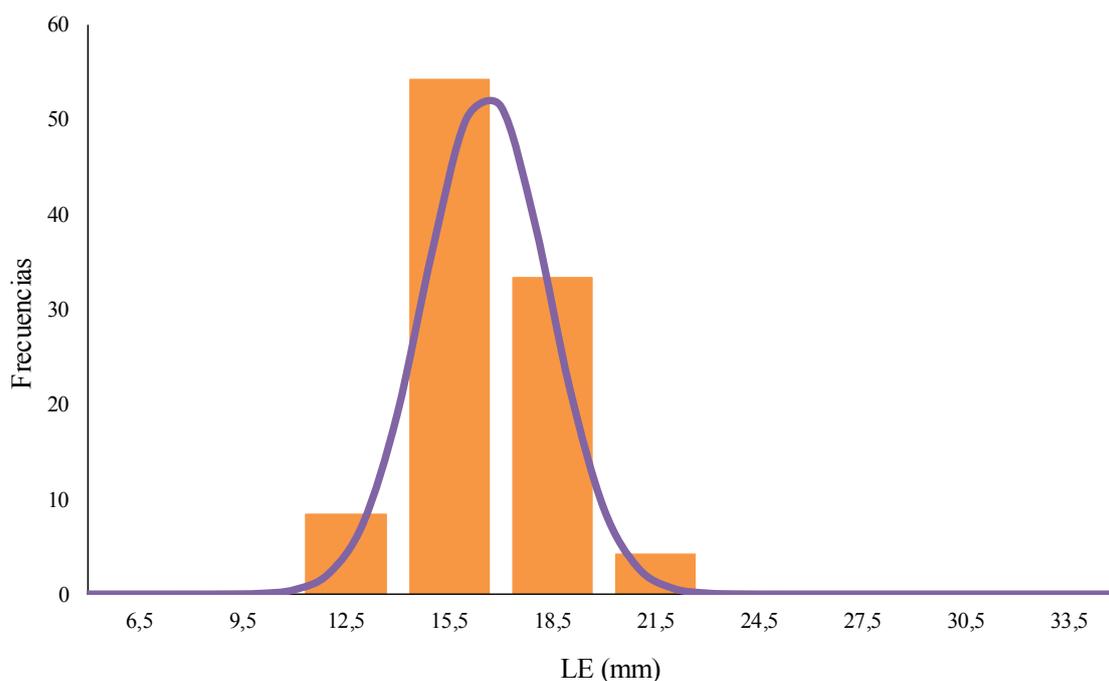


Figura 31. Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 3 ($n = 24$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Estadio 4 del gonopodio

Este último estadio definido, se caracterizó por presentar el gonopodio completamente maduro con las siguientes características: osificación completa de los radios, aparición de SGC en el extremo distal, engrosamiento del extremo del sexto radio, anquilosis en la base de los radios y pérdida de los últimos dos radios, el 9^{no} y 10^{mo} (Figura 32). Por lo tanto, se consideraron como machos adultos a los peces que presentaban estos caracteres sexuales externos. Se han registrado machos en Estadio 4 con valores de talla desde los 13,80 mm (55 días de edad) hasta los 23,52 mm (274 días de edad).

Los machos que se encuentran en este estadio, se caracterizan por presentar en promedio un gonopodio con 5 y 7 segmentos en los radios 1 y 2, respectivamente; 28 segmentos y un cirro en el extremo del radio 3; 27 y 39 segmentos con sierras en las secciones anterior y posterior del radio 4, respectivamente; 34 y 38 segmentos con un gancho en las secciones anterior y posterior del radio 5, respectivamente; 21 y 13 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 6, respectivamente; 12 y 11 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 7, respectivamente; y finalmente, 11 y 10 segmentos en las secciones anterior y posterior del radio 8, respectivamente.

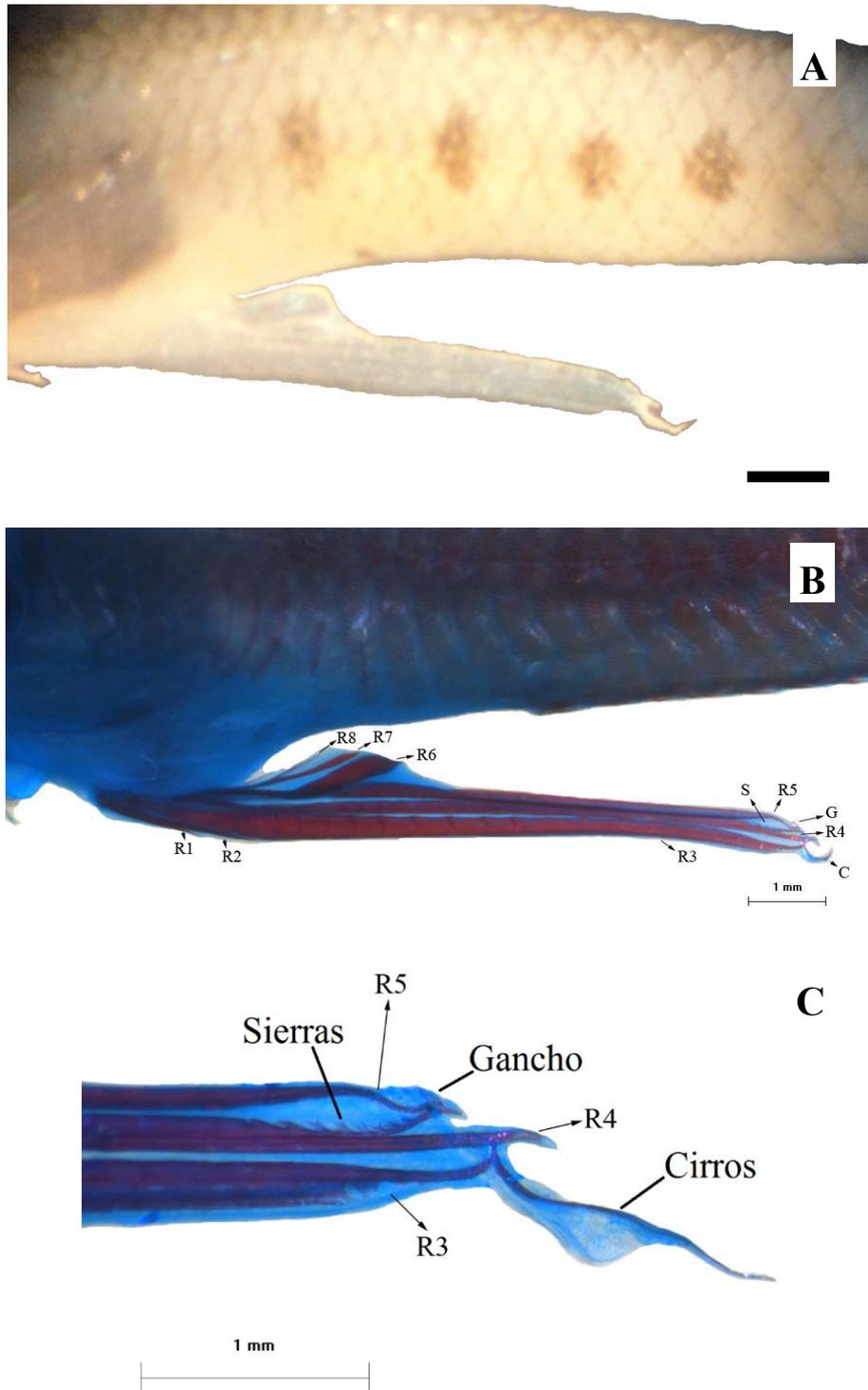


Figura 32. Machos representativos de Estadio 4. A: Fotografía de un macho con el gonopodio completamente maduro. B-C: Coloración *in toto* del gonopodio. Las estructuras cartilaginosas se encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal. Se muestra una vista completa (B) y el extremo distal (C) del gonopodio. S = sierras; G = gancho; C = cirros. Barra = 1 mm.

La distribución de frecuencias de tallas de los peces en Estadio 4, presentó una distribución normal con una leve asimetría negativa (Figura 33). En estos ejemplares, los valores promedio de IG se encuentran en $41,48 \pm 3,89\%$ ($n = 91$); IE en $2,25 \pm 0,17$ ($n = 67$); LE en $19,42 \pm 1,82$ mm ($n = 93$) y edad en $193,44 \pm 65,37$ días ($n = 25$).

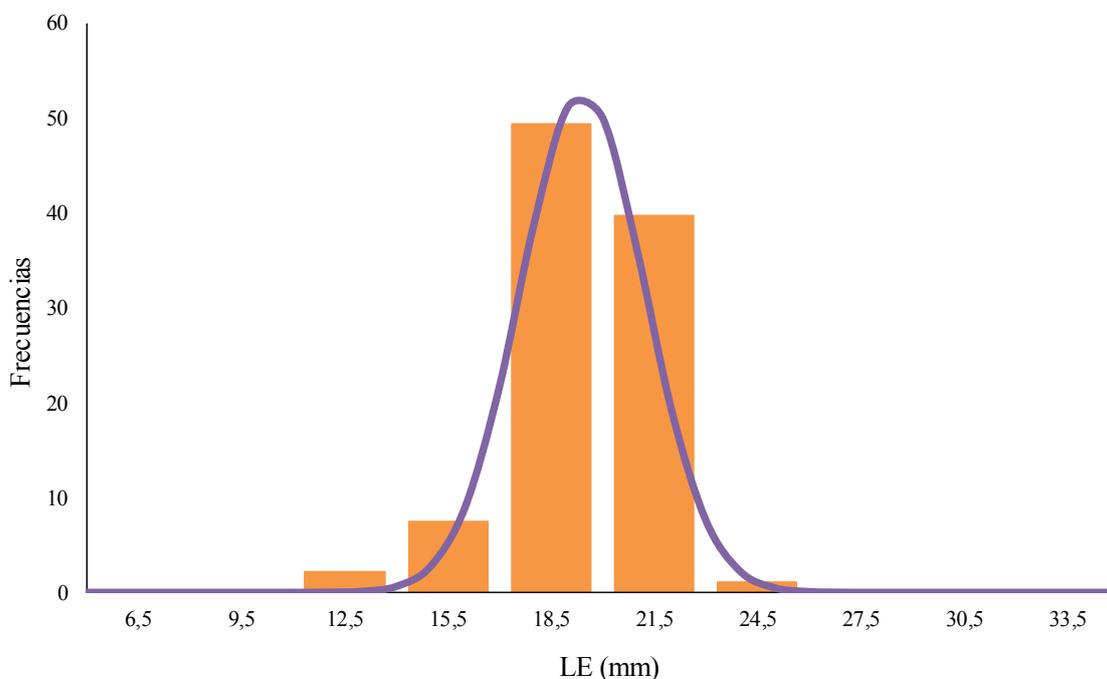


Figura 33. Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 4 ($n = 203$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en frecuencias observadas) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Finalmente, la distribución de frecuencias de las tallas de todos los machos fenotípicos, donde se tuvieron en cuenta los ejemplares de los Estadios 2, 3 y 4, se muestra de manera ilustrativa en la Figura 34. Estos datos se ajustaron a una distribución normal y se caracterizaron por presentar una leve asimetría y curtosis negativa. Estos ejemplares se caracterizaron por presentar, en su conjunto, valores promedio de LE de $16,95 \pm 3,21$ mm ($n = 203$), W de $61,78 \pm 33,26$ mg ($n = 119$), Factor K de $1,46 \pm 0,18$ mg mm⁻³ ($n = 119$) y edad de $126,49 \pm 68,52$ días ($n = 98$).

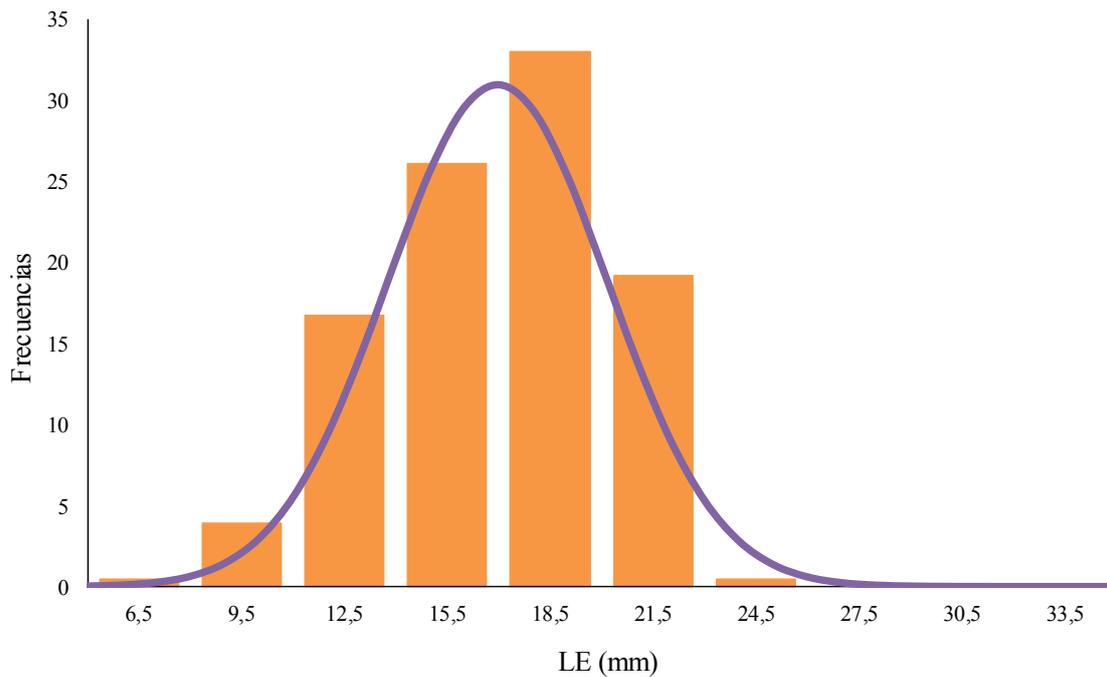


Figura 34. Distribución de frecuencias de las tallas de machos fenotípicos ($n = 203$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Aleta anal de hembra adulta

La aleta anal de la hembra adulta no presenta modificaciones morfológicas, respecto de los individuos sexualmente indiferenciados, excepto por el grado de osificación (Figura 35). Se han registrado hembras con valores de talla desde los 16,13 mm (70 días de edad) hasta los 32,66 mm (538 días de edad).

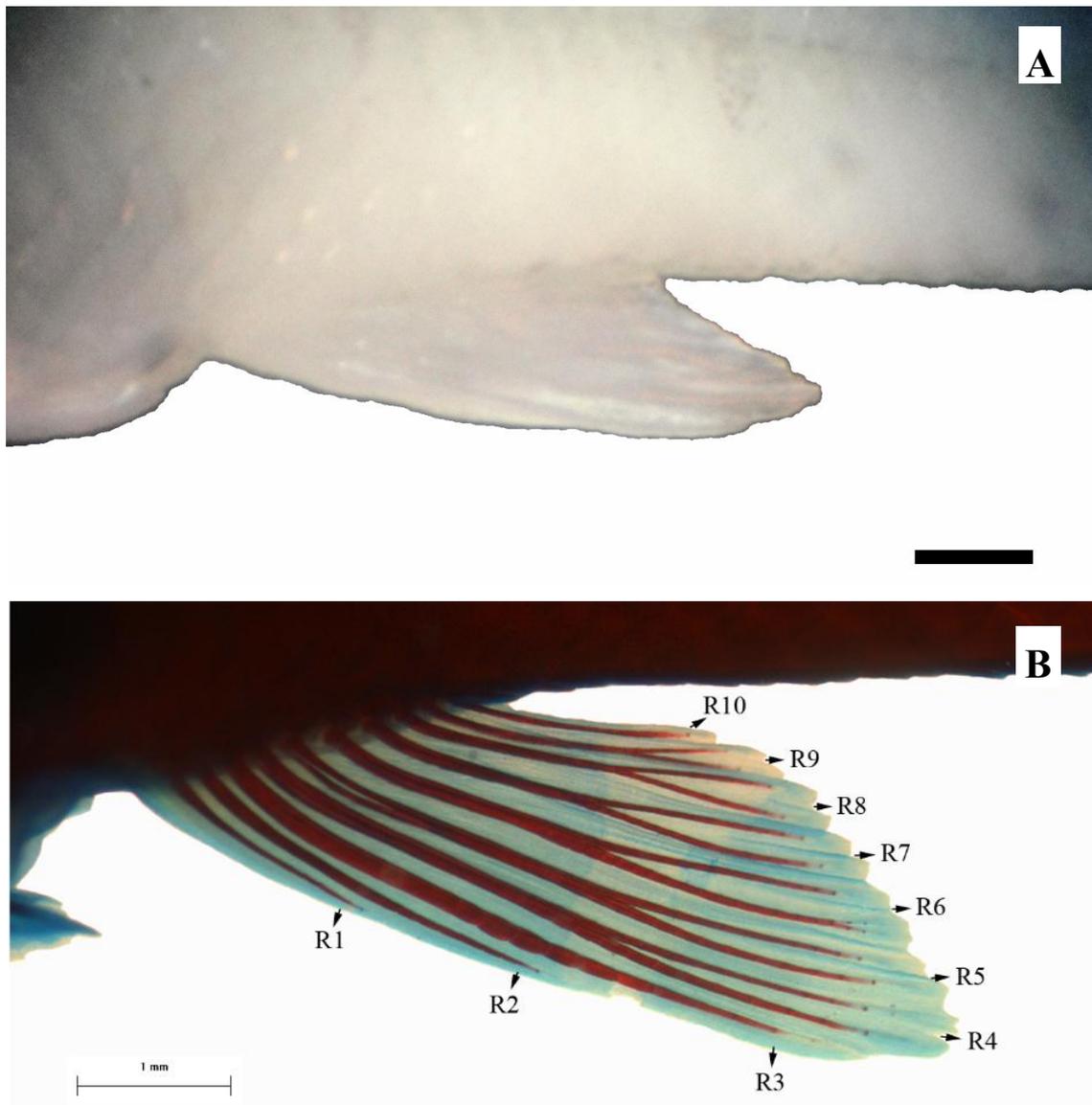


Figura 35. Aleta anal representativa de hembras adultas. A: Fotografía de la aleta anal de una hembra. B: Coloración *in toto* de una hembra. Las estructuras cartilaginosas se encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).

La distribución de frecuencias de tallas de las hembras fenotípicas se ajustó a una distribución normal y presentó una leve asimetría negativa (Figura 36). En estos ejemplares, los valores promedio de IG se encuentran en $18,22 \pm 2,49\%$ ($n = 79$); IE en $1,13 \pm 0,07$ ($n = 79$); LE en $24,10 \pm 3,25$ mm ($n = 82$) y edad en $227,40 \pm 147,44$ días ($n = 15$).

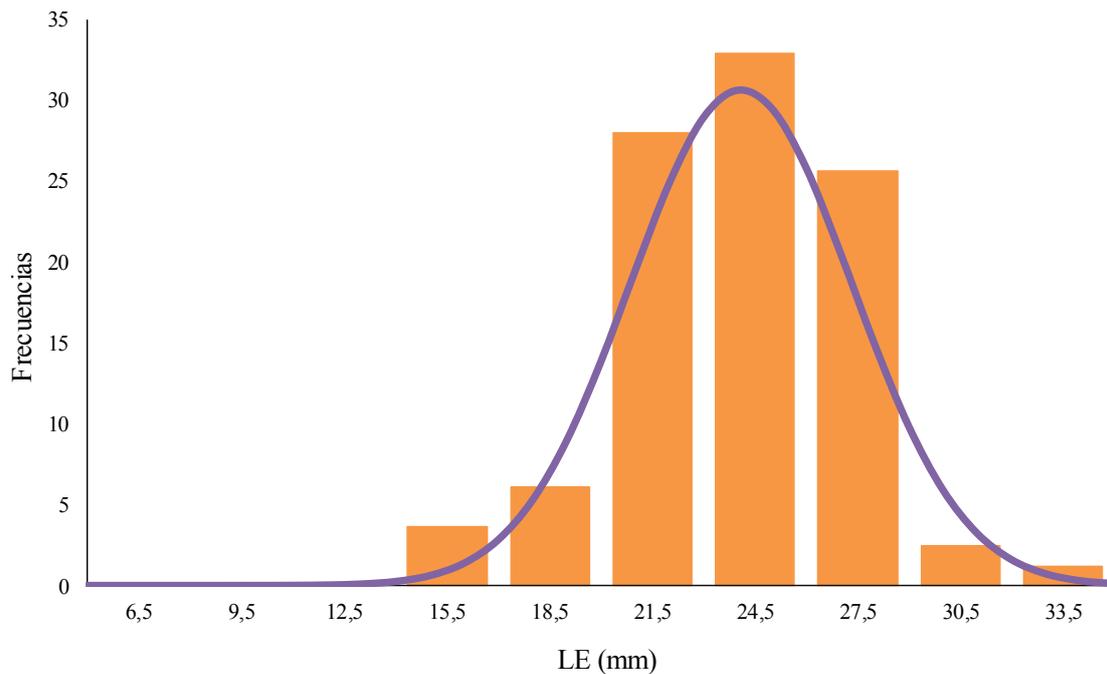


Figura 36. Distribución de frecuencias de las tallas de hembras fenotípicas ($n = 82$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.

Índice de Desarrollo del Gonopodio discriminado por estadio y sexo fenotípicos

Los estadios que describen el desarrollo del gonopodio se pueden observar a través de la variación en los valores del Índice de Desarrollo del Gonopodio (IDG) con respecto al largo estándar ($n = 390$, Figura 37A), a la edad ($n = 397$, Figura 37B) y al peso corporal ($n = 409$; Figura 37C). A su vez, se muestra cómo se distribuyen los valores de IDG calculados en hembras fenotípicas y se marcan las líneas de corte que indican la separación entre los distintos estadios de la morfogénesis del gonopodio en valores de IDG iguales a 0,19; 0,37 y 0,57.

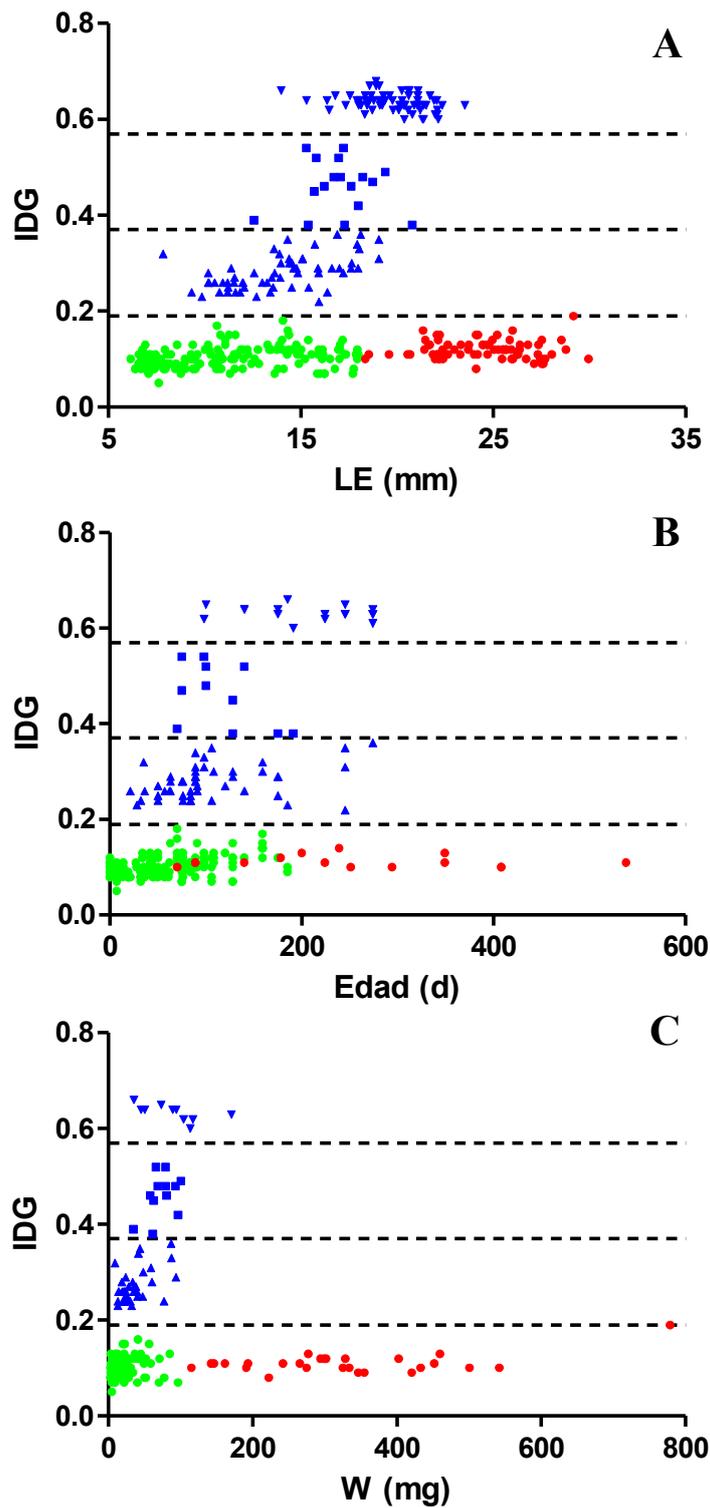


Figura 37. Diagramas de dispersión de Índice de Desarrollo del Gonopodio en función de la talla (A), la edad (B) y el peso corporal (C). Los distintos sexos fenotípicos y estadios de desarrollo del gonopodio se encuentran representados por: ● ejemplares sexualmente indiferenciados o Estadio 1 del macho, ▲ Estadio 2 del macho, ■ Estadio 3 del macho, ▼ Estadio 4 del macho y ● hembras. Las líneas de corte horizontales marcan la separación entre los distintos estadios en valores de IDG iguales a 0,19; 0,37 y 0,57.

La distribución de los valores de IDG en cada Estadio de la morfogénesis del gonopodio, contrastados con los de las hembras, se muestra en la Figura 38. Se comprobó la eficiencia del modelo debido a que la distribución del 100% de los valores de IDG se encontraban dentro de los límites establecidos para cada estadio. Los valores de IDG de los machos en los estadios 2, 3 y 4 se diferenciaron estadísticamente de las hembras ($n = 390$; $p < 0,01$).

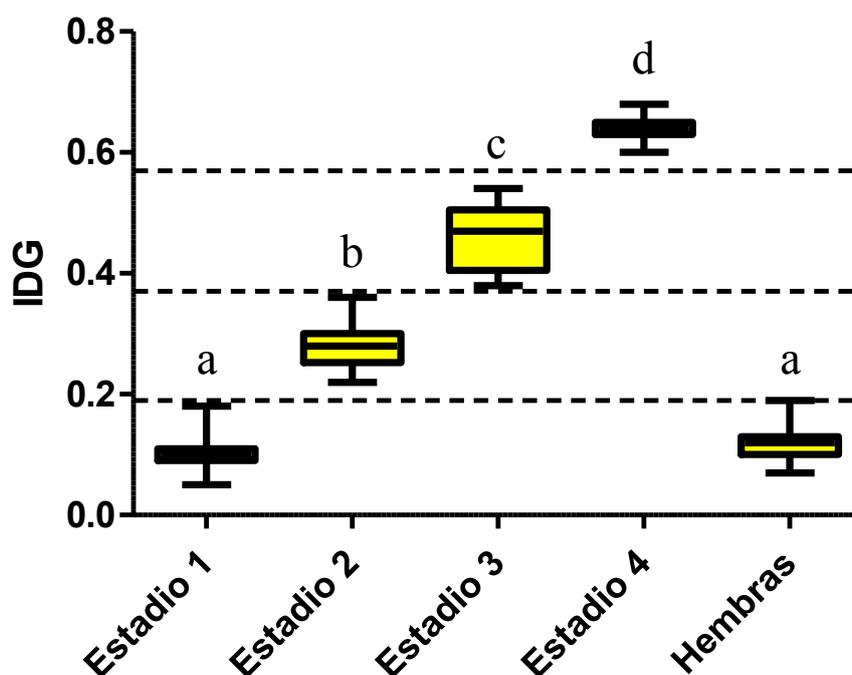


Figura 38. Diagrama de cajas (box plot) del Índice de Desarrollo del Gonopodio en función del Estadio y sexo fenotípico. Las cajas contienen la variabilidad del 50% de los valores centrales, la línea horizontal que se encuentra dentro de cada caja representa a la media y las barras indican los valores máximos y mínimos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Resumen de los parámetros morfológicos estudiados y análisis de correlación

Los principales descriptores estadísticos para cada sexo y, particularmente, en el caso de los machos, se discrimina por estadio de morfogénesis del gonopodio, se muestran en la Tabla 6.

Por otro lado, en las Tablas 7 y 8 se muestran sólo los parámetros morfológicos que presentaron correlaciones significativas en ejemplares machos y hembras, respectivamente. La edad y la talla correlacionaron positivamente en 0,70 ($p \leq 0,001$) y 0,75 ($p \leq 0,01$) para machos y hembras, respectivamente. Así como también, el peso

correlacionó con la talla y la longitud del radio 4 de la aleta anal en 0,97 y 0,83 para machos y 0,96 y 0,84 para hembras, respectivamente ($p \leq 0,001$). Finalmente, el IDG que sólo fue testeado en el caso de los machos, también correlacionó con la talla (0,75) y el peso (0,71), además del índice de elongación, índice gonopodial y la longitud del radio 4 de la aleta anal ($p \leq 0,001$).

Tabla 6. Estadística descriptiva de los parámetros morfológicos medidos e índices determinados para cada sexo fenotípico y estadio de morfogénesis del gonopodio, en el caso de los machos.

Sexo fenotípico	Descriptor	Edad (días)	LE (mm)	R4 (mm)	R6 (mm)	W (mg)	IG (%)	IE	K	IDG
Sexualmente indiferenciado o Estadio 1	<i>n</i>	169	175	167	167	138	167	167	138	167
	Media (\pm DS)	59,53 \pm 46,18	10,53 \pm 3,41	2,33 \pm 0,74	2,21 \pm 0,64	14,80 \pm 13,14	21,93 \pm 1,79	1,05 \pm 0,05	1,45 \pm 0,23	0,10 \pm 0,02
	Mediana	50	9,70	2,18	2,04	9,75	21,72	1,04	1,45	0,10
	Mínimo	0	6,16	1,31	1,32	2,70	16,59	0,91	0,96	0,05
	Máximo	216	17,99	4,21	3,74	59,00	27,55	1,24	2,07	0,18
Macho - Estadio 2	<i>n</i>	52	60	60	60	38	60	60,00	38,00	60
	Media (\pm DS)	104,67 \pm 58,15	13,89 \pm 2,69	3,40 \pm 0,90	2,68 \pm 0,50	35,09 \pm 21,58	24,26 \pm 2,93	1,26 \pm 0,13	1,53 \pm 0,18	0,28 \pm 0,04
	Mediana	89	13,92	3,30	2,69	26,95	23,59	1,24	1,52	0,28
	Mínimo	21	7,84	1,84	1,30	9,30	19,11	1,05	1,07	0,22
	Máximo	274	19,06	5,61	3,60	93,40	33,20	1,59	1,93	0,36
Macho - Estadio 3	<i>n</i>	14	24	24	17	19	24	17	19	17
	Media (\pm DS)	106,00 \pm 41,89	16,59 \pm 1,81	6,71 \pm 1,08	3,35 \pm 0,40	68,80 \pm 18,95	40,48 \pm 5,22	2,08 \pm 0,31	1,57 \pm 0,14	0,46 \pm 0,05
	Mediana	99	16,82	6,85	3,33	68,80	41,35	2,11	1,59	0,47
	Mínimo	45	12,58	4,70	2,62	34,80	29,97	1,64	1,32	0,38
	Máximo	274	20,79	8,45	4,10	100,60	51,77	2,59	1,87	0,54
Macho - Estadio 4	<i>n</i>	25	93	91	67	36	91	67	36	67
	Media (\pm DS)	193,44 \pm 65,37	19,42 \pm 1,82	8,03 \pm 0,88	3,68 \pm 0,49	91,82 \pm 30,20	41,48 \pm 3,89	2,25 \pm 0,17	1,39 \pm 0,16	0,64 \pm 0,02
	Mediana	206	19,29	8,04	3,65	89,50	41,10	2,25	1,36	0,64
	Mínimo	55	13,80	6,26	2,53	35,40	32,52	1,88	1,12	0,60
	Máximo	274	23,52	10,13	4,95	170,40	54,58	2,68	1,73	0,68
Hembra	<i>n</i>	15	82,00	79,00	79,00	35,00	79,00	79,00	35,00	79,00
	Media (\pm DS)	227,40 \pm 147,44	24,10 \pm 3,25	4,36 \pm 0,76	3,87 \pm 0,75	297,78 \pm 173,05	18,22 \pm 2,49	1,13 \pm 0,07	1,82 \pm 0,34	0,12 \pm 0,02
	Mediana	140	24,46	4,21	3,63	294,00	18,07	1,12	1,73	0,12
	Mínimo	70	16,13	2,90	2,69	70,60	13,18	1,00	1,26	0,07
	Máximo	538	32,66	6,04	5,64	779,10	23,52	1,35	3,14	0,19

LE: largo estándar; R4: radio 4 de la aleta anal; R6: radio 6 de la aleta anal; W: peso corporal; IG: índice gonopodial; IE: índice de elongación; K: índice de condición; IDG: índice de desarrollo del gonopodio.

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros morfológicos en machos ($n = 203$).

	LE	R4	R6	W	IG	IE	IDG
Edad	0,70**		0,71**				
LE		0,86**	0,87**	0,97**			0,75**
R4			0,91**	0,83**	0,85**	0,81**	0,85**
R6				0,92**	0,74**		
W						0,72**	0,71**
IG						0,84**	0,84**
IE							0,95**

Asteriscos indican correlaciones estadísticamente significativas: * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$.

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros morfológicos en hembras ($n = 82$)

	LE	R6	W	IG
Edad	0,75*		0,82**	
LE			0,96**	
R4		0,95**	0,84**	
R6			0,77**	0,71**

Asteriscos indican correlaciones estadísticamente significativas: * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$.

Discusión

Parámetros de condición general

En el presente capítulo, se ha descrito la evolución de parámetros biológicos generales como el crecimiento (talla y peso) e índice de condición para *Cnesterodon decemmaculatus*, en condiciones controladas. Si bien esta especie ha sido propuesta para la realización de ensayos normalizados de laboratorio (IRAM, 2008) y ha sido ampliamente utilizada en estudios ecotoxicológicos de campo y laboratorio (de la Torre *et al.*, 1997; García *et al.*, 1998), los valores normales de crecimiento en términos de talla, peso y edad, parámetros de condición general y morfogénesis de los caracteres sexuales secundarios en condiciones de laboratorio, aún no han sido descritos, pese a existir un

manual de procedimientos destinado a recomendaciones sobre la producción de esta especie en acuario (Somma *et al.*, 2011).

Se ha podido estimar la talla máxima esperada (36,11 mm) y la tasa de crecimiento en las condiciones de cría establecidas, utilizando el modelo de crecimiento de Von Bertalanffy. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en diversas poblaciones de peces y otros grupos zoológicos (Sparre y Venema, 1997). A su vez, la relación largo-peso indicó que el crecimiento ha sido alométrico, ya que el valor del coeficiente b fue mayor a 3 (Mancini y Grosman, 2008; Sokal y Rohlf, 2009).

El seguimiento temporal de la cría de *C. decemmaculatus* permitió demostrar que, bajo las condiciones de laboratorio utilizadas, el tiempo de diferenciación de los caracteres sexuales secundarios es extremadamente variable entre individuos, estableciéndose que el desarrollo está más vinculado a la talla que a la edad. Esto es similar a lo observado en otras especies como el pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, donde el proceso de diferenciación sexual también está íntimamente ligado al crecimiento de los organismos (Karube *et al.*, 2007; Chalde *et al.*, 2011). Este seguimiento temporal de las cohortes también permitió evidenciar un marcado dimorfismo sexual en el crecimiento (talla y peso) y el índice de condición, exigiendo un análisis independiente para machos y hembras. Como se observa en las Figuras 11 y 12, el crecimiento en talla y peso permitió establecer que las hembras presentaban valores significativamente mayores que los machos, y éstos que los individuos sexualmente indiferenciados (hembras > machos > indiferenciados). A su vez, las observaciones han sido consistentes con estudios previos que han mostrado que las hembras llegan a duplicar el tamaño de los machos (Siccardi, 1954). Las hembras presentaron un índice de condición (Factor K o índice de Fulton), significativamente mayor que los machos y los individuos sexualmente indiferenciados. La correlación entre el largo total y el largo estándar reportada por Young (2011) permitió seleccionar uno de ellos para ser utilizado como parámetro representativo de la talla. El largo estándar fue el parámetro seleccionado, ya que en estudios realizados en ambientes naturales se utiliza generalmente como descriptor de la misma (Mancini y Grosman, 2008). Esto se debe a que varias especies de peces tienen pérdidas parciales o totales de las aletas caudales por distintos motivos: peleas con otros peces para reproducirse o por territorialidad, mordeduras de depredadores, lastimaduras con redes durante las capturas, erosión, entre otros (Smith *et al.*, 2002). En este estudio se descartó la medición de la longitud de la cabeza, debido a que Young (2011) reportó que el índice cefálico no evidenció dimorfismo sexual entre los fenotipos macho y hembra.

En su conjunto, estos parámetros permiten establecer que los peces mantenidos en las presentes condiciones se encuentran en buen estado general y, por tanto, son aptos para su utilización experimental.

Morfología de la aleta anal y modelo para definir sus estadios

Como el gonopodio es una estructura que se genera a partir de una modificación de la aleta anal, se estudió la morfogénesis de esta para evaluar si puede ser utilizado como indicador de exposición a perturbadores endócrinos. Para el estudio de la morfogénesis de la aleta anal en machos y hembras de *C. decemmaculatus*, se tomó como base el desarrollo del gonopodio de *Gambusia affinis* documentado por Turner (1941a) debido a la estrecha relación filogenética entre estas especies. La información aportada por los caracteres sexuales externos como la longitud del 4^{to} radio, longitud del 6^{to} radio, engrosamiento del tercer radio y aparición de sierras, gancho y cirros en el extremo del gonopodio, han determinado los principales parámetros para llevar a cabo el objetivo del presente capítulo.

Los cambios morfológicos que sufre la aleta anal determinan el principal carácter sexual secundario que permite la diferenciación entre ambos sexos en esta especie. El registro sistemático de las variables morfológicas cuantitativas y cualitativas permitió describir la morfogénesis normal de la aleta anal. A su vez, se pudo diferenciar entre sexos utilizando parámetros como longitud del 4^{to} y del 6^{to} radio de la aleta anal, índice gonopodial e índice de elongación en función de la talla y la edad. Distintos autores han publicado que a pesar que el desarrollo tiene mayor correlación con el tamaño que con la edad (Fuiman *et al.*, 1998; Adriaens y Verraes, 2002; Sæle y Pittman, 2010), esta última se sigue utilizando como indicador de desarrollo (Chalde *et al.*, 2011). Es importante señalar que en *C. decemmaculatus*, la edad presentó mayor dispersión de los datos lo cual no permitió diferenciar claramente el momento de diferenciación entre machos y hembras.

La importancia del índice de elongación fue propuesta originalmente por Angus *et al.* (2001) en experimentos con *Gambusia affinis* y luego fue usado por Doyle y Lim (2002) en *G. holbrooki*. La correlación entre esta variable y el índice gonopodial, sumado a otros parámetros morfológicos cualitativos, permitieron diferenciar cuatro estadios en el desarrollo del gonopodio de *C. decemmaculatus*. El fenotipo macho puede ser identificado cuando un ejemplar presenta valores de IG > 21% y de IE > 1,25.

Sin embargo, en el estadio 1 no se puede diferenciar visualmente entre ambos sexos y la aleta anal se encuentra formada por 10 radios, como fuera publicado por Lucinda y Reis (2005). En el estadio 2, se generan las primeras manifestaciones morfológicas con el engrosamiento del tercer radio y la elongación de los radios tercero, cuarto y quinto. Esto se correspondería al engrosamiento del tercer radio en el desarrollo del gonopodio de *Gambusia affinis* (Turner, 1941a).

Durante el estadio 3, la longitud de los radios tercero, cuarto y quinto es similar al estadio 4, aunque falta que se produzcan una serie de cambios morfológicos del gonopodio: la anquilosis en la base de los radios, la osificación completa y la aparición de sierras, gancho y cirros en el extremo distal. Según Turner (1941a), cuando aparecen estos caracteres morfológicos finaliza la maduración sexual de los machos y se encuentran capacitados para copular. De esta forma, el estadio 4 de desarrollo gonopodial de *C. decemmaculatus* se definió por la presencia de esos caracteres morfológicos.

Los peces adultos son aquellos que tienen la capacidad de reproducirse y presentan los caracteres sexuales secundarios propios de la especie (Nikolsky, 1963). Basándose en el uso de la longitud del cuarto radio de la aleta anal, el índice gonopodial y el índice de elongación como principales parámetros cuantitativos, los primeros indicios de diferenciación de los caracteres sexuales secundarios permitieron evidenciar este dimorfismo a partir de los 12,6 y 18,0 mm de largo estándar para machos y hembras respectivamente, así como también a partir de los 32 y 85 mg de peso corporal para machos y hembras respectivamente. En este sentido, el fenotipo macho puede ser identificado inequívocamente antes que el fenotipo hembra porque se cuenta con una característica externa que es la aparición del primordio gonopodial. También se ha descrito el modelo de crecimiento del cuarto radio de la aleta anal en función del peso corporal para machos y hembras, como se puede observar en la Figura 15.

Finalmente, con los datos registrados se validó el índice de desarrollo del gonopodio (IDG) propuesto por Young (2011), como un modelo numérico que potencialmente permitiría independizarse de la edad de los machos. Los valores límites entre los estadios propuestos para los machos presentaron un 100% de efectividad. Este índice se calcula con los valores de tres parámetros cuantitativos (longitud del cuarto radio del gonopodio, longitud del sexto radio del gonopodio y largo estándar) y dos cualitativos (presencia o ausencia del primordio gonopodial y de sierras, gancho y cirros en el extremo distal de la aleta anal). Además, en este estudio se comprobó que los individuos sexualmente indiferenciados presentaron valores de IDG estadísticamente similares a las hembras

fenotípicas. Se considera que el mayor aporte de IDG puede quedar reflejado en estudios realizados en ambientes naturales debido a que se independiza de la edad.

En conclusión, se comprobó la hipótesis de que es posible identificar distintas etapas durante la morfogénesis del gonopodio de *C. decemmaculatus* y que el grado de desarrollo de este, está más relacionado con la talla que con la edad de los individuos.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO GONADAL

Introducción

Control neuroendócrino de la reproducción

El sistema endocrino de los vertebrados es un conjunto de glándulas cuyos productos de secreción afectan el crecimiento, el metabolismo y la reproducción. Este sistema controla diversos procesos fisiológicos, así como también influye en el desarrollo del sistema nervioso y los órganos reproductores. El funcionamiento del sistema reproductor se encuentra bajo control endócrino del hipotálamo y la hipófisis. El hipotálamo secreta hormonas liberadoras o inhibidoras, que son transportados hacia la hipófisis. En tetrápodos, las hormonas hipotalámicas llegan a la hipófisis anterior a través del sistema porta-hipofisario (Neill, 2006) mientras que los peces teleósteos tienen una conexión directa y no poseen un sistema portal hipotálamo-hipofisario. Las neurohormonas que controlan la actividad de los diferentes tipos de células son liberadas directamente por terminales nerviosas localizadas en proximidades de sus células blanco. La innervación de la hipófisis en teleósteos debe ser considerada como el equivalente funcional de la innervación de la eminencia media en vertebrados terrestres (Zohar *et al.*, 2010).

De cualquier manera, el sistema hipotálamo-hipófiso-gonadal de peces funciona en forma análoga al de vertebrados tetrápodos. La hormona liberadora de gonadotrofinas GnRH (del inglés, *Gonadotropin-Releasing Hormone*), es un decapeptido secretado por las neuronas del área preóptica y el hipotálamo y cuya función es regular la síntesis y secreción de las gonadotrofinas en la adenohipófisis: FSH (del inglés, *Follicle Stimulating Hormone*: hormona folículo estimulante) y LH (del inglés, *Luteinizing Hormone*: hormona luteinizante). Diversos estudios se han centrado en la identificación y la localización de neuronas que expresan GnRH en el cerebro de los peces usando distintas técnicas, tales como inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y secuenciación (Guilgur *et al.*, 2006; Kah *et al.*, 2007; Abraham *et al.*, 2008; Okubo y Nagahama, 2008). Aunque la organización neuroanatómica del sistema GnRHérgico en peces se produce tempranamente en el desarrollo (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2002; Gonzalez-Martinez *et al.*, 2004), sus patrones de síntesis y secreción varían a lo largo del ciclo de vida. Por otro lado, en algunos teleósteos, se demostró que la dopamina, un neurotransmisor sintetizado a partir de tirosina, es un inhibidor tónico de la liberación de las gonadotrofinas (Cerdá-Reverter y Canosa, 2009; Zohar *et al.*, 2010). En 2003, se descubrió que el sistema kisspeptidérgico actúa sobre la regulación de la reproducción y la pubertad en mamíferos, vía GnRH (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). También está implicado en

diversas funciones biológicas, tales como nutrición, metabolismo y respuesta al fotoperiodo (Revel *et al.*, 2006; Roa y Tena-Sempere, 2007). Hoy se cree que este sistema es el regulador de las señales ambientales y metabólicas hacia el eje HHG en mamíferos (Tena-Sempere, 2006). Al igual que en mamíferos, en peces se han identificado dos poblaciones de células que expresan *kiss1* y responden de manera diferencial a esteroides sexuales (Kanda *et al.*, 2008; Kitahashi *et al.*, 2009). Sin embargo, a diferencia de lo documentado para mamíferos, los peces tienen dos genes Kiss (*kiss1* y *kiss2*) debido a duplicaciones del genoma (Mechaly *et al.*, 2013; Ohga *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de que los niveles de kisspeptina 1 y 2 varían durante el ciclo sexual (Tovar Bohórquez *et al.*, 2017), la relación entre kisspeptina y reproducción en peces no parece ser tan directa como en tetrápodos (Tang *et al.*, 2015; Nakajo *et al.*, 2018).

El control del eje hipófiso-gonadal está mediado por la producción y liberación de las gonadotrofinas, hormonas proteicas, que circulan por el torrente sanguíneo e interactúan con los receptores en los tejidos blanco, principalmente en las gónadas (ovario y testículo) (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1991; Van Der Kraak *et al.*, 1992; Devlin y Nagahama, 2002). Su principal función es estimular a las gónadas a producir el desarrollo y la maduración de las células germinales y la secreción de hormonas sexuales. Como se mencionó anteriormente, los principales estrógenos en los vertebrados son E₁, E₂ y E₃, mientras que los principales andrógenos activos en la mayoría de los vertebrados son testosterona y DHT. Los peces se diferencian de la mayoría de los vertebrados debido a que el principal andrógeno activo en los machos es la 11-cetotestosterona (11-KT).

En mamíferos, LH se une a su receptor hormonal en las células de Leydig, donde regulan la producción de esteroides sexuales. Mientras que FSH se une a su receptor en las células de Sertoli, donde regula el funcionamiento del soporte estructural, nutricional y regulatorio que las células de Sertoli les proveen a las células germinales (Huhtaniemi y Themmen, 2005). En cambio, en peces, los receptores de FSH son menos selectivos y se unen tanto a FSH como a LH (Schulz y Nóbrega, 2011). Estas características sugieren que la actividad biológica de las gonadotrofinas en peces está menos claramente separada, en comparación con las de los vertebrados tetrápodos (Schulz *et al.*, 2010). Durante el proceso de maduración sexual, se produce FSH que promueve la síntesis de esteroides, el crecimiento y la diferenciación gonadal durante gran parte del ciclo de vida de los peces (Miura *et al.*, 1991; Van Winkoop *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 2007). Este proceso se ha descrito en distintas especies, sin embargo, uno de los ejemplos más conocidos es el desarrollo de los testículos de la anguila (Miura *et al.*, 1996). En este caso, la interacción

de FSH con los receptores en las células de Leydig suprime la producción de proteínas (ZP2 y ZP3), que pueden inhibir la espermatogénesis (Miura *et al.*, 1998) e inducir la actividad de las enzimas 11 β -hidroxilasa y 11 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa. Como consecuentemente se produce 11KT, ésta induce la proliferación espermática premeiótica por acción de activina en las células de Sertoli (Nagahama *et al.*, 1997). Como se muestra en la Figura 39, el eje HHG se caracteriza por presentar una comunicación entre el cerebro y la gónada, lo cual garantiza los niveles adecuados de gonadotrofinas y esteroides sexuales circulantes. Este proceso de control neuroendócrino se regula por retroalimentación negativa. Durante el desarrollo, las hormonas afectan el proceso de diferenciación sexual, induciendo la manifestación de los caracteres sexuales secundarios. Éstos expresan las diferencias anatómicas, fisiológicas y comportamentales entre sexos.

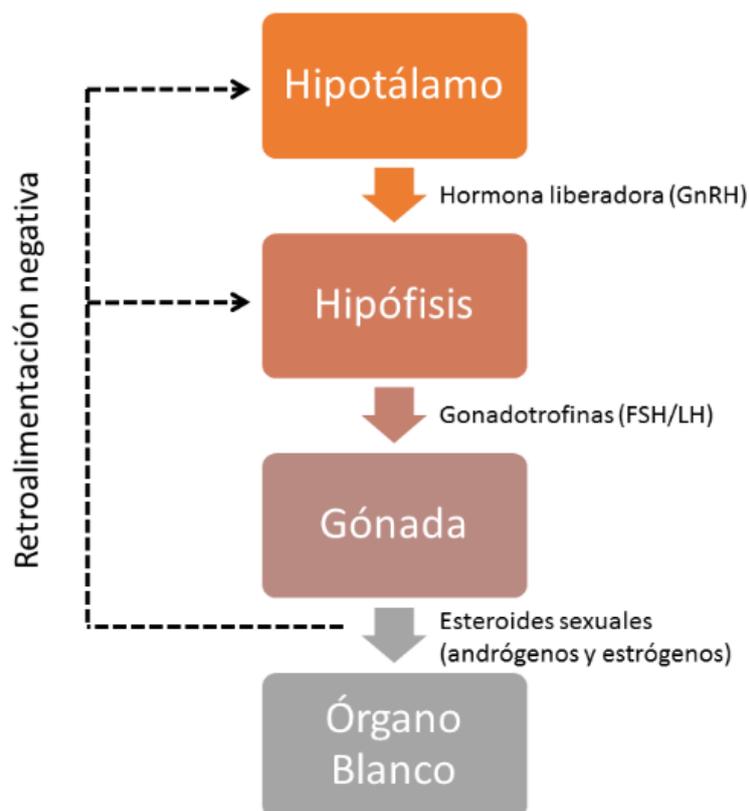


Figura 39. Esquema del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG).

Determinación y diferenciación sexual

La distinción entre la determinación del sexo y la diferenciación sexual es a menudo difícil, ya que regularmente utilizamos los criterios de diferenciación sexual (morfológica, celular y molecular) para inferir si el sexo ha sido determinado en una

dirección particular: macho o hembra. La determinación del sexo es un evento vinculado a los procesos genéticos y ambientales y a las variables que influyen en la diferenciación sexual, mientras que la diferenciación sexual es la manifestación física de estos eventos en términos de desarrollo testicular u ovárico (Devlin y Nagahama, 2002).

Los mecanismos que controlan la determinación del sexo difieren entre los grupos de vertebrados y han aparecido en distintos momentos durante el proceso evolutivo de los mismos. En los mamíferos y las aves, se encuentran bajo control genético, mientras que en algunos reptiles y peces están también controlado por factores ambientales. Se han identificado varios genes que determinan el sexo en vertebrados, *SRY* en mamíferos (Sinclair *et al.*, 1990) excepto monotremas (Wallis *et al.*, 2007; Deakin, 2017), *dmy* en el pez medaka *Oryzias latipes* (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002), *sdY* en trucha arco iris (Yano *et al.*, 2012), *amhY* en pejerrey patagónico y bonaerense (Hattori *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2014), *DM-W* en *Xenopus laevis* (Yoshimoto *et al.*, 2008) y *DMRT1* en gallinas (Smith *et al.*, 2009). En general, se acepta que el gen que determina el sexo está localizado en sólo uno de los cromosomas sexuales y el sexo heterogamético puede ser el masculino o el femenino, dependiendo de la especie (Pennell *et al.*, 2018). En mamíferos, el macho es heterogamético y el gen *SRY*, que determina el desarrollo del testículo, se encuentra en una región del cromosoma Y.

Mientras que en mamíferos la determinación genética del sexo no puede ser luego alterada por influencias ambientales, en peces, anfibios y reptiles se ha demostrado que el ambiente puede afectar el destino ulterior de la gónada (Yamamoto *et al.*, 2014). En estos organismos, el sexo fenotípico puede depender del control genético, pero en algunos casos, también depende de factores ambientales como la temperatura. Más aún, en peces teleósteos y reptiles, por ejemplo, la exposición de huevos y/o embriones a estrógenos o andrógenos exógenos durante un período crítico del desarrollo puede también alterar la manifestación gonadal fenotípica y de esa forma, afectar la proporción de sexos de la descendencia (Strüssmann *et al.*, 1996; Roush y Rhen, 2018).

En algunas especies de peces, la proporción de sexos está marcadamente influenciada por la temperatura. Este es el caso del pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, una especie que presenta una fuerte determinación del sexo por temperatura, donde se pueden obtener poblaciones de 100% hembras o machos simplemente controlando la temperatura del agua (Strüssmann *et al.*, 1996; Strüssmann y Nakamura, 2002; Ito *et al.*, 2005; Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008) aunque hoy se sabe que existe una interacción importante entre el control genético y la temperatura (Yamamoto *et al.*, 2014).

Los poecílidos son una de las familias de peces más estudiadas con respecto a la determinación genética del sexo y la selección sexual, ilustrando perfectamente la diversidad de mecanismos observados en los teleósteos (Böhne *et al.*, 2009). En esta familia se han descrito distintos tipos de sistemas genéticos de determinación del sexo, incluyendo tanto heterogamia masculina como femenina (Kallman, 1984; Volff y Schartl, 2001, 2002; Schultheis *et al.*, 2009). La heterogamia masculina (machos XY y hembras XX) se ha documentado en muchas especies de poecílidos, como por ejemplo en *Poecilia reticulata*, *P. velífera*, *P. latipinna*, *Limia perugiae*, *Gambusia holbrooki* y en distintas especies del género *Xiphophorus*, tales como *X. nezahualcoyotl*, *X. milleri*, *X. variatus*, *X. xiphidium*, *X. nigrensis* y *X. cortezi* (Schultheis *et al.*, 2009). Por otro lado, la heterogamia femenina (hembras ZW y machos ZZ), ha sido publicada en *G. affinis*, *X. alvarezii* y *X. hellerii* (Schultheis *et al.*, 2009). Ambos sistemas pueden estar influenciados por modificadores autosómicos, los cuales conducen a una determinación atípica del sexo como, por ejemplo, machos XX o hembras XY. Tales influencias autosómicas se han observado en *P. reticulata* y varias especies de *Xiphophorus*, incluyendo *X. hellerii*, *X. nigrensis*, *X. cortezi*, *X. nezahualcoyotl* y *X. milleri* (Böhne *et al.*, 2009). Es importante destacar que especies filogenéticamente relacionadas, o incluso en diferentes poblaciones dentro de una misma especie, pueden observarse diferentes sistemas de determinación sexual. Por lo tanto, la dinámica evolutiva de la determinación del sexo en poecílidos, refleja la diversidad del control genético sobre el desarrollo sexual observada en los peces teleósteos (Schultheis *et al.*, 2009). Finalmente, la unisexualidad es el modo de reproducción en híbridos interespecíficos naturales de varias especies de *Poeciliopsis* y del molly *P. formosa* de la Amazonía. Los híbridos de *Poeciliopsis* se reproducen a través de la hibridogénesis, donde todo el genoma paterno queda excluido de los gametos durante la meiosis de la hembra, generando así líneas femeninas hemiclonaes (Vrijenhoek *et al.*, 1977). *P. formosa* es una especie ginogénica con reproducción clonal proveniente de un evento de hibridación entre dos especies de *Poecilia* (Lampert y Schartl, 2008). Aunque se sabe que esta especie requiere del esperma de machos mollys (por ejemplo, *Poecilia mexicana*) para estimular la embriogénesis, éstos no contribuyen con genes (Schlupp y Plath, 2005).

En contraste con los factores que intervienen en la determinación del sexo, los mecanismos que operan durante la diferenciación sexual gonadal parecen estar relativamente conservados en los vertebrados (Ijiri *et al.*, 2008). El desarrollo gonadal depende de la comunicación endocrina entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada (eje

HHG), permitiendo que las señales físicas, químicas, sociales y estacionales se integren con la maduración de las gónadas (Bieniarz y Epler, 1992; Yaron, 1995; Trudeau, 1997; Zohar *et al.*, 2010). Por ejemplo, la expresión de *Sox9* está relacionada con la diferenciación testicular en mamíferos (Kanai *et al.*, 2005), peces (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005) y aves (Vaillant *et al.*, 2001; Takada *et al.*, 2006). *Dmrt1* y *amh* están implicados en la diferenciación testicular en varios grupos de vertebrados, incluyendo a los peces (Behringer *et al.*, 1994; Smith y Sinclair, 2004; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Bratus y Slota, 2006; Shoemaker *et al.*, 2007; Fernandino *et al.*, 2008a; Fernandino *et al.*, 2008b). En el caso de la diferenciación sexual ovárica, se expresa *cyp19a1* (aromatasa) en reptiles (Matsumoto *et al.*, 2013), peces (Vizziano *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007; Fernandino *et al.*, 2008b; Guiguen *et al.*, 2010) y aves (Smith *et al.*, 1997). La función de los estrógenos también se encuentra conservada en vertebrados no mamíferos, incluyendo peces (Devlin y Nagahama, 2002), anfibios (Hayes, 1998; Miyata y Kubo, 2000), reptiles (Pieau y Dorizzi, 2004) y aves (Smith y Sinclair, 2004).

En muchos animales, los factores hormonales y/o ambientales pueden desempeñar un rol fundamental durante la diferenciación sexual gonadal. Los peces, anfibios y aves difieren de los mamíferos en que el fenotipo femenino se desarrolla bajo el control de estrógenos, mientras que el fenotipo masculino aparece en ausencia de estos. En estos organismos, la diferenciación sexual es lábil y puede estar influenciada por esteroides y enzimas que controlan su síntesis (Tyler *et al.*, 1998).

El rol de los estrógenos y los andrógenos durante la gonadogénesis

La evidencia que respalda el papel crucial de los estrógenos y los andrógenos en el desarrollo sexual de los vertebrados se basa en datos farmacológicos, fisiológicos y genéticos. Como se mencionó anteriormente, estas hormonas esteroideas desempeñan funciones en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos que incluyen el crecimiento celular, la diferenciación sexual, el desarrollo gonadal, la reproducción y el comportamiento. Los estrógenos son secretados principalmente por las células foliculares que rodean a los oocitos en el ovario, mientras que los andrógenos son secretados principalmente por las células de Leydig en los testículos. Las hormonas esteroideas, de naturaleza lipofílica, ejercen sus acciones tanto a través de receptores nucleares (Yasar *et al.*, 2017) o a través de receptores de membrana (Levin, 2018). En general, los estrógenos están vinculados al control de los ciclos ováricos, mientras que

los andrógenos a la producción de esperma. Se sabe que los antagonistas de andrógenos (Silversides *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2002; Kunath *et al.*, 2014) y de estrógenos (Croxtall y McKeage, 2011; Vardanyan y Hruby, 2016), las mutaciones o los inhibidores de las enzimas esteroidogénicas (Clark *et al.*, 1990; Wilson, 1999; Vaughan, 2003; Balunas *et al.*, 2008), o las mutaciones en los receptores de andrógenos (Ra) o de estrógenos (Re) (Mueller y Korach, 2001; Yeh *et al.*, 2002; Hill y Boon, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013), dan como resultado anomalías en la función gonadal, la diferenciación y el desarrollo sexual de los vertebrados.

Desarrollo gonadal

El desarrollo de las gónadas ha sido ampliamente estudiado en los vertebrados y, en particular, en los peces. El origen, migración o desarrollo de las distintas estructuras gonadales, han sido descritas en diversas especies de teleósteos: *Poecilia sphenops* (Defelice y Rasch, 1969), *Cyprinus carpio* (Parmentier y Timmermans, 1985; Shelton *et al.*, 1995), *Oryzias dancena* (Park *et al.*, 2016), *Oryzias latipes* (Satoh y Egami, 1972; Kurokawa *et al.*, 2007), *Perca fluviatilis* (Treasurer y Holliday, 1981; Kopiejewska y Szczerbowski, 2005; Krol *et al.*, 2006), *Salvelinus leucomaenis* (Nakamura, 1982), *Platypoecilius maculatus* (Wolf, 1931), *Oncorhynchus mykiss* (van den Hurk y Slof, 1981), *Oncorhynchus kisutch* (Foyle, 1993), *Cichlasoma dimerus* (Meijide *et al.*, 2005), *Micropterus salmoides* (Johnston, 1951), *Danio rerio* (Maack y Segner, 2003), *Neogobius melanostomus* (Tomczak y Sapota, 2006), *Barbus conchoniensis* (Timmermans y Taverne, 1989), *Acipenser sturio* (Williot, 2011), *Corregonus laveratus* (Bittner *et al.*, 2009), *Esox masquinongy* (Lin *et al.*, 1997), *Salaria pavo* (Patzner y Kaurin, 1997), *Odontesthes bonariensis* (Ito *et al.*, 2005; Strussmann y Ito, 2005), *Jenynsia maculata*, *J. multidentata* y *J. alternimaculata* (Martinez *et al.*, 2015), *Zoarcetes viviparus* (Rasmussen *et al.*, 2006), *Liza abu* (Chelemal *et al.*, 2009), *Chapalichthys encaustus* (Guerrero-Estevez y Moreno-Mendoza, 2012), *Scophthalmus maximus* (Zhao *et al.*, 2016) y *Rhodeus uyekii* (Goo *et al.*, 2016), entre otras. También se han utilizado marcadores moleculares del primordio gonadal mediante técnicas inmunohistoquímicas. Un ejemplo de ello, es el uso de la marcación de Vasa, proteína necesaria para la diferenciación de las células germinales primordiales en varias especies de peces teleósteos (Kobayashi *et al.*, 2002), así como también las proteínas Nanos y Tudor (Aoki *et al.*, 2008; Nishimura y Tanaka, 2014). Las células somáticas de la gónada tienen un origen embrionario distinto

de las células del primordio germinal. La capa somática externa de la gónada en desarrollo se deriva del epitelio de la cresta genital, pero se cree que algunas células somáticas probablemente también derivan de la invasión del mesénquima (Guraya, 1994; Nakamura *et al.*, 2006; Nishimura y Tanaka, 2014). Antes de la diferenciación sexual, todas las células somáticas parecen derivar de una capa epitelial de la corteza, y son similares en machos y hembras. Después de la migración de las células del primordio germinal a la cresta germinal, se produce la división celular para formar oogonias o espermatogonias, y la diferenciación y migración de las células somáticas se inicia de forma concomitante con este proceso (Devlin y Nagahama, 2002). Por ejemplo, la evidencia presentada en la anguila japonesa, indica que la proximidad física entre las células germinales y somáticas es necesaria para el desarrollo funcional de las gónadas (Miura *et al.*, 1996; Nishimura y Tanaka, 2014, 2016). Por otro lado, en algunos peces, el desarrollo del ovario ocurre antes que el del testículo. Se detecta primero por la proliferación de células somáticas y oogonias, y luego, por la diferenciación temprana de los oocitos, que es seguida por la formación de la cavidad ovárica. En algunas especies, el desarrollo del testículo ocurre algunas semanas o meses después del inicio del desarrollo del ovario (Nakamura *et al.*, 1998).

La asignación de estadios gonadales mediante categorías ha sido ampliamente utilizada en peces, tanto para describir el desarrollo como la maduración de la gónada. Mackie y Lewis (2001) afirmaron que el examen microscópico de las secciones histológicas es el medio más exacto y detallado para la asignación de estadios gonadales. Para llevar a cabo estos estudios de biología reproductiva, se necesita conocer el proceso de oogénesis (Tyler y Sumpter, 1996; Lubzens *et al.*, 2010) y espermatogénesis (Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2010; Uribe *et al.*, 2014). Por lo tanto, del mismo modo que en adultos, resulta útil contar con un sistema de estadios histológicos que permita la identificación de categorías que describan el desarrollo del ovario y el testículo durante el desarrollo (Strüssmann y Nakamura, 2002). El conocimiento de la formación de las distintas estructuras histológicas permite obtener información detallada del modo en que se desarrollan las gónadas, así como del momento del ciclo de vida en el cual la especie alcanza la madurez sexual. También, conocer la relación entre el desarrollo gonadal con el momento en que se manifiestan los caracteres sexuales secundarios, nos permite entender cómo ocurre el desarrollo sexual de la especie. En poecílidos, se han publicado descripciones de los estadios del desarrollo gonadal (Van den Hurk, 1974; Van den Hurk

et al., 1974), de los estadios de la morfogénesis de la aleta anal (Kramer y Kallman, 1985) y de la relación entre estos parámetros (Schreibman *et al.*, 1982).

En el caso particular de *C. decemmaculatus*, así como el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en ambos sexos aún no ha sido descrita, tampoco el desarrollo de las gónadas. Hasta el momento, sólo se cuenta con aspectos generales de la biología reproductiva documentadas por Siccardi (1954) y una descripción de la morfología gonadal de machos adultos (Sotelo y Trujillo-Cenóz, 1958; Parenti *et al.*, 2010).

Hipótesis

Es posible identificar distintas etapas durante el desarrollo de los ovarios y los testículos, las cuales ocurren antes que se manifiesten los caracteres sexuales secundarios.

Objetivos

- Caracterizar y describir el desarrollo normal de la histología gonadal de *C. decemmaculatus* desde el nacimiento hasta la adultez.
- Identificar una serie de estadios que permitan caracterizar eventos claves del desarrollo del ovario y del testículo.
- Establecer una relación entre los estadios de desarrollo gonadal y de la aleta anal.

Materiales y métodos

Organismos

Los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* se obtuvieron del acuario establecido en el Sector de Ecotoxicología del Laboratorio de Transformación de Residuos (IMYZA-INTA), de acuerdo a lo descrito en el capítulo previo.

Reactivos

Se utilizó benzocaína (Sigma-Aldrich), Paraplast® (Leica), xileno, eosina, hematoxilina, ácido pícrico, etanol absoluto, bálsamo de Canadá y parafina (Biopack).

Diseño experimental

La estrategia consistió en analizar la histología gonadal semanalmente en cohortes de individuos desde el nacimiento y hasta la adultez. Para ello, se aislaron grupos de machos y hembras adultas en peceras de 40 L, con el fin de utilizarlos como reproductores. Las condiciones experimentales se mantuvieron a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16L:8O. Antes de la alimentación diaria, se revisaron las peceras de reproductores y en los casos de registrarse una cohorte recién nacida, ésta fue colectada con red y aislada en peceras de vidrio de 5 L. Se tuvo en cuenta que la densidad de peces no supere los 4 individuos por cada litro de agua, menos de lo sugerido por organismos internacionales (USEPA, 1996). Cada pecera fue rotulada con la cantidad de ejemplares que componían la cohorte y la fecha de nacimiento. Periódicamente, se registró el número de individuos vivos y la edad. En la dieta diaria, se incorporó una mezcla de alimento balanceado Shulet® formulado en escamas y flotante con alimento vivo, compuesto por neonatos del cladóceros *Daphnia magna*, cultivada también en las mismas condiciones controladas de laboratorio. Se utilizó agua de perforación clorada, la cual debió ser declorada y aireada durante más de 48 horas, antes de ser utilizada en el acuario. Periódicamente se midió el pH, la conductividad eléctrica y el cloro libre en el agua.

Se contempló un diseño experimental aleatorizado sin reposición. Para ello, se tomaron 10 ejemplares por cada edad y se tuvieron en cuenta intervalos de frecuencia de muestreo cada 7 días de edad, en el rango de 0 a 140 días post-nacimiento. En el momento de la toma de la muestra, cada individuo fue anestesiado con benzocaína durante 3 minutos. Una vez anestesiados, se registraron los distintos parámetros morfológicos externos. Se midió la talla (LE) y las longitudes del cuarto y sexto radio de la aleta anal (R4 y R6, respectivamente) y se registró el peso corporal (W). Posteriormente, se realizó la eutanasia por decapitación y luego se procedió a la toma de muestras de tejidos para análisis histológicos. Para ello, se disecó de la cavidad general del cuerpo, descartando la cabeza y la cola.

Todos los procedimientos se realizaron bajo el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA. Los residuos químicos y biológicos se descartaron como residuos especiales y patogénicos respectivamente, los cuales fueron colectados por una empresa encargada de su tratamiento.

Parámetros de condición general y de la morfología de la aleta anal

Se midieron el largo estándar y las longitudes de los radios 4 y 6 de la aleta anal (R4 y R6 respectivamente) y se registraron la edad, el peso y la presencia o ausencia del primordio gonopodial y de sierras, ganchos y cirros en el extremo distal del gonopodio (Turner, 1941a; Ghedotti, 2000; Doyle y Lim, 2002). A su vez, se determinó visualmente el sexo fenotípico y se asignó el estadio de morfogénesis de la aleta anal en cada pez, según los criterios establecidos en el Capítulo N°1. A partir de los diferentes parámetros medidos y registrados, se calcularon los índices gonopodial (IG), de elongación (IE), de condición corporal (factor *K*) y el índice de desarrollo del gonopodio (IDG) (Young, 2011). Con estos datos, se determinó la relación entre el estadio gonadal y los distintos parámetros morfológicos.

Histología gonadal

Las muestras de tejidos fueron fijadas en líquido de Bouin (75 ml solución saturada de ácido pícrico, 25 ml formol 40% estabilizado con metanol y 5 ml ácido acético glacial) en una relación de 1:10 muestra/fijador durante 24 hs a 4°C. Luego, fueron deshidratadas en una serie gradual de soluciones de etanol (70-100%), inmersas en xileno e incluidas en una mezcla de parafina con Paraplast® (relación 1:1). Se realizaron cortes transversales de 6 µm, empleando un micrótopo de rotación (Leica RM2125). Finalmente, los cortes fueron montados y coloreados con hematoxilina y eosina.

Los preparados fueron observados con microscopio (Nikon Eclipse E600) y se fotografiaron con cámara digital (Nikon DS-Fi1) adosada al mismo, para luego procesar las imágenes utilizando el programa NIS-Elements F 3.00.

Desarrollo gonadal y su relación con parámetros morfométricos

A partir del análisis de los preparados histológicos, se determinaron diferentes etapas en el desarrollo de las gónadas y se identificaron las relaciones con la talla y la edad. Los parámetros que se consideraron fueron: momento de diferenciación entre oogonias o espermatogonias en ovario y testículo respectivamente, presencia de tejido somático específico de cada sexo (tabiques), etapas de la espermatogénesis y de la oogénesis, y formas de unión al peritoneo (mesenterio) en la región gonadal (Kramer y Kallman, 1985; Devlin y Nagahama, 2002; Dietrich y Krieger, 2008).

Análisis de datos

Los datos fueron analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación de medias, a través de la prueba de Tukey. Las variables fueron transformadas a una escala logarítmica, cuando no cumplieron con los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad. Estos análisis se realizaron utilizando el software Prism Graphpad 5.0.

Resultados

Desarrollo gonadal en machos

Luego el análisis de las gónadas se pudieron determinar 5 estadios de desarrollo gonadal en machos de *C. decemmaculatus* bajo condiciones controladas. En todos los estadios se pudo observar un testículo único ubicado en el centro de la cavidad general del cuerpo, excepto en el estadio que denominamos 1, el cual presenta dos lóbulos.

Estadio 1

Se definió como Estadio 1 a aquel primordio testicular que presenta las siguientes características histológicas (Figura 40):

- Dos estructuras lobulares que se encuentran unidas al mesenterio por un tabique central en la parte dorsal de la cavidad, por debajo de la vejiga natatoria.
- Células somáticas y vasos sanguíneos en el centro de la gónada.
- Cistos en la periferia de cada lóbulo.

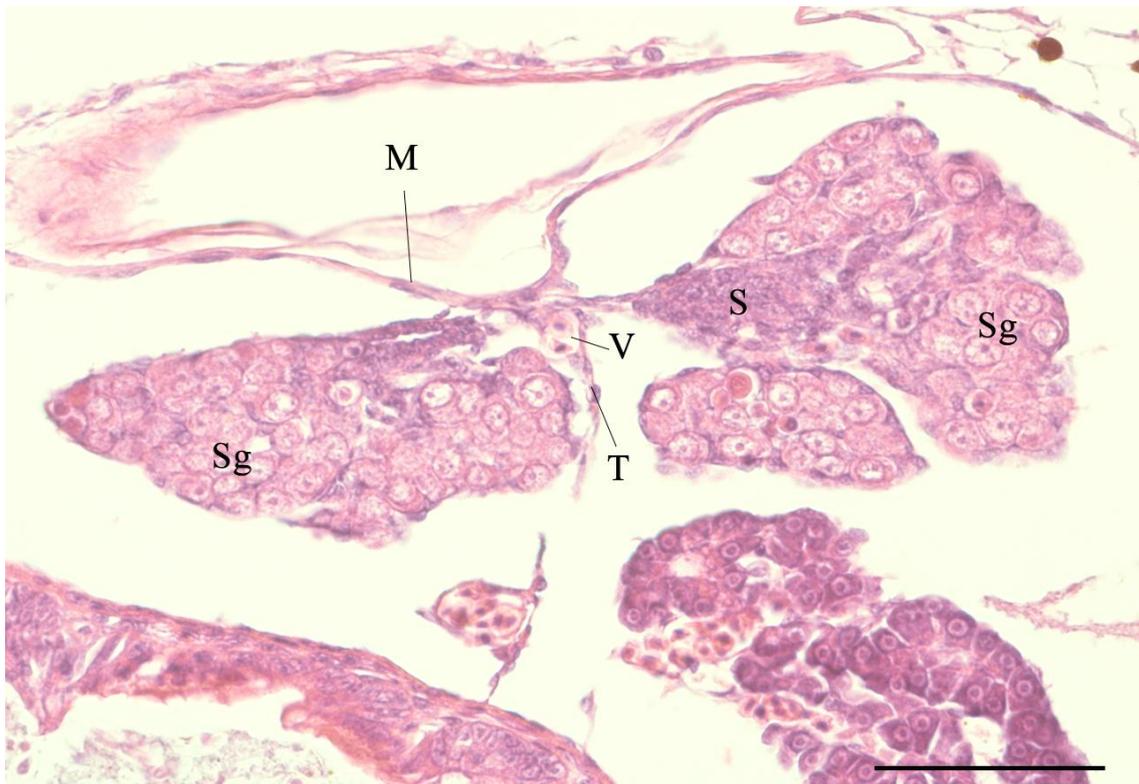


Figura 40. Estadio 1 del desarrollo testicular de *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; T: tabique; Sg: cisto de espermatogonias; S: células somáticas testiculares (Aumento = 400x; barra = 50 µm).

Estadio 2

El Estadio 2, representado en la Figura 41, se definió a partir de las siguientes características histológicas:

- Aparición de ductos espermáticos en cada lóbulo del testículo.
- Un aumento del tamaño de los lóbulos (elongación).

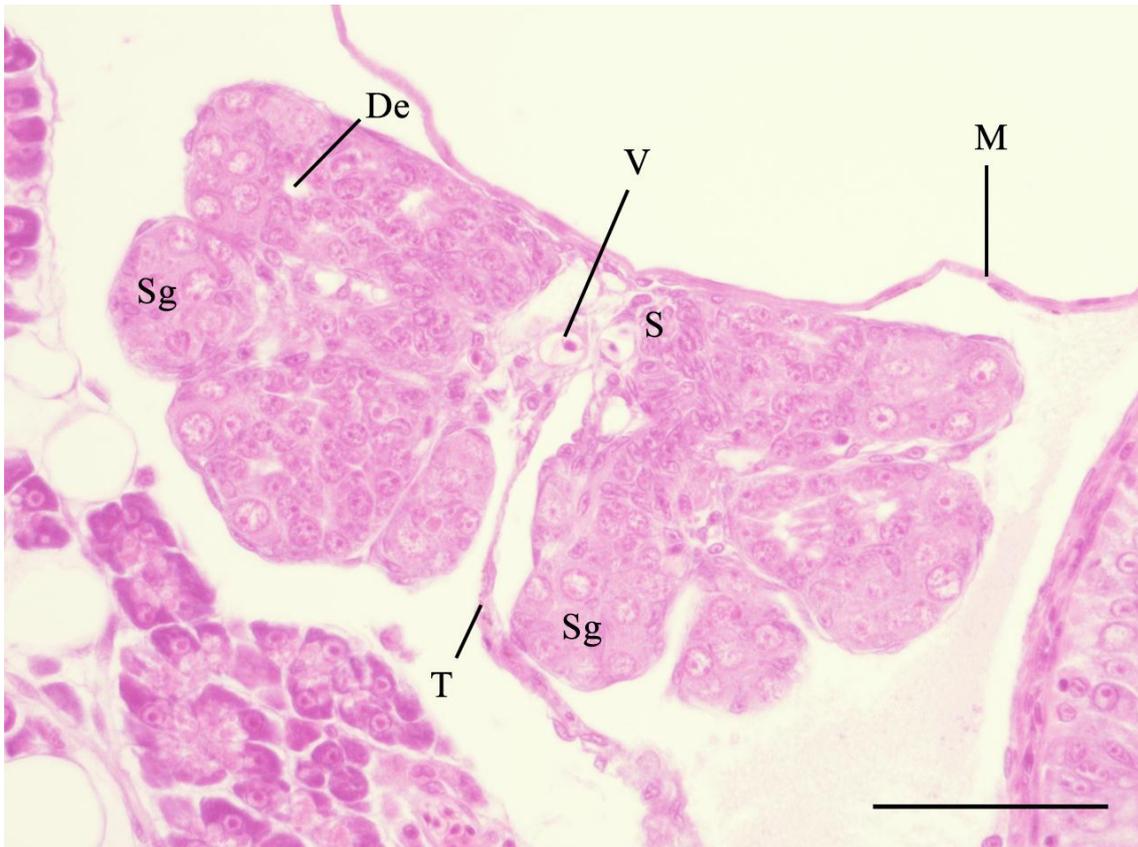


Figura 41. Estadio 2 del desarrollo del testículo en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; T: tabique; Sg: cisto de espermatogonias; S: células somáticas testiculares; De: ductos espermáticos (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).

Estadio 3

El Estadio 3 se definió a partir de las siguientes características histológicas y puede observarse en la Figura 42:

- Los dos lóbulos se fusionan y se forma un ducto central.
- Desaparece el tabique central.
- Se observan diferentes estadios de la línea espermatogénica, excepto espermatozoides.

- Los cistos con espermatogonias se ubican en la periferia del testículo.



Figura 42. Estadio 3 del desarrollo testicular en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; Sg: cisto de espermatogonias; Sc: cisto de espermatocitos; St: cisto de espermátidas; De: ductos espermáticos (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).

Estadio 4

El Estadio 4 se definió a partir de las siguientes características histológicas como se observa en la Figura 43:

- Aparición de una sustancia eosinófila (comúnmente llamada *pink-protein*) en el ducto eferente.
- Se observan espermatozoides que se agrupan en estructuras denominadas espermatozeugmatas que todavía no han llenado el lumen del ducto.

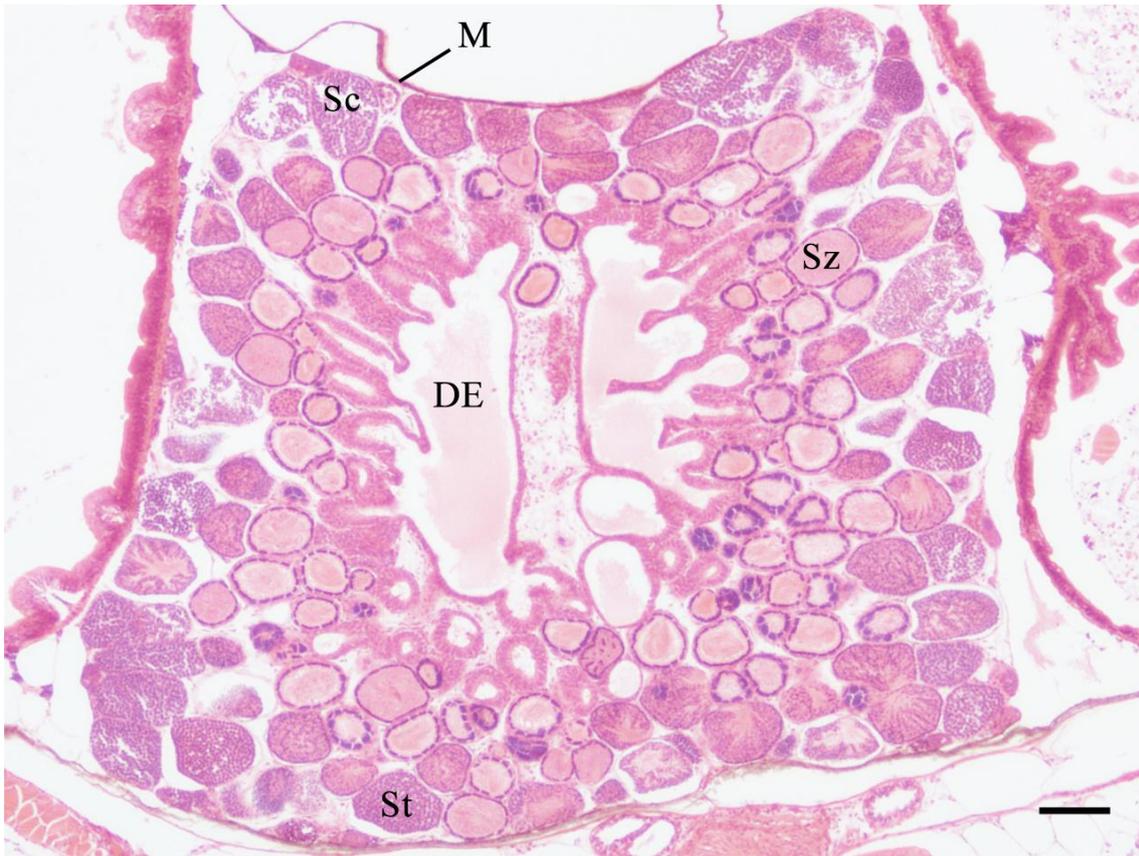


Figura 43. Estadio 4 del desarrollo testicular en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Sc: cisto de espermocitos; St: cisto de espermátidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ductos eferentes (Aumento = 40x; barra = 50 μ m).

Estadio 5

El Estadio 5 se definió a partir de las siguientes características histológicas y se observa en la Figura 44:

- El testículo ocupa aproximadamente 2/3 de la cavidad general del cuerpo.
- El ducto espermático contiene gran cantidad de espermatozeugmatas rodeadas de la *pink protein*.
- Los cistos de espermátidas quedan reducidos a pequeñas áreas en los márgenes del testículo

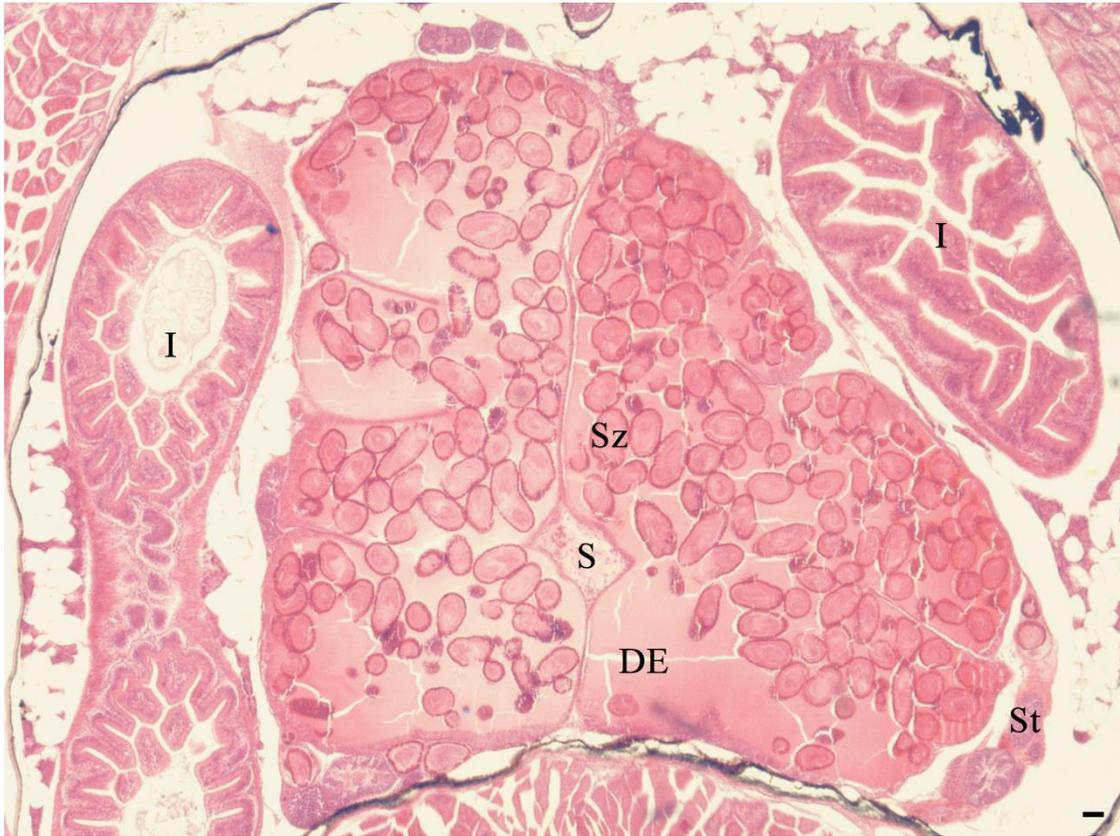


Figura 44. Estadio 5 del desarrollo testicular en *C. decemmaculatus*. St: cisto de espermátidas; Sz: espermatzeugmata; DE: ductos eferentes; S: células somáticas (parénquima) testiculares; I: intestino (Aumento = 40x; barra = 50 μ m).

Desarrollo gonadal en hembras

A partir del estudio histológico se identificaron 5 estadios gonadales durante el desarrollo del ovario en hembras de *C. decemmaculatus* bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperíodo (16L:8O).

Estadio 1

El Estadio 1 fue definido de acuerdo con las siguientes características histológicas (Figura 45):

- Dos estructuras lobulares independientes y simétricamente dispuestas respecto del eje anteroposterior del cuerpo que se encuentran adheridas al mesenterio por su parte parte dorsal, por debajo de la vejiga natatoria.
- En todos los casos se observó, al menos, un oocito primario y algunas oogonias, caracterizadas por su forma esférica/ovoidal y por un núcleo central grande que

contiene un nucléolo y material fibrilar y granular disperso, rodeado de un citoplasma claro.

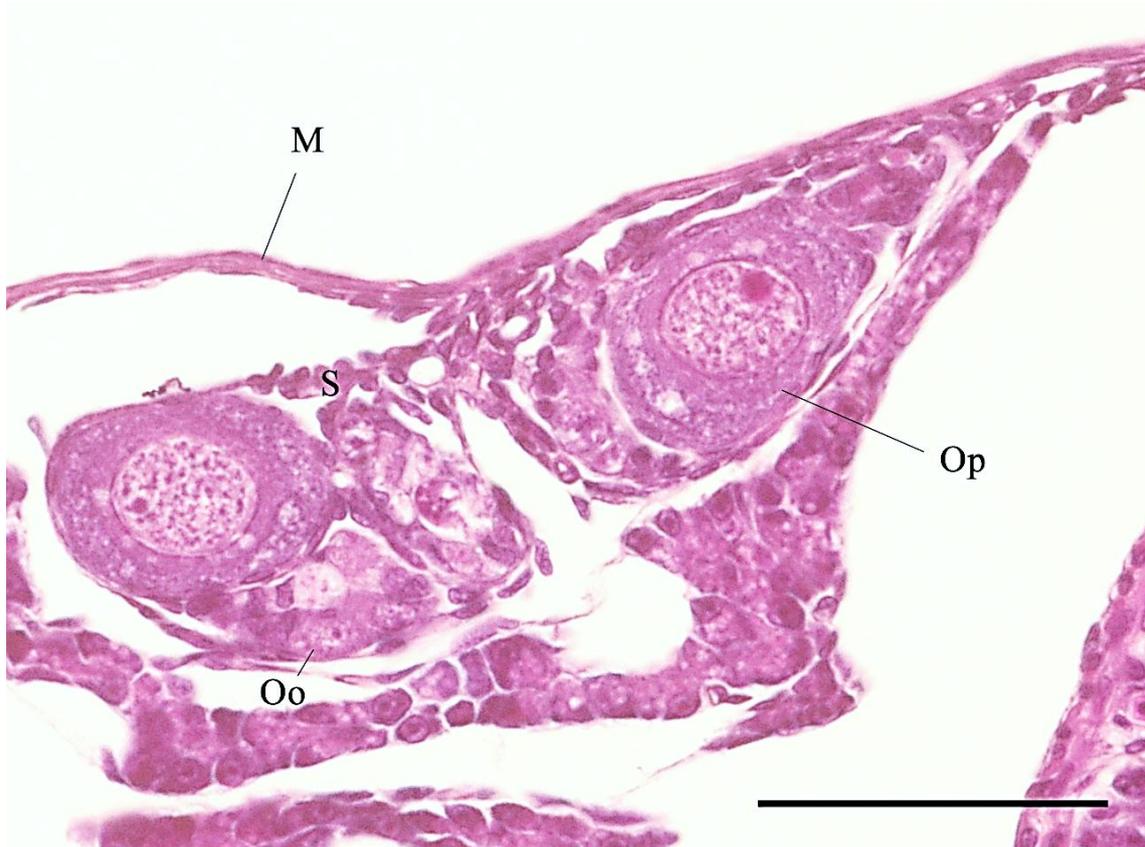


Figura 45. Estadio 1 del desarrollo del ovario en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; S: células somáticas ováricas (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).

Estadio 2

El Estadio 2 se definió de acuerdo con las siguientes características histológicas (Figura 46):

- Crecimiento centrípeto de un grupo de células somáticas en la región dorso lateral de cada lóbulo gonadal. La unión de estas células dará origen a la cavidad ovárica.
- Aumento de la cantidad de oocitos primarios caracterizados por sus vacuolas perinucleares y oogonias.

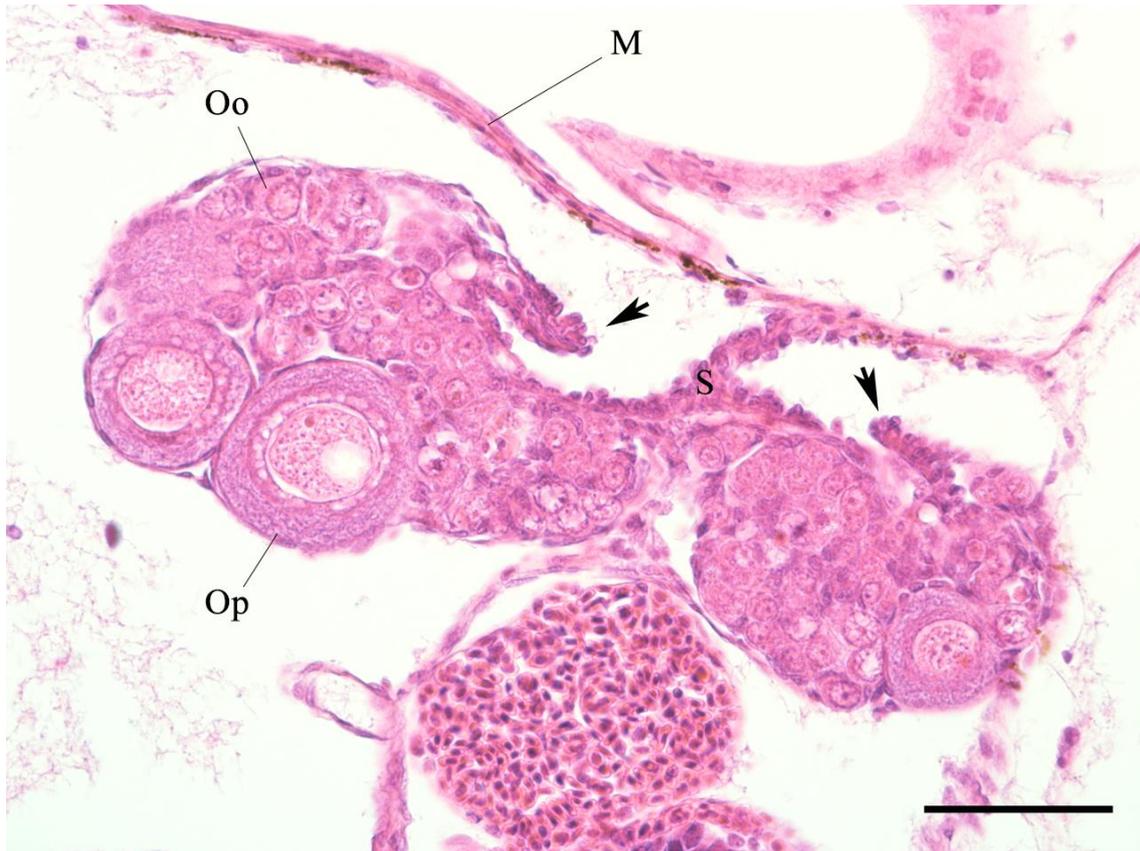


Figura 46. Estadio 2 del desarrollo ovárico en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; S: células somáticas ováricas. Las flechas indican la ubicación de un grupo de células somáticas con crecimiento centrípeto en la región dorso lateral del ovario (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).

Estadio 3

El Estadio 3 del desarrollo ovárico se definió de acuerdo con las siguientes características histológicas (Figura 47):

- Cierre de la cavidad ovárica en la región dorsal del órgano y fusión de ambos lóbulos ováricos en la región ventral con el mantenimiento de un tabique común.
- Aumento de la cantidad de oogonias, oocitos primarios y oocitos con alvéolos corticales.

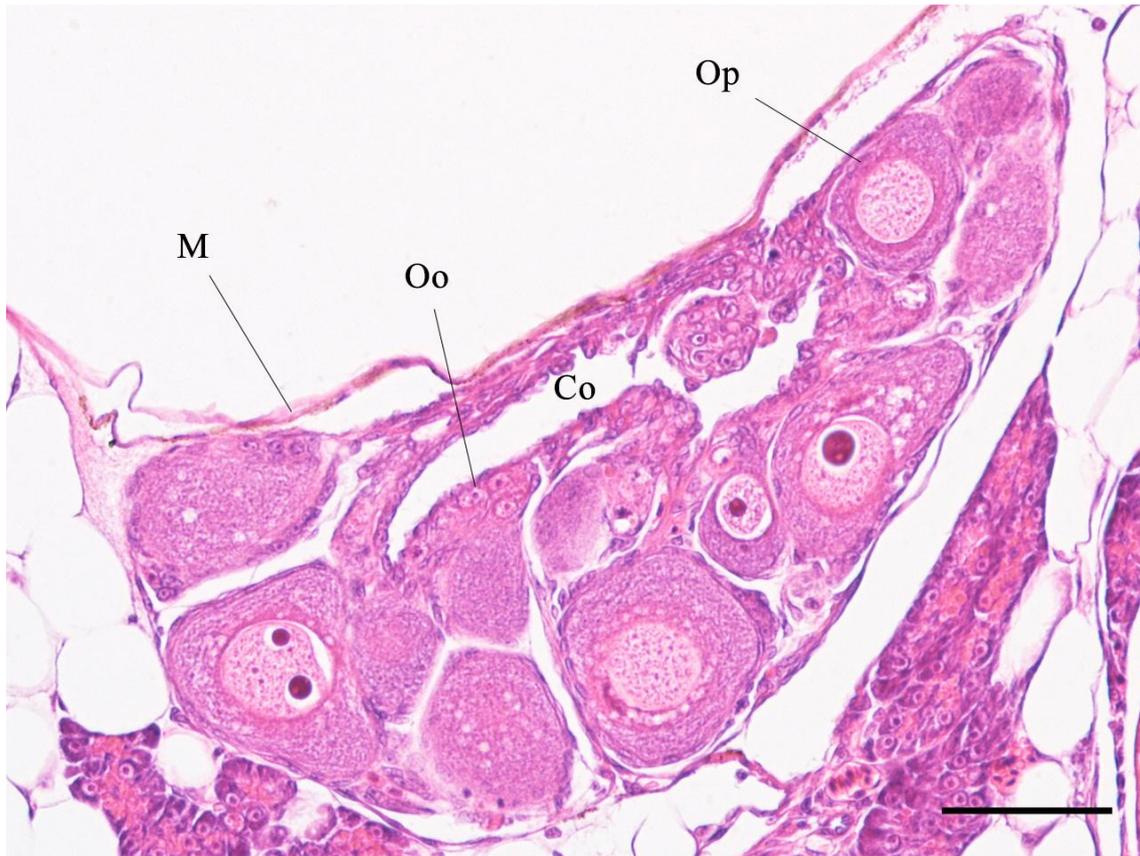


Figura 47. Estadio 3 del desarrollo del ovario en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).

Estadio 4

El Estadio 4 del desarrollo del ovario se definió de acuerdo con las siguientes características histológicas (Figura 48):

- Agrandamiento del ovario como una estructura única sin tabique central apreciable y cavidad ovárica ocupando la mayor parte de la región medio-dorsal del órgano.

Este Estadio representa el ovario típico de una hembra juvenil de $11,6 \pm 1,8$ mm.

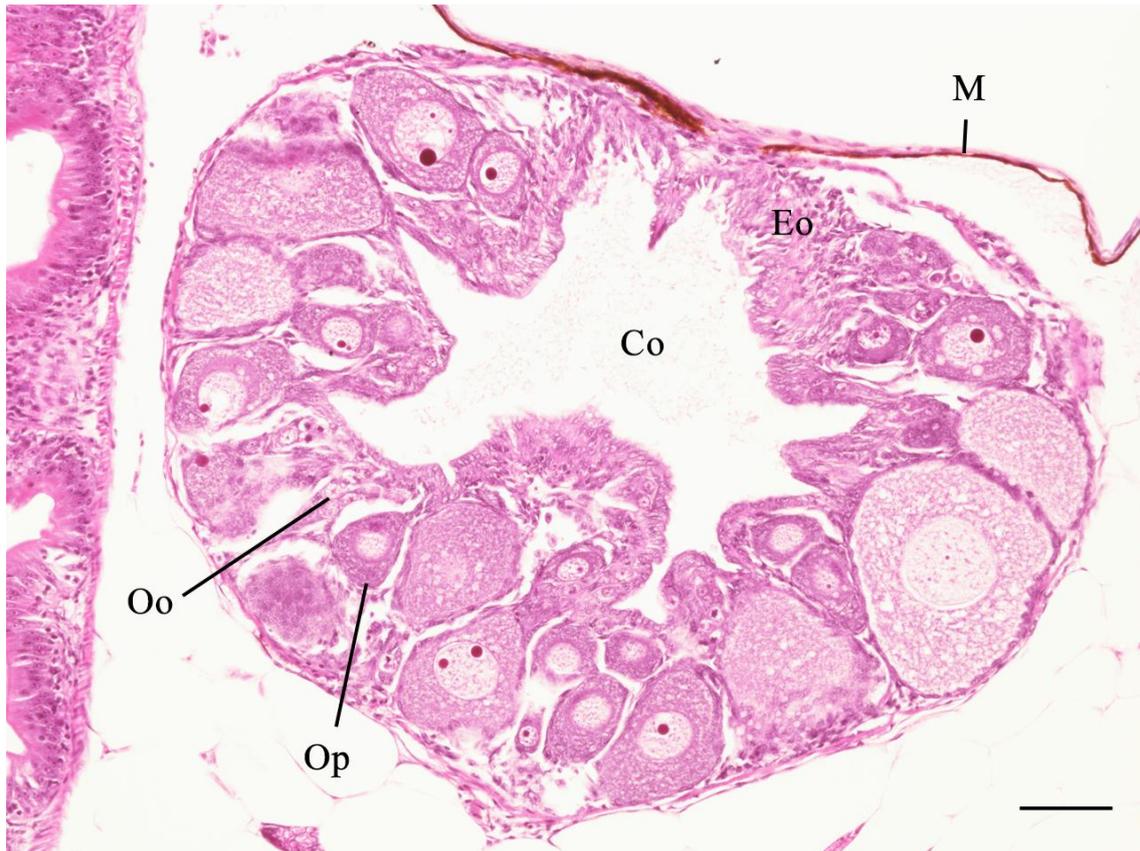


Figura 48. Estadio 4 del desarrollo del ovario en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; Eo: estroma ovárico (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).

Estadio 5

El Estadio 5 del desarrollo del ovario fue definido de acuerdo con las siguientes características histológicas (Figura 49):

- Células germinales en distintos estadios de la ovogénesis, desde oogonias hasta oocitos en vitelogénesis indicando un ovario en maduración.

Este Estadio es representativo del ovario en hembras adultas, el cual ocupa aproximadamente 2/3 de la cavidad general del cuerpo.

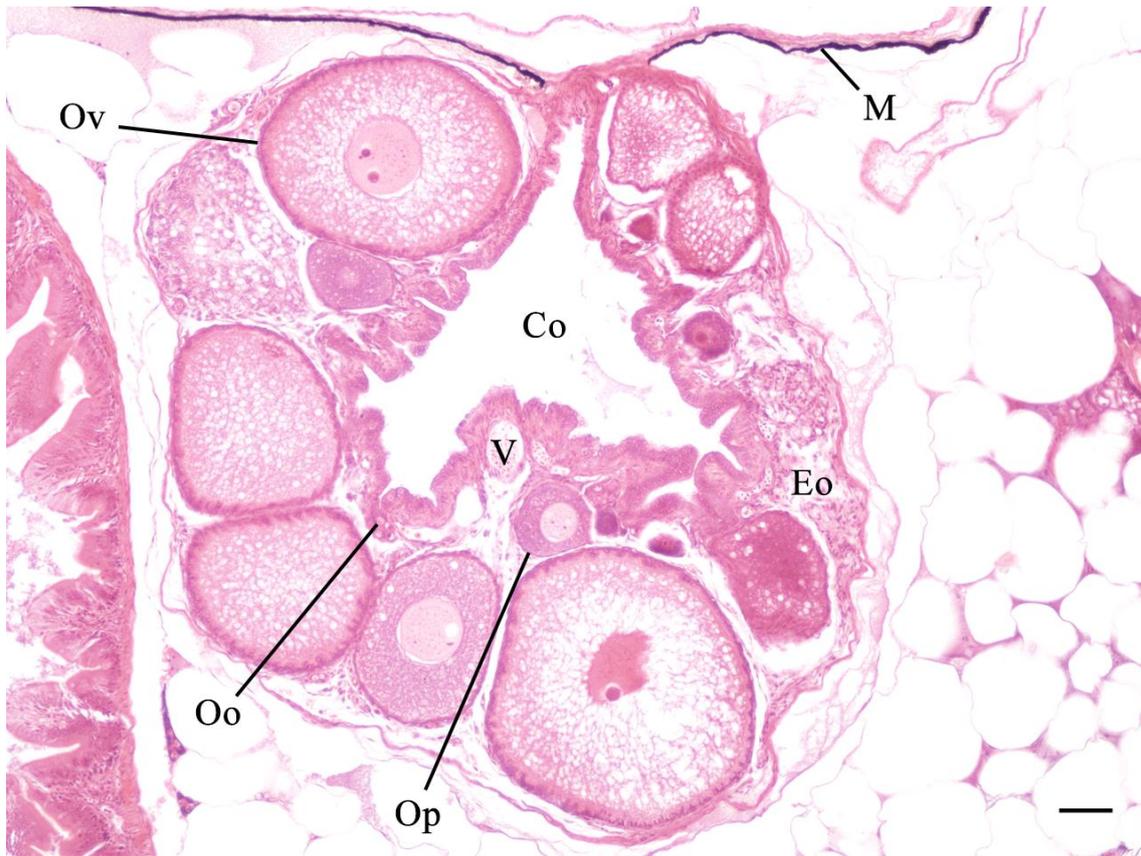


Figura 49. Estadio 5 del desarrollo del ovario en *C. decemmaculatus*. M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Ov: oocito vitelogénico; Co: cavidad ovárica; Eo: estroma ovárico; V: vaso sanguíneo (Aumento = 100x; barra = 50 μ m).

Relación entre el sexo gonadal y el fenotipo

En esta sección, se muestra la relación entre distintos parámetros morfológicos, con el fin de lograr diferenciar tempranamente entre machos y hembras. Además, se encontró que el desarrollo del testículo y del ovario se encuentran más relacionados con el tamaño del animal que con la edad.

Largo estándar, peso corporal y edad

La relación entre la talla, el peso corporal y la edad esta mostrada en la Figura 50 en individuos sexados por histología gonadal (A-C-E; $n = 113$) y por los caracteres fenotípicos propios de la especie definidos anteriormente (B-D-F; $n = 179$). De esta forma el fenotipo correspondiente a cada sexo se realizó de acuerdo con los criterios establecidos anteriormente.

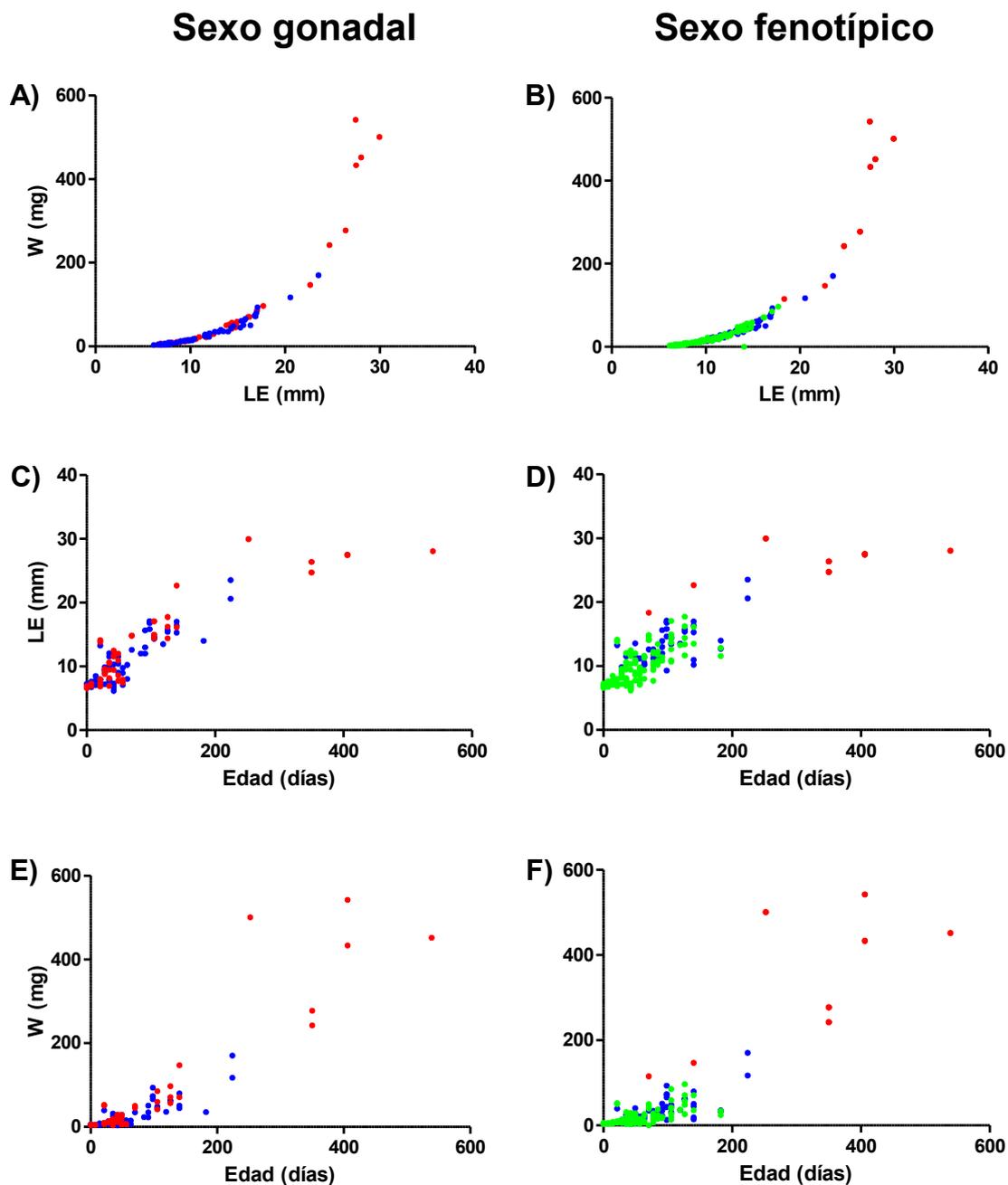


Figura 50. Relación entre la talla, el peso y la edad en individuos sexados por histología gonadal (A-C-E) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D-F). A-B: largo estándar (LE) en función del peso corporal (W). C-D: largo estándar en función de la edad. E-F: peso corporal en función de la edad. ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Longitud del radio 4 de la aleta anal

La relación de la longitud del radio 4 de la aleta anal con el largo estándar (Figura 51A-B) y con la edad (Figura 51C-D) puede ser observada en individuos sexados por histología

gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

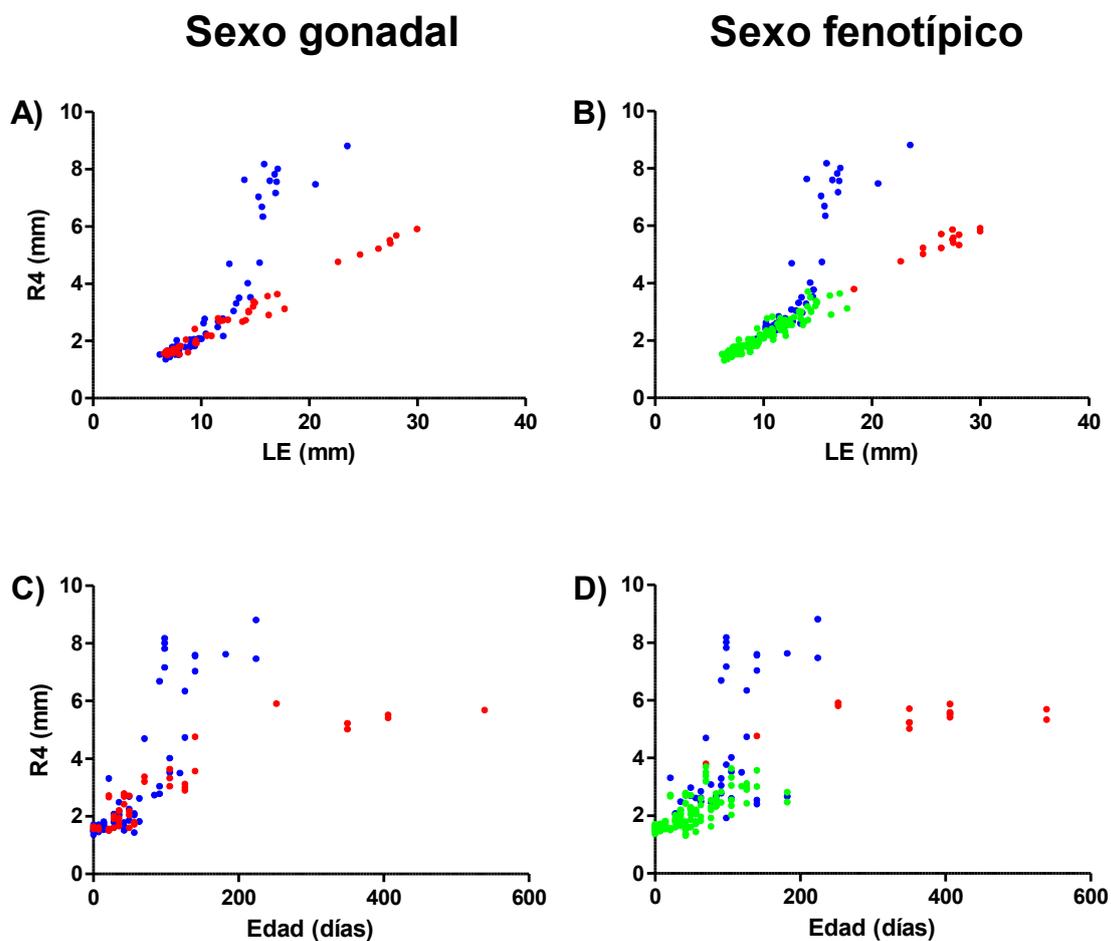


Figura 51. Longitud del radio 4 de la aleta anal (R4) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Longitud del radio 6 de la aleta anal

La relación de la longitud del radio 6 de la aleta anal con el largo estándar (A-B) y con la edad (C-D) puede ser observada en la Figura 52 en individuos sexados por histología gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

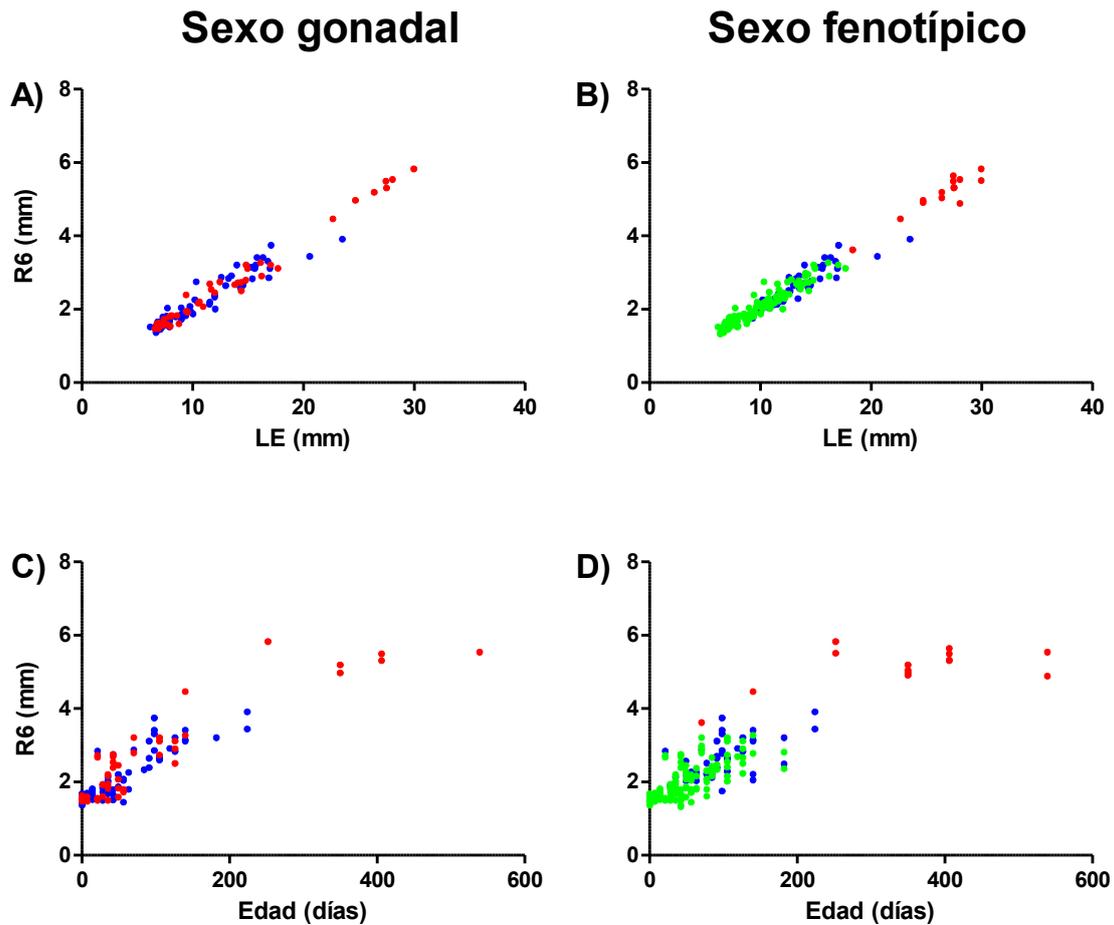


Figura 52. Longitud del radio 6 de la aleta anal (R6) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Índice gonopodial

La relación del índice gonopodial con el largo estándar (A-B) y con la edad (C-D) puede ser observada en la Figura 53 en individuos sexados por histología gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

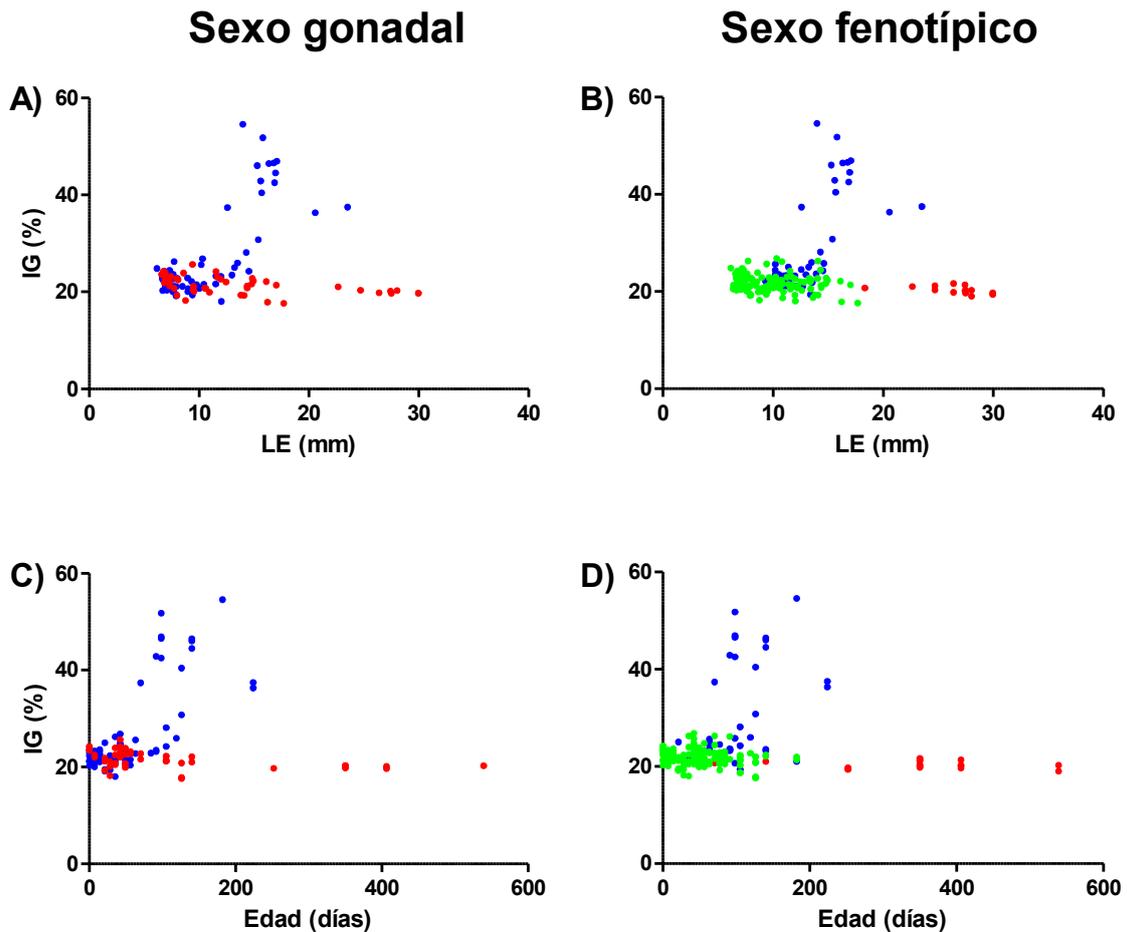


Figura 53. Índice gonopodial (IG) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Índice de elongación

La relación del índice de elongación con el largo estándar (A-B) y con la edad (C-D) puede ser observada en la Figura 54 en individuos sexados por histología gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

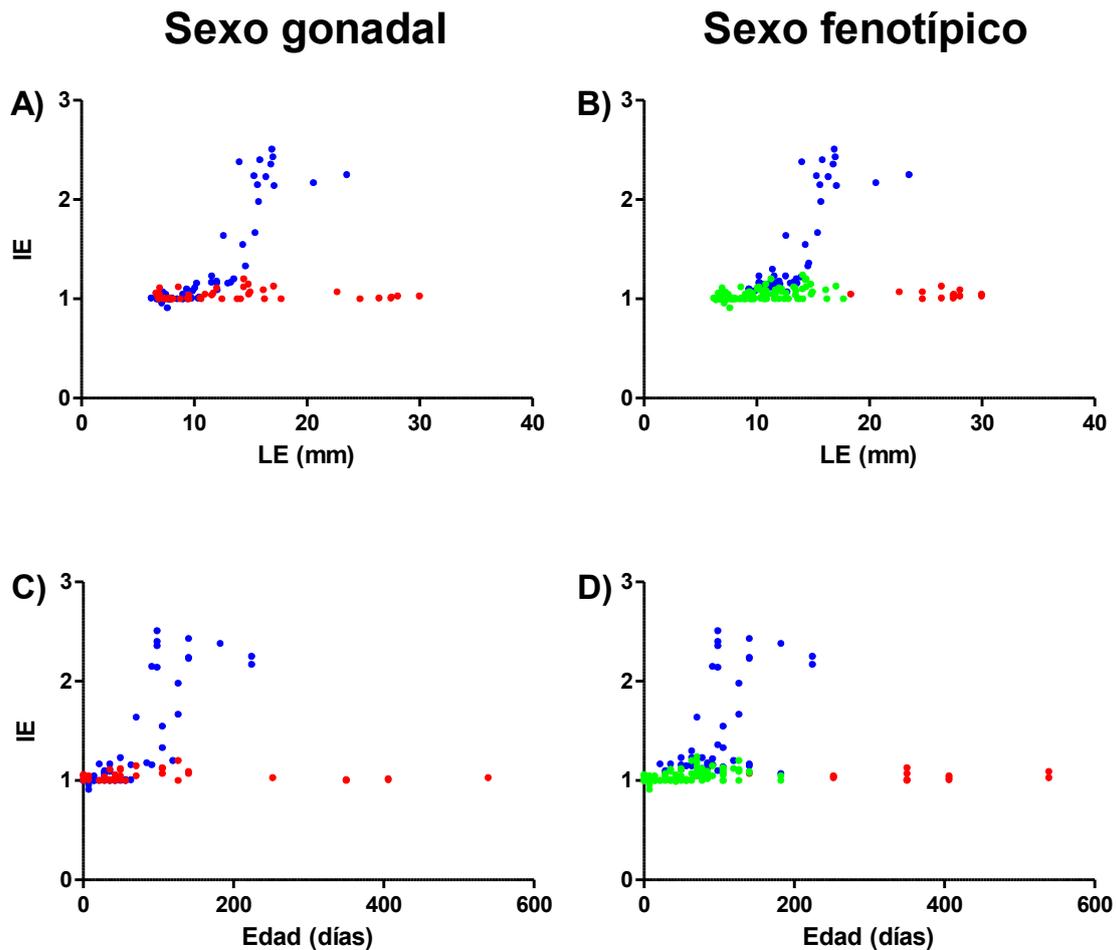


Figura 54. Índice de elongación (IE) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Índice de condición

La relación del índice de condición con el largo estándar (A-B) y con la edad (C-D) puede ser observada en la Figura 55 en individuos sexados por histología gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

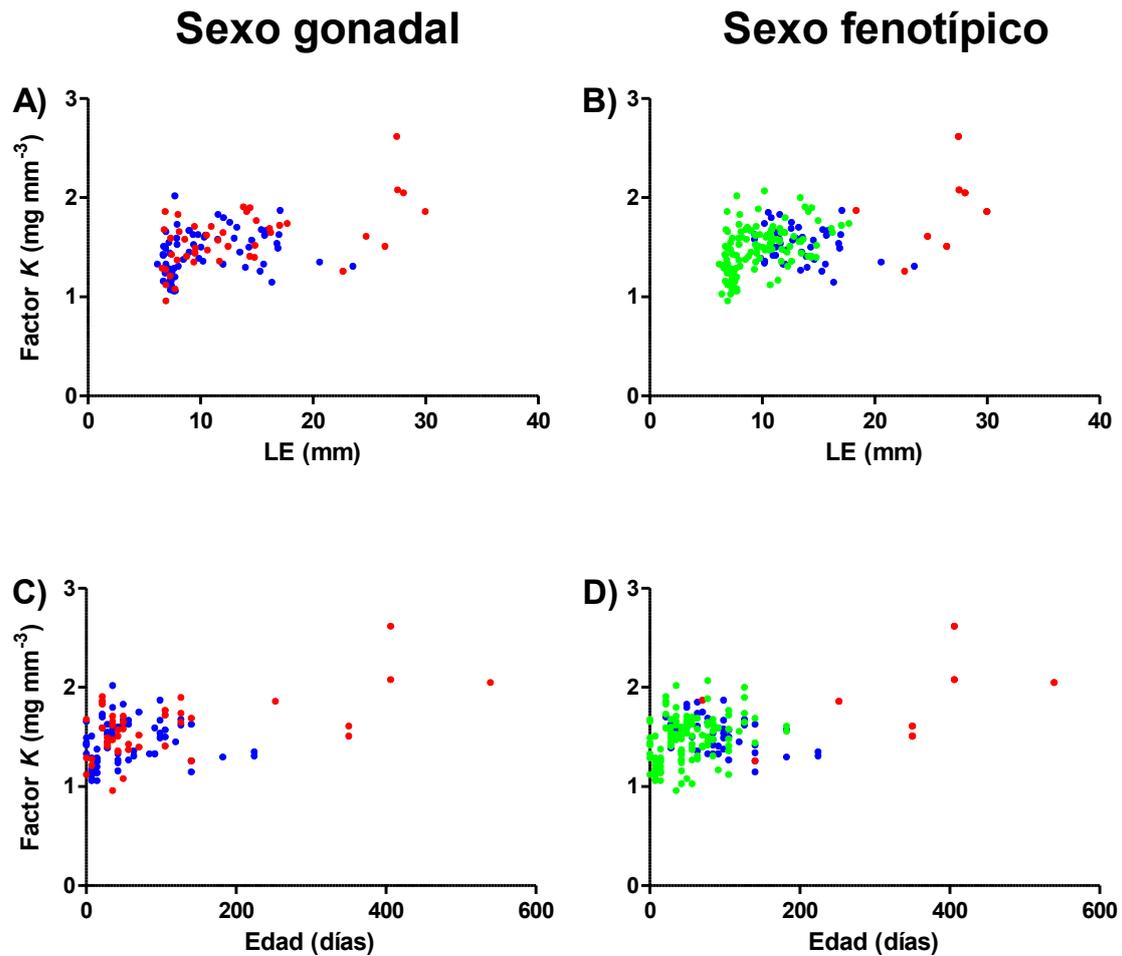


Figura 55. Índice de condición (Factor K) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.

Índice de desarrollo del gonopodio

La relación de IDG con el largo estándar (A-B) y con la edad (C-D) puede ser observada en la Figura 56 en individuos sexados por histología gonadal (A-C; $n = 113$) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D; $n = 179$).

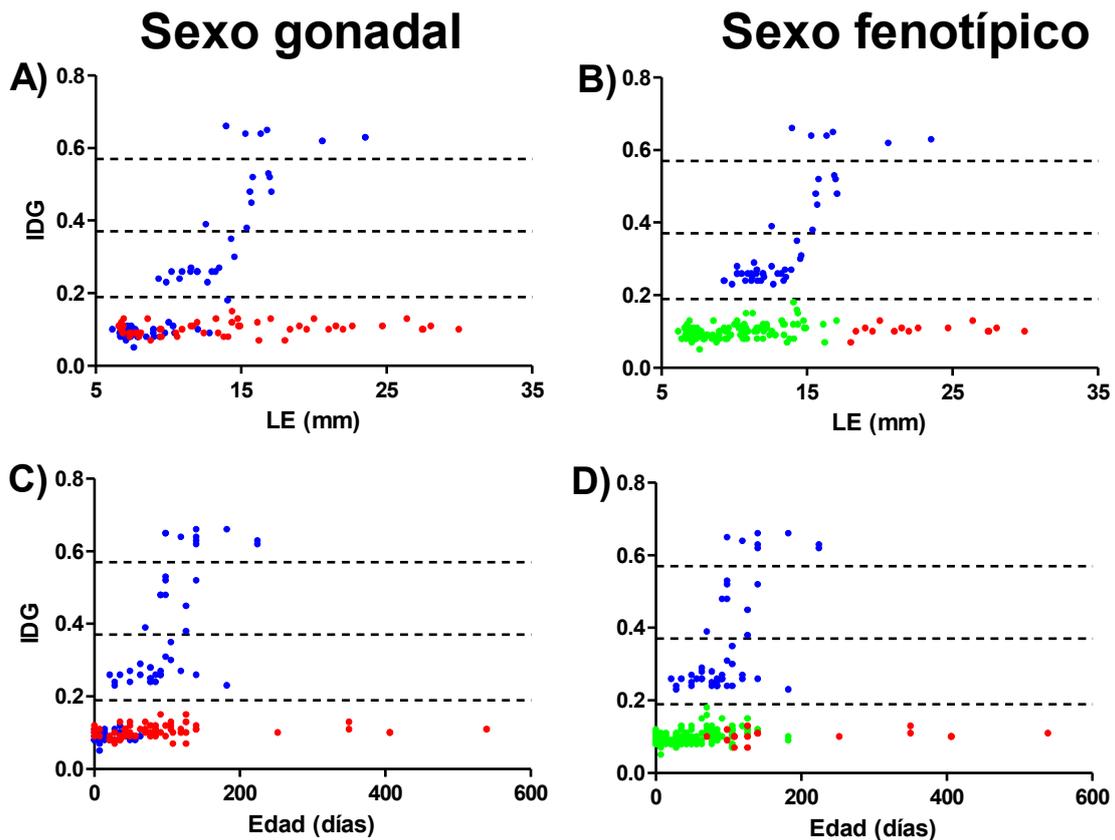


Figura 56. Índice de desarrollo del gonopodio (IDG) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Las líneas de corte horizontales marcan la separación entre los distintos estadios en valores de IDG iguales a 0,19; 0,37 y 0,57.

Discusión

En el presente capítulo, se describieron y caracterizaron 5 estadios de desarrollo del ovario y del testículo en hembras y machos de *Cnesterodon decemmaculatus*, respectivamente. Este estudio contempló la ventana de desarrollo que transcurre desde el nacimiento hasta la madurez sexual.

El ovario y el testículo presentan características muy diferentes, sin embargo, ambos están compuestos por líneas celulares de desarrollo común, incluyendo células de soporte, intersticiales y germinales (Nishimura y Tanaka, 2014). En este estudio, no se observó ningún indicio de elementos de la línea femenina y masculina dentro de una misma gónada. Koya *et al.* (2003) describieron que *Gambusia affinis*, una especie filogenéticamente cercana a *C. decemmaculatus*, presenta un mecanismo de

diferenciación gonadal del tipo no-diferenciada, de acuerdo con la definición de Devlin y Nagahama (2002). Es decir, que previo al nacimiento todos los individuos presentaban un primordio gonadal con presencia de oocitos hasta dos días antes del nacimiento y luego se re-diferencian a ovario o testículo. Este mismo tipo de diferenciación sexual se ha documentado en zebrafish (*Danio rerio*) (Uchida *et al.*, 2002). Aunque no es posible asegurar qué tipo de diferenciación sexual tiene *C. decemmaculatus* con los datos que se cuentan hasta el momento, se puede afirmar que la diferenciación sexual ocurre durante el período de gestación debido a la observación de ovarios y testículos diferenciados desde el nacimiento, evidencia mostrada en el presente capítulo de tesis.

Como se mencionó anteriormente, los poecílidos presentan una gran diversidad de mecanismos de determinación genética del sexo, y se han documentado especies con heterogamia femenina y otras con heterogamia masculina (Böhne *et al.*, 2009; Schultheis *et al.*, 2009). Por ello, sería interesante trabajar sobre aquellos genes que determinan y/o diferencian el sexo en *C. decemmaculatus* y relacionarlos con el sexo gonadal, aunque puede no ser trivial. Esto permitiría completar el conocimiento sobre los mecanismos de determinación y diferenciación sexual de esta especie.

Desarrollo del testículo

Parenti *et al.* (2010) han publicado que los ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* presentan un testículo único. Sin embargo, éste es el primer estudio que además de confirmar los resultados de Parenti y colaboradores, para las etapas adultas, determina que estos peces están gonadalmente diferenciados en el momento del nacimiento. Además, muestra que los machos recién nacidos presentan dos lóbulos testiculares (Estadios 1 y 2) que se fusionarán luego en el transcurso del desarrollo formando un único testículo (Estadio 3). En otras especies de poecílidos, también se ha documentado que los individuos nacen con dos lóbulos gonadales, tal es el caso de *Gambusia affinis*, *Xiphophorus maculatus*, *X. pygmaeus-nigrensis* y *X. nigrensis* (Kramer y Kallman, 1985; Koya *et al.*, 2003).

En *C. decemmaculatus*, los cistos espermáticos se desarrollan desde la periferia testicular hasta el ducto central. La espermatogénesis es un proceso de desarrollo durante el cual un pequeño número de células madre espermatogoniales diploides producen una gran cantidad de espermatozoides altamente diferenciados que portan un genoma haploide y recombinado (Schulz *et al.*, 2010). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por

Koya *et al.* (2003) en *G. affinis*. A medida que progresa la espermatogénesis, el orden creciente de maduración ocurre desde las espermatogonias hasta las espermatozéugmatas, estructura característica de los testículos de los poecílidos, las cuales migran hacia el sistema de conductos eferentes.

En el presente estudio, se observaron también ejemplares con la presencia de una sustancia de coloración rosada localizada dentro de los ductos eferentes (Estadio 4). Esto se puede relacionar con la secreción PAS-positiva de una glicoproteína denominada *pink-protein*, secretada por el epitelio de los ductos eferentes, según Parenti *et al.* (2010). Estos autores sostienen que esta proteína esté probablemente involucrada en la inactivación de los espermatozoides dentro del testículo, impidiendo su maduración final. Los espermatozéugmatas finalmente son transferidos del macho a la hembra durante la copulación.

La estructura del epitelio germinal testicular varía entre los peces óseos. Los teleósteos tienen un testículo lobular que se divide en dos tipos, basados en la distribución de las espermatogonias: restringidos y no restringidos (Grier *et al.*, 1980; Parenti y Grier, 2004). En el caso de los Atherinomorfos, como *C. decemmaculatus*, presentan un tipo de testículo lobular restringido, en el que los lóbulos muestran una progresión ordenada de las células germinales en desarrollo, con las espermatogonias confinadas a la periferia testicular (Uribe *et al.*, 2015).

Desarrollo del ovario

En este estudio se observó que las hembras recién nacidas, presentaban un ovario ya diferenciado, como una estructura bilobular conteniendo al menos un oocito primario (Estadio 1). Posteriormente, se apreció un aumento progresivo de las células somáticas que se encuentran en posición dorsolateral en ambos lóbulos, creciendo centrípetamente hacia el tabique central (Estadio 2). Este grupo de células finalmente convergen encerrando la cavidad ovárica mientras que las células del tabique se reabsorben dando un ovario único (Estadio 3). Un proceso similar se describió para el desarrollo del ovario en hembras de otras especies de peces, como *Odontesthes bonariensis* (Ito *et al.*, 2005) y *Tilapia mossambica* (Nakamura, 2013). Dentro del ovario, los distintos estadios de desarrollo de los oocitos se encuentran ubicados alrededor de la cavidad ovárica y en general, las oogonias se encuentran en una posición cercana a dicha cavidad. Sin

embargo, no se observó un ordenamiento particular de los distintos estadios de desarrollo de los oocitos, como se viera en la organización del testículo.

Se observa que el ovario único de *C. decemmaculatus* ocupa, en el Estadio 5, aproximadamente 2/3 partes de la cavidad general del cuerpo. En el ovario maduro se diferencia, una cavidad ovárica, el epitelio germinativo (los distintos estadios oogenéticos) y el estroma ovárico (células somáticas). Las oogonias, mitóticamente activas, se localizan en el epitelio germinal. Los folículos ováricos están distribuidos en el estroma, y son la fuente de las hormonas esteroideas gonadales (Nishimura y Tanaka, 2014). En poecílicos, las hembras pueden almacenar en el ovario, los espermatozeugmatas liberados en su interior por los machos durante la copulación (Potter y Kramer, 2000). En *C. decemmaculatus*, el embrión se desarrolla dentro de la hembra que luego nace como organismo morfológicamente similar a sus progenitores y apto para la vida en el medio acuático, característica de la reproducción ovovivípara (Siccardi, 1954).

Relación entre el desarrollo de las gónadas y de los caracteres sexuales secundarios

La relación entre el desarrollo de las gónadas con el momento en que se manifiestan los caracteres sexuales secundarios nos permite comprender cómo ocurre el desarrollo sexual y considerar qué posibles mecanismos fisiológicos y moleculares se encuentran involucrados. En poecílicos, se han publicado descripciones de los estadios del desarrollo gonadal (Van den Hurk, 1974), de los estadios de la morfogénesis de la aleta anal (Kramer y Kallman, 1985) y de la relación entre estos parámetros (Schreibman *et al.*, 1982). En la presente tesis, se pudo observar que de los ejemplares categorizados como “sexualmente indiferenciados” mediante parámetros morfológicos, lo que podríamos definir como sexo fenotípico, el 100 % de los mismos ya tenía su gónada diferenciada. Esto evidencia que la gónada ya se encontraba diferenciada a ovario o a testículo en individuos recién nacidos, lo cual indica que la morfogénesis gonadal ocurre durante la gestación. En el rango comprendido entre 12,5 y 15,5 mm de largo estándar, se produce un marcado dimorfismo en el índice de elongación. En este rango, el 100% de las hembras presentaban un ovario en el cuarto estadio de desarrollo gonadal, mientras que un 50% de los machos presentaban un testículo en el tercer estadio, un 25% en el cuarto y el otro 25% en el quinto estadio de desarrollo gonadal. A su vez, se puede mencionar que, en una

población muestreada de 180 ejemplares, la relación de sexos fue 59,3:40,7 expresada como porcentaje de machos y de hembras, respectivamente, sugiriendo que en condiciones naturales la proporción de sexos en *C. decemmaculatus* se encuentra balanceada. Este dato es importante ya que puede tomarse como un parámetro a evaluar cuando los peces son expuestos a EDCs.

CAPÍTULO 3. EXPOSICIÓN DE JUVENILES A UN COMPUESTO ESTROGÉNICO

Introducción

Perturbación del eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal

Como se detalló en los capítulos anteriores, la reproducción de los vertebrados está controlada por el eje hipotalámico-hipófiso-gonadal (HHG) a través de una cascada de hormonas cuyas concentraciones están finamente reguladas por sistemas de retroalimentación y distintos mecanismos de control. Cualquier sustancia química que altere la concentración de hormonas endógenas, mimetice o antagonice su acción, uniéndose o interfiriendo con los sitios de unión de las hormonas a sus receptores, puede perturbar este proceso. Por ello, las sustancias capaces de alterar el sistema endocrino, y particularmente, las que afectan el eje HHG, se han convertido en un foco de preocupación y de estudio en todo el mundo. Actualmente, se cuenta con abundante evidencia sobre alteraciones inducidas a nivel de la reproducción en animales silvestres como resultado de la exposición a EDCs (Jobling et al., 1998; Tyler et al., 1998; Gross-Sorokin et al., 2006; Kidd et al., 2007). Dichos efectos no sólo han sido evidenciados en estudios a campo, sino que también han sido estudiados en distintos modelos de animales bajo condiciones controladas de laboratorio con el fin de comprender los procesos y mecanismos involucrados (Denslow y Sepúlveda, 2007; Ankley et al., 2009; Ankley et al., 2010).

Entre los mecanismos de acción conocidos de los EDCs sobre el eje HHG de vertebrados, se pueden mencionar los siguientes a modo de ejemplo:

- Inhibición de la liberación de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en el hipotálamo (Kordon y Gaillard, 2006; Waye y Trudeau, 2011).
- Inhibición de la liberación de gonadotrofinas desde la hipófisis (Kordon y Gaillard, 2006; Waye y Trudeau, 2011).
- Interferencia con la producción de hormonas esteroideas gonadales (Kester *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 2018).
- Interferencia sobre la circulación de hormonas endógenas, ya que los EDCs tienen la capacidad de unirse a los mismos portadores plasmáticos (Kordon y Gaillard, 2006).
- Agonismo/Antagonismo de receptores hormonales (Tabb y Blumberg, 2006; Fucic *et al.*, 2012; Ogino *et al.*, 2018).

Efectos de perturbadores endocrinos en etapas tempranas del desarrollo

Se sabe que ciertas etapas del ciclo de vida son más sensibles que otras a la exposición a EDCs (Brion *et al.*, 2004). Si la exposición ocurre durante las primeras etapas del ciclo de vida, los animales se encuentran en un período altamente crítico debido a que los EDCs pueden afectar la determinación del sexo y/o la diferenciación sexual (Piferrer y Donaldson, 1989; Brion *et al.*, 2004). Algunas de las especies de peces expuestas a compuestos estrogénicos durante este periodo crítico son *Pimephales promelas* (van Aerle *et al.*, 2002), *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2004), *Cyprinus carpio* (Gimeno *et al.*, 1996), *Oncorhynchus kisutch* (Goetz *et al.*, 1979; Piferrer y Donaldson, 1989), *Rutilus rutilus* (Rodgers-Gray *et al.*, 2001), *Oncorhynchus tshawytscha* (Piferrer y Donaldson, 1992), *Odontesthes bonariensis* (Pérez *et al.*, 2012), *Oncorhynchus mykiss* (Govoroun *et al.*, 2001) y *Oryzias latipes* (Iwamatsu *et al.*, 2005; Kobayashi y Iwamatsu, 2005; Hirai *et al.*, 2006) viendo en general alteraciones en la relación de sexos de la progenie y la histología gonadal. También se documentaron efectos de compuestos androgénicos en *Pimephales promelas* (Bogers *et al.*, 2006), *Oreochromis niloticus* (El-Greisy y El-Gamal, 2012), *Oncorhynchus hisutch* (Goetz *et al.*, 1979) y *Odontesthes bonariensis* (González *et al.*, 2015) con efectos similares en sentido opuesto.

A modo de ejemplo de efectos sobre peces expuestos a compuestos estrogénicos durante la diferenciación sexual, se puede mencionar la inversión sexual de machos de *Oryzias latipes*, con la formación de un ovario funcional (Yamamoto, 1962; Iwamatsu *et al.*, 2005; Kobayashi y Iwamatsu, 2005). También, la exposición de alevinos de salmón a estos compuestos durante una ventana estrecha de sólo pocos días puede causar la feminización de estos (Piferrer y Donaldson, 1989, 1992). Estos autores también demostraron que la exposición durante el mismo período de tiempo, pero fuera de esta ventana crítica de sensibilidad, no tuvo ningún efecto sobre la diferenciación sexual. En pejerrey, la exposición de larvas a compuestos estrogénicos, en el período de determinación/diferenciación sexual también tiene la capacidad de feminizar la gónada (Pérez *et al.*, 2012). Este tipo de efectos no sólo ha sido documentado en peces, sino que también en anfibios y mamíferos. Por ejemplo, en los anfibios expuestos a compuestos estrogénicos se induce la formación de ovarios en machos durante el período larval (Villalpando y Merchant-Larios, 1990; Guillette *et al.*, 1994; Miyata *et al.*, 1999). En el caso de mamíferos, la exposición de embriones de ratas en el útero a compuestos estrogénicos causó una disminución del tamaño de los testículos y de la producción de esperma en la descendencia masculina (Gray *et al.*, 1989; Sharpe *et al.*, 1995).

En el caso de los poecílidos también se han documentado efectos de perturbadores endocrinos durante etapas tempranas del ciclo de vida. Los principales efectos vistos en este grupo de peces se encuentran vinculados con la reducción del gonopodio en machos expuestos a compuestos estrogénicos (Drèze *et al.*, 2000; Doyle y Lim, 2002; Angus *et al.*, 2005) o la inducción de esta estructura en hembras expuestas a andrógenos (Brockmeier *et al.*, 2013) y progestágenos (Frankel *et al.*, 2016b). Por otro lado, se pueden mencionar los trabajos de Bayley *et al.* (2002) sobre machos de *Poecilia reticulata* expuestos a antiandrógenos (vinclozolin, *p,p'*-DDE y flutamida) quienes observaron inhibición del desarrollo del gonopodio y Sone *et al.* (2005) quienes observaron inducción del desarrollo del gonopodio en hembras de *G. affinis* expuestas a andrógenos (17 β -trembolona y metiltestosterona). Sin embargo, el efecto más llamativo que se documentó entre todas las especies de esta familia de peces, fue la inducción de *testis-ova* en hembras juveniles de *G. affinis* expuestas a 1-10 μ g/L de 17 β -trembolona durante 28 días (Sone *et al.*, 2005). Esta masculinización de hembras se caracterizó por presentar espermatozoides en el ovario. Cabe resaltar que al momento de iniciar esta tesis no se habían reportado *testis-ova* en poecílidos por exposición a compuestos estrogénicos.

El 17 α -etinilestradiol como compuesto estrogénico de referencia

Una sustancia con acción estrogénica ampliamente detectada en aguas superficiales es el EE₂, una hormona sintética derivada del E₂ que actúa como agonista de los receptores de estrógenos (REs) (Cajthaml *et al.*, 2009). El EE₂ se sintetiza a partir de la reacción de Nef, o una modificación de esta, mediante la cual se hace que la estrona reaccione con acetiluro de sodio en amoníaco líquido. La hidrólisis del complejo de adición de sodoxi produce el carbinol deseado. También puede prepararse mediante la reacción de Grignard a partir de estrona y bromuro de etinilmagnesio (Troy, 2005; Lewis, 2007). El uso más común del EE₂ en medicina humana está vinculado a la terapia de sustitución de estrógenos, el tratamiento del hipogonadismo femenino, de los síntomas vasomotores relacionados a la menopausia, de cáncer de próstata y mamas, y como componente de los anticonceptivos orales juntamente con progestágenos (IARC, 2007; Abouelenien *et al.*, 2009). En ganadería, EE₂ es usado para controlar la ovulación y tratar desórdenes reproductivos (Bártíková *et al.*, 2016). En humanos, la afinidad entre el EE₂ y los REs es similar o sólo 2 veces mayor que la del E₂, mientras que en peces se ha demostrado que esta afinidad es 5 veces mayor (Tilton *et al.*, 2005). Esta mayor afinidad por los

receptores, indica que el EE₂ es un compuesto estrogénico más potente que el mismo E₂. Este último, es una molécula que tiene buena absorción por vía oral, pero es rápidamente metabolizada en el hígado. En cambio, la sustitución del carbono-17 con un grupo acetileno (-C≡CH) en la molécula de EE₂, le confiere gran resistencia a la biotransformación hepática. Principalmente es excretado como metabolitos por vía renal y en menor medida por vía fecal, luego de someterse a una extensa recirculación enterohepática (USNIH, 2008).

Los efluentes cloacales representan uno de los principales aportes de estrógenos al medio ambiente (Sumpter y Johnson, 2005a; Tyler *et al.*, 2005) y, el EE₂, no es completamente eliminado por los tratamientos convencionales que reciben estos efluentes (Andersen *et al.*, 2003). Para remover este tipo de compuestos, se necesitan complejos y costosos sistemas de tratamiento de aguas residuales, tanto desde el punto de vista tecnológico como operacional (Shammas, 2007). A pesar de que comúnmente no se empleen tanto en Argentina como en muchos otros países del mundo, las tecnologías que permiten tratar este tipo de compuestos incluyen la ozonización, la biodegradación (bacterias, microalgas y enzimas) y la retención a través de carbón activado o membranas (Lai *et al.*, 2000; Johnson y Sumpter, 2001; Shammas, 2007; Silva *et al.*, 2012). En los últimos años, también se han estudiado tratamientos de aguas utilizando los denominados Procesos de Oxidación Avanzados (del inglés, *Advanced Oxidation Processes*), tales como fotólisis con UV, fotocátalisis, combinación de UV con oxidantes fuertes, fotodegradación y sonólisis (ultrasonido) (Zhang *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Cédât *et al.*, 2016; Sornalingam *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos de estos tratamientos oxidativos tienen el potencial de generar sub-productos con actividad estrogénica (Pereira *et al.*, 2011).

La presencia del EE₂ en el ambiente acuático ha sido detectada en concentraciones biológicamente activas (Nash *et al.*, 2004; Hannah *et al.*, 2009; Aris *et al.*, 2014). En estas concentraciones se ha visto que afecta el desarrollo de los peces (Larsson *et al.*, 1999), que son considerados como uno de los organismos de mayor riesgo ante los EDCs (Scholz y Mayer, 2008). En este sentido, se han documentado los efectos del EE₂ sobre los caracteres sexuales secundarios, el desarrollo gonadal y/o la inducción de vitelogenina e intersexos en distintas especies de peces, tales como *Gambusia affinis* (Angus *et al.*, 2005), *Pimephales promelas* (van Aerle *et al.*, 2002; Pawlowski *et al.*, 2004; Filby *et al.*, 2007), *Oncorhynchus mykiss* (Brown *et al.*, 2008), *Sparus aurata* (Cabas *et al.*, 2011), *Danio rerio* (Fenske *et al.*, 2001; Colman *et al.*, 2009), *Cyprinodon variegatus* (Denslow *et al.*, 2001). Estos efectos son tan severos que puede llevar inclusive a producir el colapso

de poblaciones de peces (Kidd *et al.*, 2007). Tanto es así que Bogers *et al.* (2006) incorporó el uso del EE₂ como control positivo para desarrollar una ampliación del bioensayo de toxicidad crónica sobre las etapas tempranas del ciclo de vida de los peces, propuesto por la OECD (1992, 2004). Por todo lo mencionado anteriormente, se consideró la utilización de este compuesto como tóxico de referencia para evaluar el efecto de compuestos con acción estrogénica sobre el desarrollo gonadal y los caracteres sexuales secundarios de *C. decemmaculatus* evaluados en este estudio.

Hipótesis

El EE₂, perturbador endocrino con actividad estrogénica, altera la morfología de la aleta anal, la diferenciación gonadal y la proporción de sexos en juveniles de Cnesterodon decemmaculatus expuestos desde las primeras etapas de su desarrollo.

Objetivo

- Evaluar el efecto crónico del EE₂, sobre la morfología de la aleta anal, las gónadas y la proporción de sexos en ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos desde etapas tempranas del desarrollo.

Materiales y métodos

Organismos

Se utilizaron individuos de *C. decemmaculatus* fenotípicamente indiferenciados de 0 a 4 días de edad, siguiendo los criterios establecidos en el Capítulo N°1. Estos peces fueron obtenidos del acuario establecido en el Sector de Ecotoxicología del Laboratorio de Transformación de Residuos (IMYZA-INTA).

Reactivos

En este capítulo, se utilizaron los siguientes reactivos: 17 α -etinilestradiol (CAS N° 57-63-6; Parafarm® 99% de pureza; Droguería Saporiti), [¹³C]-17 α -etinilestradiol (99% pureza; Cambridge Isotope Laboratories), Benzocaína (Sigma-Aldrich), Paraplast® (Leica), Dimetilsulfóxido (DMSO), bálsamo de Canadá, parafina con punto de fusión 56-58 °C, eosina, hematoxilina y ácido pícrico (Biopack).

Exposición a EE₂

En este experimento se intentó recrear una condición similar a la de ambientes naturales, en donde la descarga de los efluentes que contienen compuestos estrogénicos se realiza de manera continua. Para ello, se realizaron cuatro tratamientos: tres concentraciones nominales de EE₂ (30, 100 y 300 ng/L) disueltas en DMSO y un grupo control con este solvente. La concentración final de DMSO en todos los tratamientos fue de 0,0025%. Las concentraciones de EE₂ se seleccionaron de acuerdo a los valores detectados por Valdés *et al.* (2015) para aguas superficiales y efluentes en la Provincia de Buenos Aires. El experimento se realizó en peceras de 40 L con 50 peces en cada una. Los animales estuvieron expuestos durante 94 días bajo condiciones controladas de laboratorio en una sala utilizada para bioensayos de toxicidad, la cual se mantuvo a una temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperiodo (16L:8O). Conociendo la vida media del EE₂ en las condiciones experimentales, cada 48 h se agregó el volumen de solución madre de EE₂ correspondiente para llevar nuevamente los valores a las concentraciones nominales.

Los tiempos de exposición se establecieron teniendo en cuenta distintos factores: 1) los tiempos que tarda el desarrollo gonadal en esta especie, y 2) que las descargas de efluentes cloacales sobre aguas superficiales son continuas y que los peces no migratorios se encuentran expuestos por largos períodos.

Todos los procedimientos se realizaron bajo avales del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA. Los residuos químicos y biológicos se descartaron como residuos especiales y patogénicos respectivamente, los cuales fueron colectados por una empresa encargada de su tratamiento.

Parámetros de condición general y caracteres sexuales secundarios

Se midieron parámetros de condición general y la morfología de la aleta anal, así como también se registraron las observaciones morfológicas externas. La proporción de fenotipos sexuales se determinó según los criterios establecidos en la Tabla 5, Capítulo N°1 de la presente tesis.

Con los datos obtenidos, se calcularon los índices gonopodial (IG), de elongación (IE), de condición (Factor *K*) y de desarrollo del gonopodio (IDG), la proporción de sexos

fenotípicos y la proporción de cada estadio de la morfogénesis del gonopodio en los machos.

Histología gonadal

Los juveniles fueron fijados en líquido de Bouin durante 24 hs a 4°C. Para facilitar la penetración del fijador se hizo una pequeña incisión ventral en el abdomen del pez. Luego fueron deshidratados en una serie de alcoholes crecientes (70-100%), pasados por xileno e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 6 µm de cada una de las muestras cada 60 µm en un micrótopo de rotación Leica (RM2125RT) y luego, los preparados se colorearon con hematoxilina y eosina.

Los preparados fueron examinados y fotografiados en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) equipado con una cámara digital (Nikon DS-Fi1). Las fotos se analizaron y procesaron usando el software NIS-Elements F 3.00.

Cuantificación de EE₂ en agua

Las concentraciones reales de EE₂ en agua se cuantificaron por cromatografía líquida de alta precisión acoplado a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Para ello, se tomaron muestras de agua cada 30 días, 24 hs después del agregado de EE₂, siendo un total de tres muestras de agua por tratamiento durante el período de exposición. Luego de extracción en fase sólida o SPE (del inglés, *Solid Phase Extraction*), de acuerdo al método publicado por Valdés *et al.* (2015). Brevemente, se filtraron 250 mL del agua usada como medio de prueba a través de una membrana de nylon con 0,45 mm de poro. A continuación, las sustancias liposolubles se extrajon usando un cartucho de 200 mg de C-18 para SPE (Oasis HLB; Waters), eluyendo con 100% metanol. Los extractos se secaron bajo una corriente saturada con nitrógeno gaseoso (N₂) y se re-suspendieron en 250 µL de metanol. Luego el EE₂ se cuantificó utilizando un sistema Thermo Scientific SurveyorTM LC junto con un Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap, equipado con una fuente de ionización *electrospray* operada en modo negativo.

La separación cromatográfica se realizó en una columna C-18 (Thermo BDS Hypersil, 3 mm, 150 mm-4,6 mm; Thermo Fisher Scientific) usando un gradiente metanol/ácido fórmico acuoso al 0,1% (85–100% en una relación de flujo 0,3 mL/min durante 15 min) como fase móvil. Se identificó al ión precursor para EE₂ como la molécula desprotonada *m/z* 295,25 y los iones producto fueron *m/z* 267,17 y *m/z* 262,25. El ión *m/z* 267,17 fue

usado para cuantificación de acuerdo con el del método estándar externo de una curva de calibración de 5 puntos. La recuperación del método se estimó por un sobreagregado de 10 µg/L del isótopo estable [¹³C]-EE₂ sobre las muestras de agua del medio de prueba. El porcentaje de recuperación fue 65% y los límites de detección y cuantificación fueron 5 ng/L y 17 ng/L, respectivamente.

Análisis de datos

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para testear los efectos inducidos por la exposición a EE₂ sobre el largo estándar, peso corporal, factor de condición, R4, R6, índice de elongación, índice gonopodial, largo de la cabeza, índice cefálico e índice de desarrollo del gonopodio, luego de la prueba de los supuestos de normalidad y homocedasticidad usando el test de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Cuando los efectos fueron significativos, se realizó la prueba de Dunnet para estimar diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos con EE₂ respecto del control. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software Prism 5.1 para Windows (GraphPad Software®).

Resultados

Concentraciones de EE₂ en el agua

Los valores promedio de las concentraciones de EE₂ medidas en el agua, se muestran en la Tabla 9. Las concentraciones reales se mantuvieron cercanas a las nominales

Tabla 9. Media (\pm desviación estándar) de las concentraciones de EE₂ medidas en el agua de cada tratamiento ($n = 3$).

Concentración nominal	Concentración medida (ng/L)
Control DMSO	ND
30 ng/L	32,3 \pm 0,2
100 ng/L	99,1 \pm 3,2
300 ng/L	296,2 \pm 10,7

ND: concentración no detectable

Mortalidad

Durante el ensayo se observaron efectos dependientes de la dosis en la mortalidad. El porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la concentración de EE₂ al finalizar los 94 días de exposición, se muestra en la Figura 57. Se estimó la CL₅₀ del EE₂ en 109,9 ng/L, con un intervalo de confianza del 95% de 61,63 y 196,00 para los límites inferior y superior, respectivamente. La mortalidad registrada en los controles con DMSO fue de 30 % al finalizar el experimento.

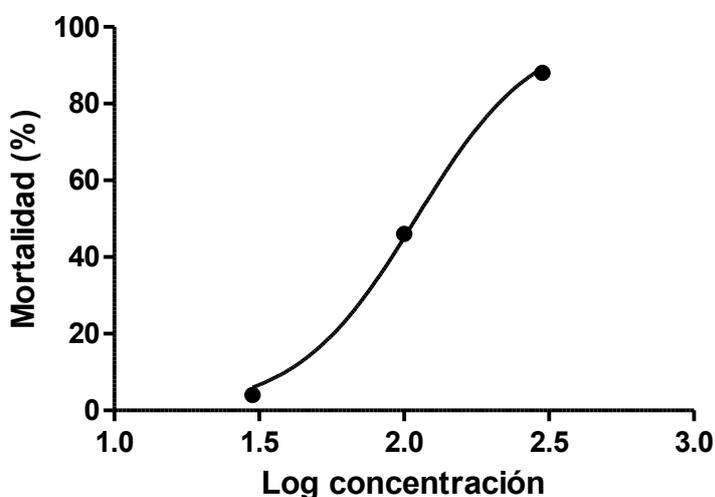


Figura 57. Porcentaje de mortalidad observada en función del logaritmo de la concentración de EE₂ luego de 94 días de exposición.

Parámetros de condición general y caracteres sexuales secundarios

Largo estándar y peso corporal, discriminado por fenotipo sexual

La respuesta del LE y el peso en función de la concentración de EE₂ se muestra en la Figura 58. Se observó un aumento significativo en el largo estándar y el peso corporal de los individuos sexualmente indiferenciados expuestos a 100 ng/L de EE₂, respecto del tratamiento control ($p < 0,001$). Aunque se observa una tendencia a la disminución en LE y peso, reflejada principalmente en las hembras, ésta no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En el caso de los machos, no se observó ningún efecto para ninguno de los parámetros.

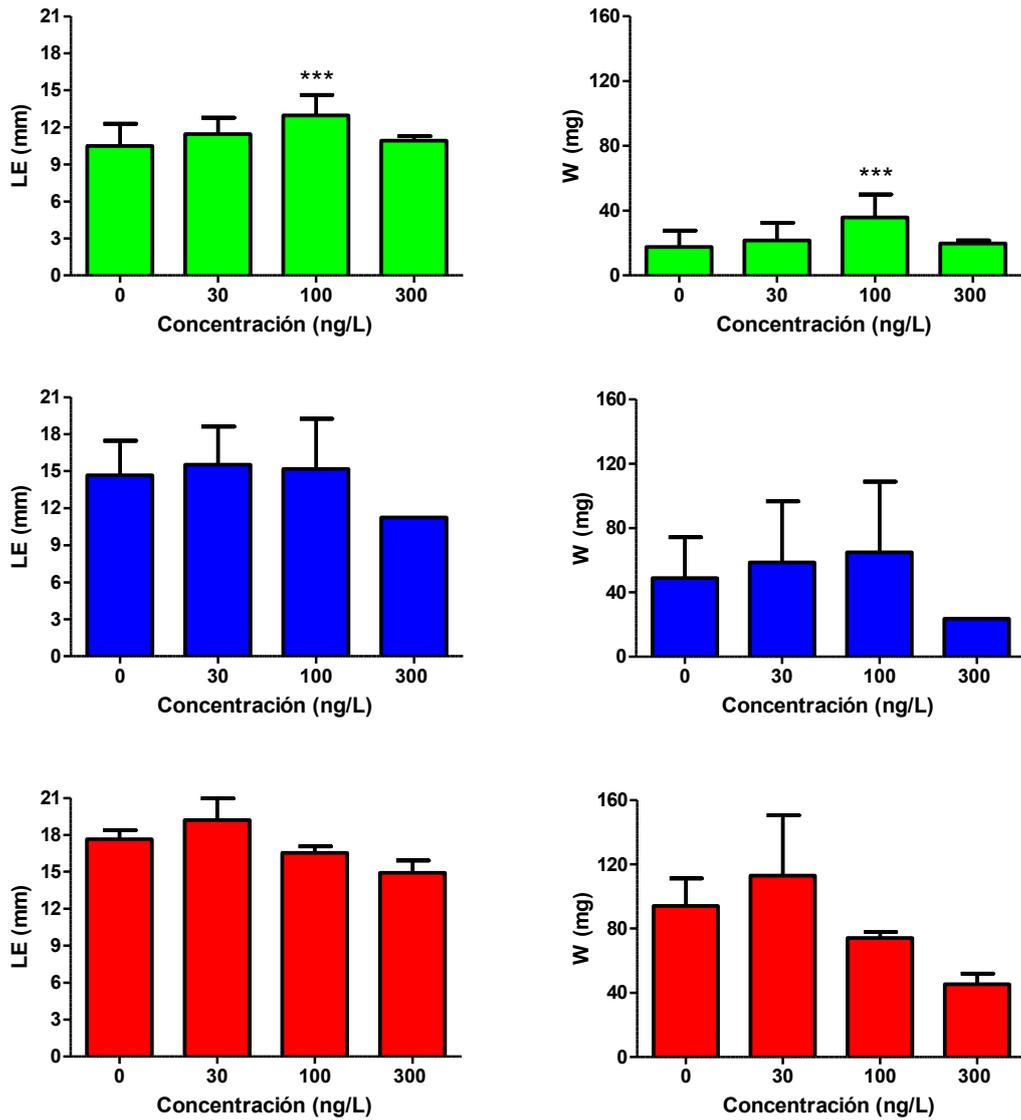


Figura 58. Largo estándar (LE) y peso corporal (W) en función de la concentración de EE₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. *** $p < 0,001$.

Índice de condición, discriminado por fenotipo sexual

Se observó un aumento en el índice de condición de los ejemplares sexualmente indiferenciados ($p < 0,01$) y del fenotipo macho ($p < 0,05$) en el tratamiento de 100 ng/L de EE₂, respecto del tratamiento control (Figura 59). No se observó ningún efecto en el caso de las hembras.

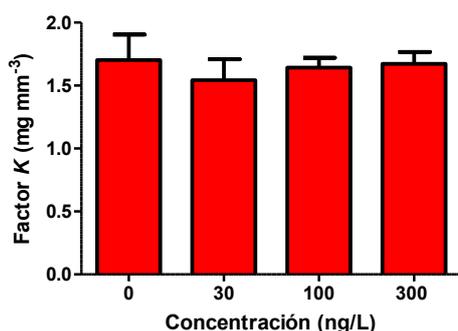
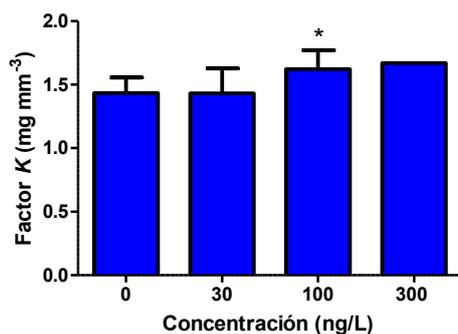
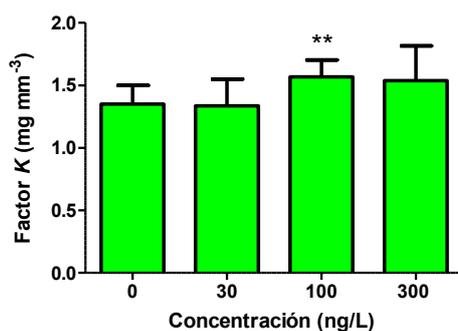


Figura 59. Índice de condición (Factor K) en función de la concentración de EE₂ para cada fenotipo sexual: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Longitud del radio 4 y 6 de la aleta anal, discriminado por fenotipo sexual

Se observó un aumento significativo en las longitudes del radio 4 y del radio 6 de la aleta anal de los individuos sexualmente indiferenciados del tratamiento 100 ng/L de EE₂, respecto del tratamiento control ($p < 0,001$). También se registró un aumento en la longitud del radio 4 ($p < 0,01$) y del radio 6 ($p < 0,05$) de la aleta anal de los ejemplares de fenotipo hembra del tratamiento 30 ng/L de EE₂, respecto del tratamiento control (Figura 60).

Mientras que se registró una disminución en la longitud del radio 6 en las hembras expuestas a 300 ng/L ($p < 0,01$).

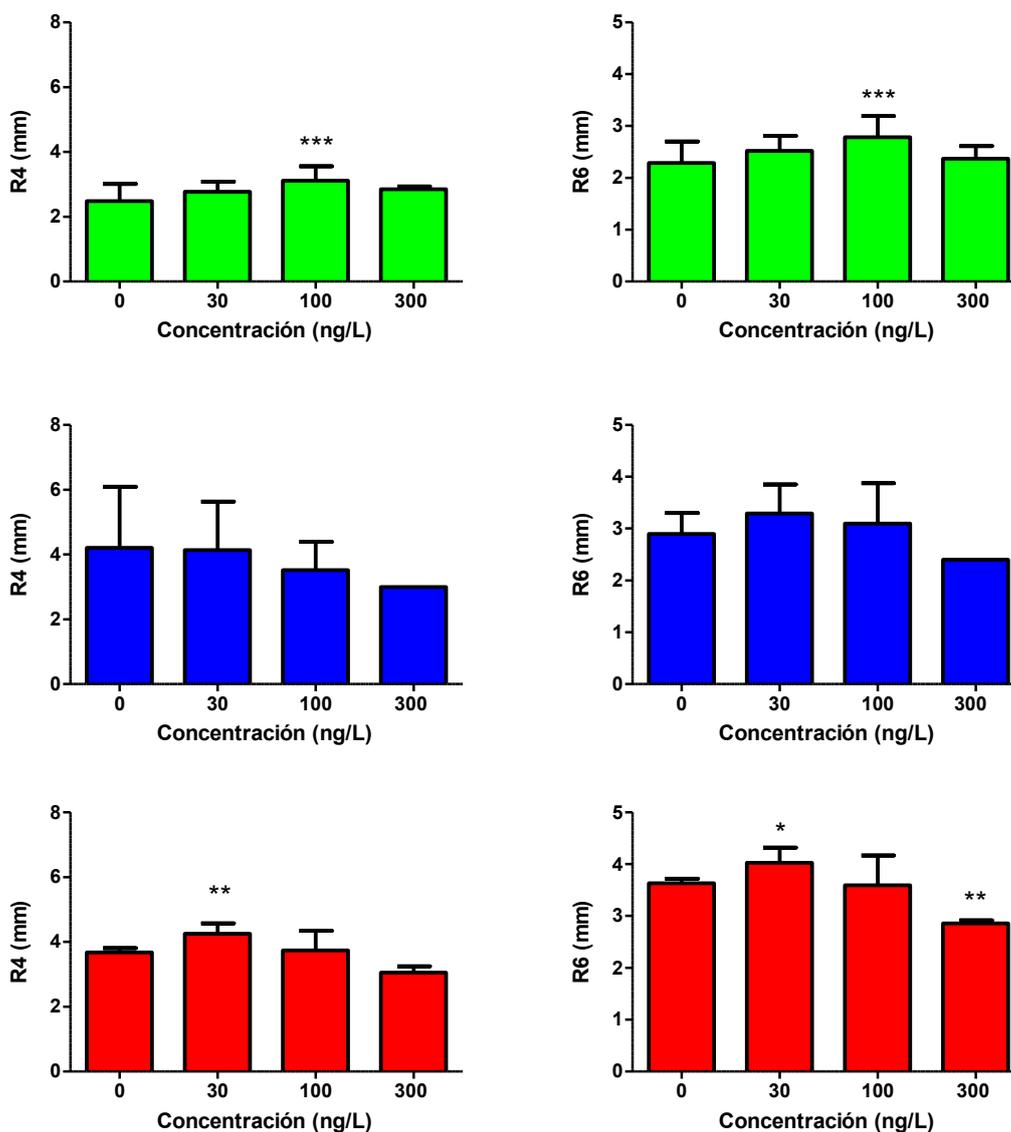


Figura 60. Longitud del radio 4 (R4) y 6 (R6) de la aleta anal en función de la concentración de EE₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Índice gonopodial, índice de elongación e índice de desarrollo del gonopodio, discriminado por fenotipo sexual

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de EE₂ con respecto al control para ninguno de los índices evaluados, excepto para el IE de hembras expuestas a 30 ng/L (Figura 61). Sin embargo, aunque en machos pareciera haber

una reducción de los valores de IG e IE en función de la concentración, la variabilidad obtenida en los ejemplares del control no permitió evidenciar diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos. Esto se debe a que en el control se obtuvieron machos en todos los estadios de desarrollo del gonopodio, mientras que en los tratamientos con EE₂ se obtuvieron menos cantidad de machos y con un gonopodio menos elongado.

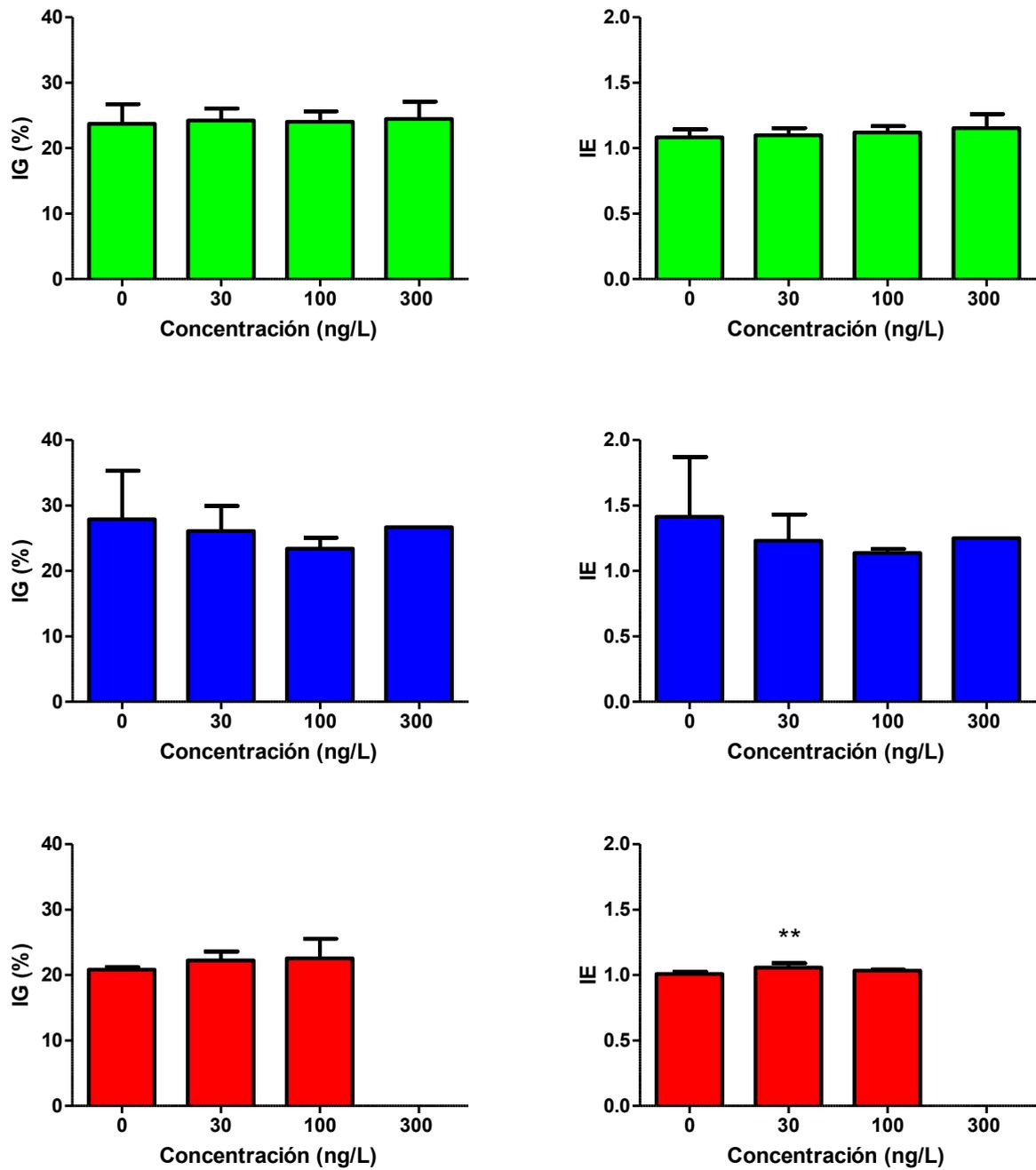


Figura 61. Índice gonopodial (IG) e índice de elongación (IE) en función de la concentración de EE₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. ** $p < 0,01$.

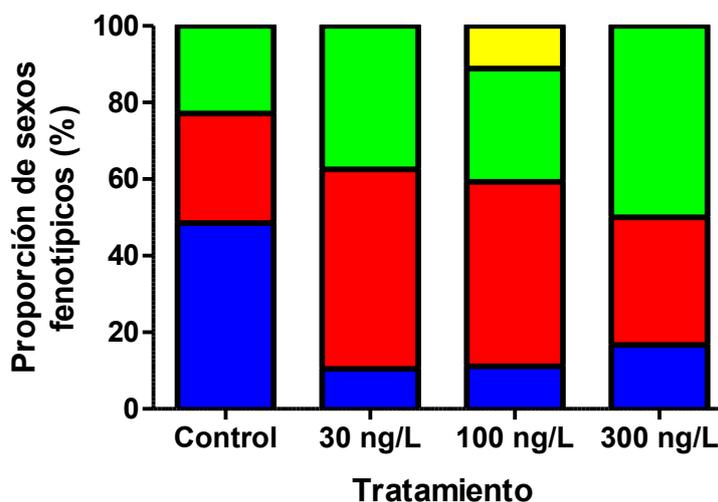
Proporción de fenotipos sexuales

Se observaron efectos dependientes de la concentración en la proporción de fenotipos sexuales. El porcentaje de fenotipos macho se redujo en todos los tratamientos con EE₂,

respecto del control. Por otro lado, la proporción del fenotipo correspondiente a hembras se incrementó en las concentraciones intermedias mientras que el número de individuos indiferenciados aumentó en relación con la dosis (Figura 62).

Por otro lado, se encontraron individuos con un fenotipo que denominamos atípico debido a que sus características morfométricas no se ajustaron a los criterios establecidos en el Capítulo N°1 de la presente tesis.

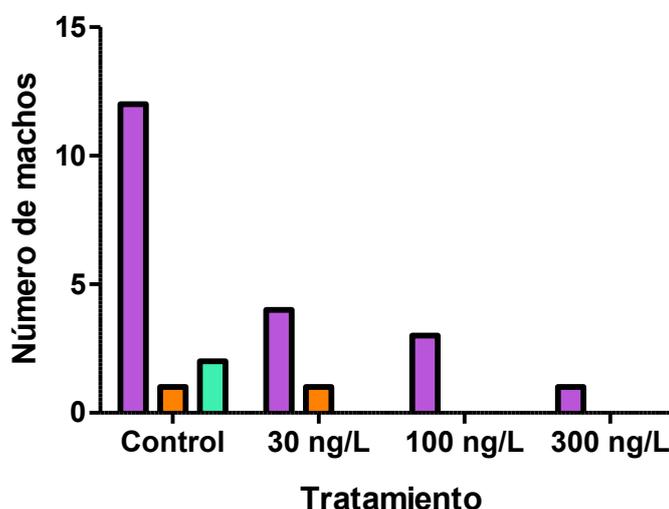
Figura 62. Proporción de sexos fenotípicos en función de la concentración de EE₂.
 ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos.
 ■ hembras y ■ fenotipo atípico.



Efectos del EE₂ sobre los estadios del gonopodio

El desarrollo del gonopodio disminuyó de manera dosis-dependiente (Figura 63). Los machos alcanzaron el máximo estadio del desarrollo del gonopodio sólo en el tratamiento control. A partir de la concentración intermedia testada (100 ng/L), sólo se observaron machos en estadio 2, es decir que en estos ejemplares se observó sólo la presencia de un primordio gonopodial.

Figura 63. Número total de machos en cada estadio de desarrollo en función de la concentración de EE₂.
 ● Estadio 2; ● Estadio 3;
 ● Estadio 4.



Histología gonadal

La proporción de sexos determinada por histología gonadal en los controles fue de 58,3% de machos y 41,7% de hembras (Figura 64). Todos estos ejemplares presentaron un desarrollo gonadal normal, de acuerdo con los criterios descritos en el Capítulo N°2.

En la concentración más baja de EE₂ (30 ng/L), se encontró un aumento en la proporción de ovarios en formación (60%), así como también un 20% de los ejemplares presentaron testículos en formación. El 20% restante estaba compuesto por ejemplares con alteraciones, tanto en ovarios como en testículos. Estas alteraciones estuvieron relacionadas a cambios de la morfología de la gónada y a la presencia de hiperplasia de las células somáticas. A partir de la concentración de 100 ng/L, se observó un 40% de ejemplares con alteraciones de la histoarquitectura de las gónadas que no permitieron su diferenciación. Es decir que, en estos ejemplares, no se pudo establecer fehacientemente si los elementos observados en las gónadas pertenecían a un testículo o a un ovario. Es importante resaltar que el 100% de los ejemplares evaluados en las concentraciones más altas (100 y 300 ng/L), presentaron algún tipo de alteración en la histología gonadal.

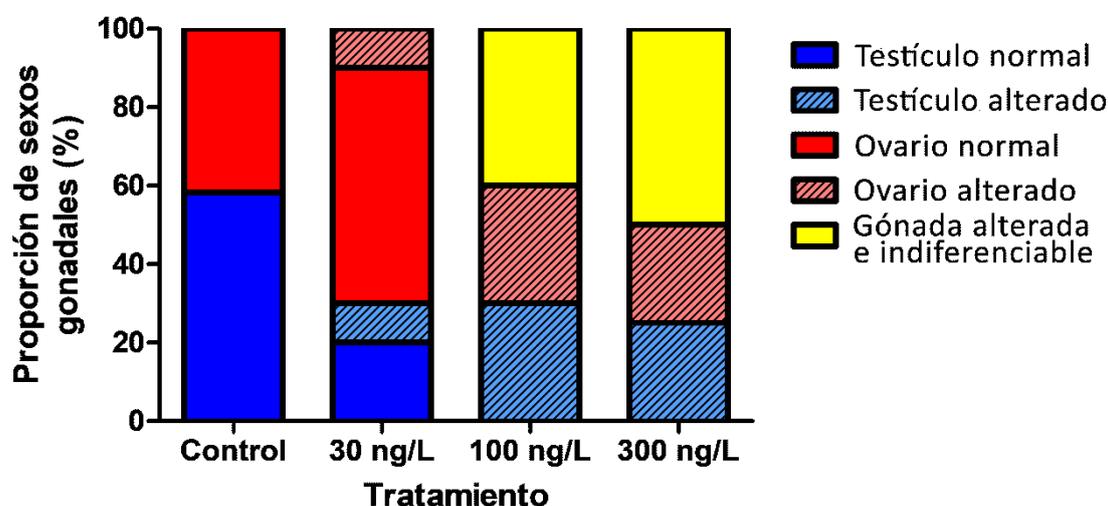


Figura 64. Proporción de sexos gonadales en función de la concentración de EE₂ al finalizar los 94 días de exposición de ejemplares en estadios tempranos de desarrollo.

En la Figura 65 se muestran imágenes representativas de testículo (A) y ovario (B) normales (sin alteraciones) de ejemplares del tratamiento control o algunos casos, expuestos a la concentración de 30 ng/L de EE₂, mientras que en las Figuras 66, 67, 68 y 69 se muestran distintos tipos de alteraciones observadas en las gónadas. Incluso en uno

de los ejemplares sexados como fenotipo macho de Estadio 2 expuesto a 100 ng/L, se encontró un ovario completamente formado. Por otro lado, la mitad de los ejemplares que presentaban gónadas alteradas e indiferenciables, habían sido sexados como fenotipo macho de Estadio 2 expuestos a 100 o 300 ng/L, mientras que la otra mitad habían sido sexados como ejemplares sexualmente indiferenciados.

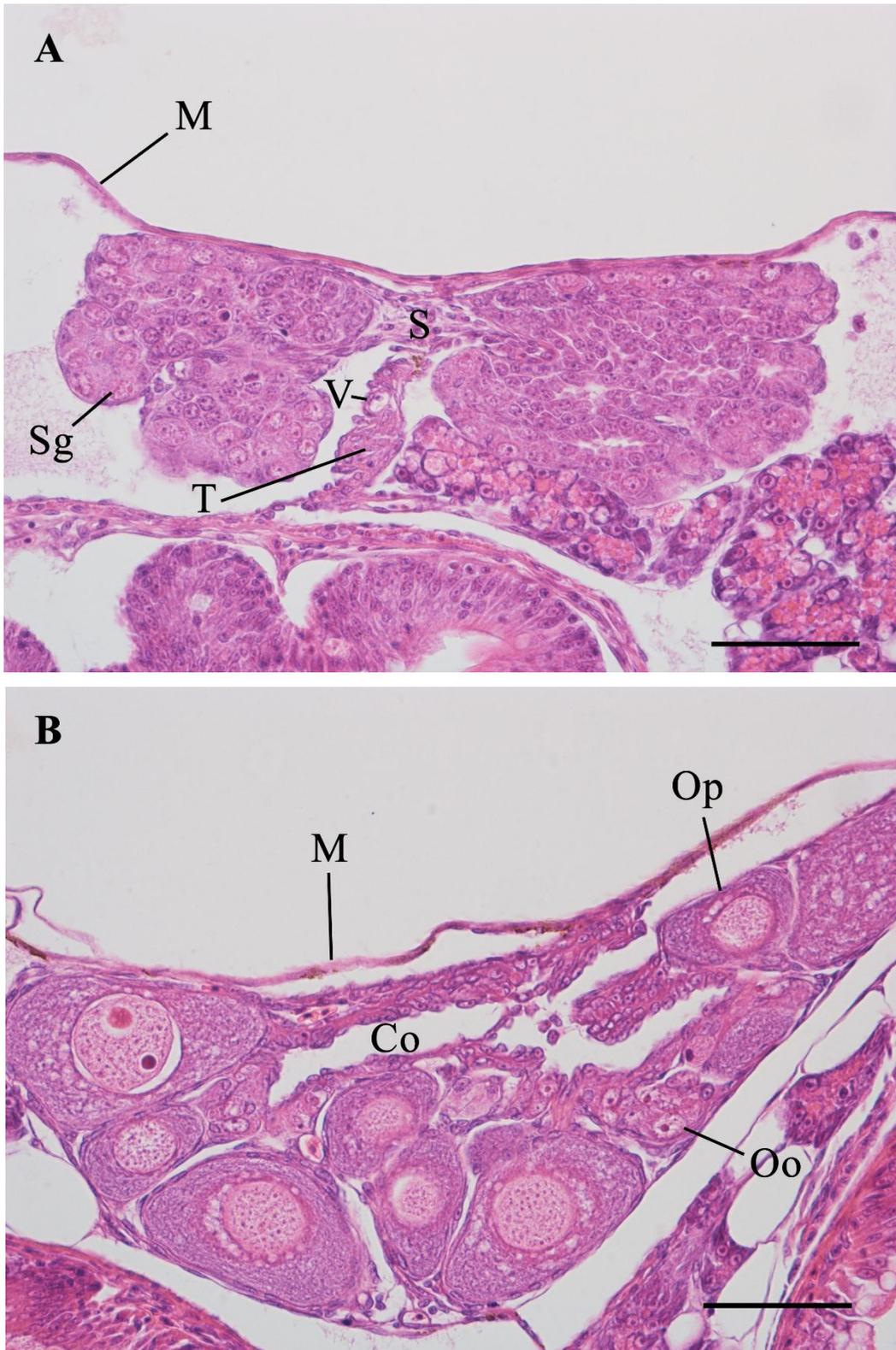


Figura 65. Histología gonadal normal (sin alteraciones) en ejemplares de *C. decemmaculatus* del tratamiento control. A: testículo de los fenotipos machos o sexualmente indiferenciados. B: ovario de los fenotipos hembras o sexualmente indiferenciados. Sg: cisto con espermatogonias; T: tabique; S: células somáticas; V: vaso sanguíneo; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio (Aumento = 40x; Barra = 50 μ m).

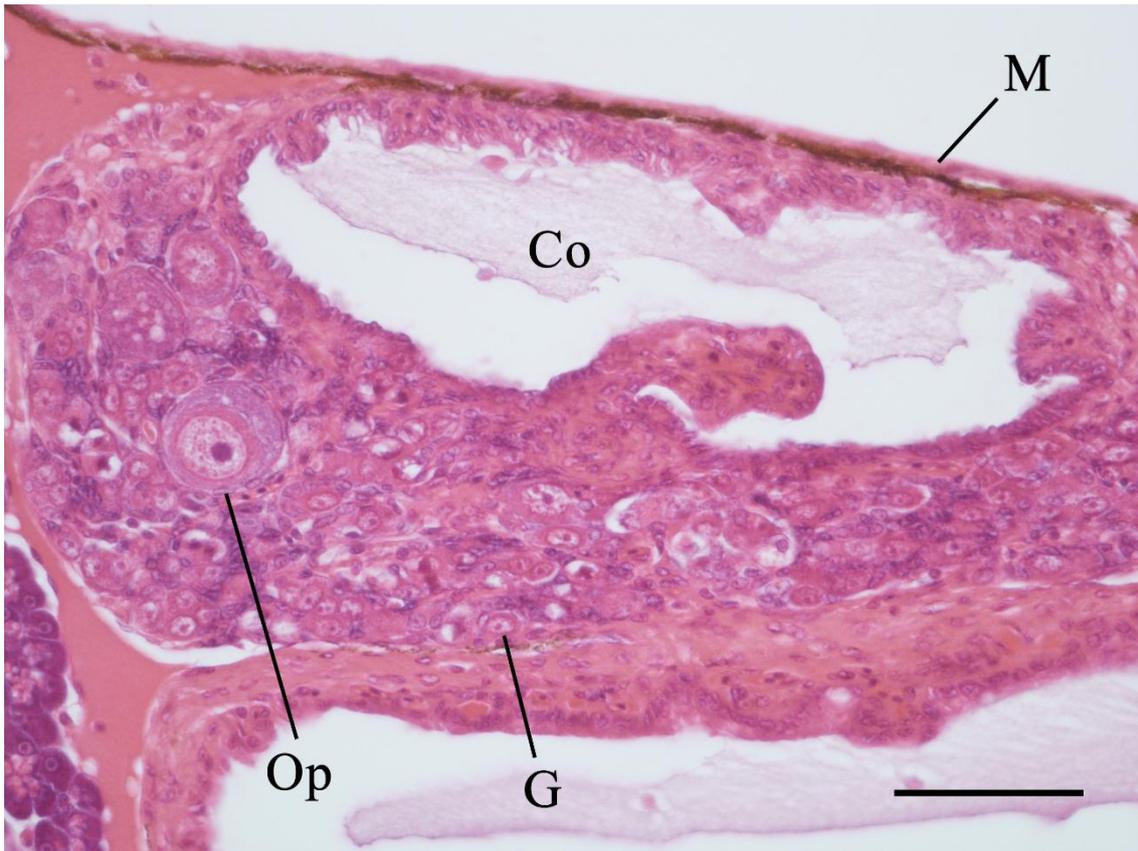


Figura 66. Histología gonadal de individuos del fenotipo sexualmente indiferenciado de *C. decemmaculatus* expuestos a 100 ng/L de EE₂, donde se observa un ovario alterado. G: gonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio (Aumento = 40x; Barra = 50 μ m).

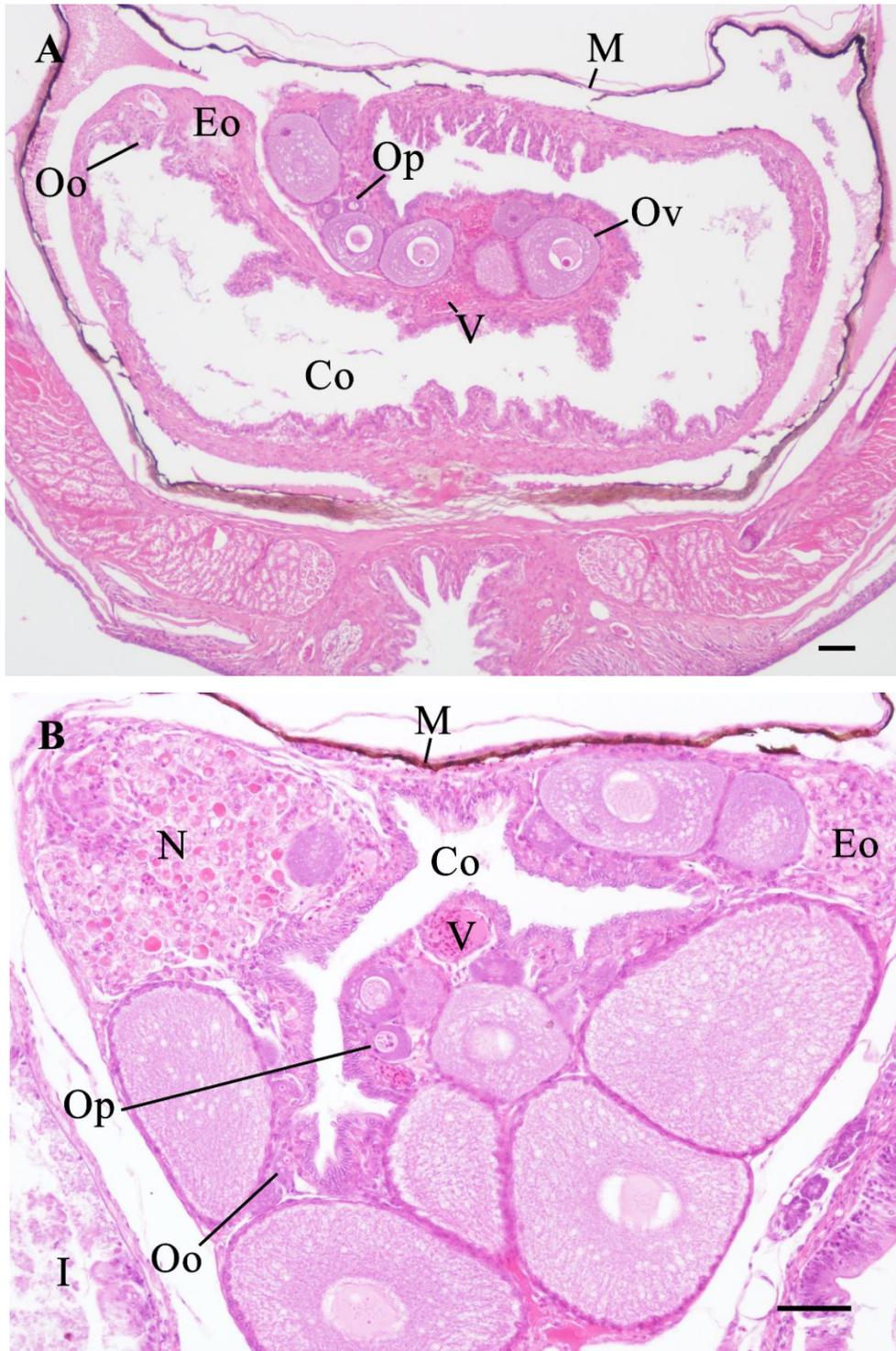


Figura 67. Histología gonadal de individuos del fenotipo hembra de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂. A: ovario alterado con hiperplasia de la cavidad ovárica en una hembra expuesta a 100 ng/L (Aumento = 10x). B: ovario alterado con tejido necrótico en una hembra expuesta a 30 ng/L (Aumento = 20x). V: vaso sanguíneo; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Ov: oocito en vitelogénesis lipídica; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio; N: tejido necrótico; Eo: estroma ovárico; I: intestino (Barra = 50 μ m).

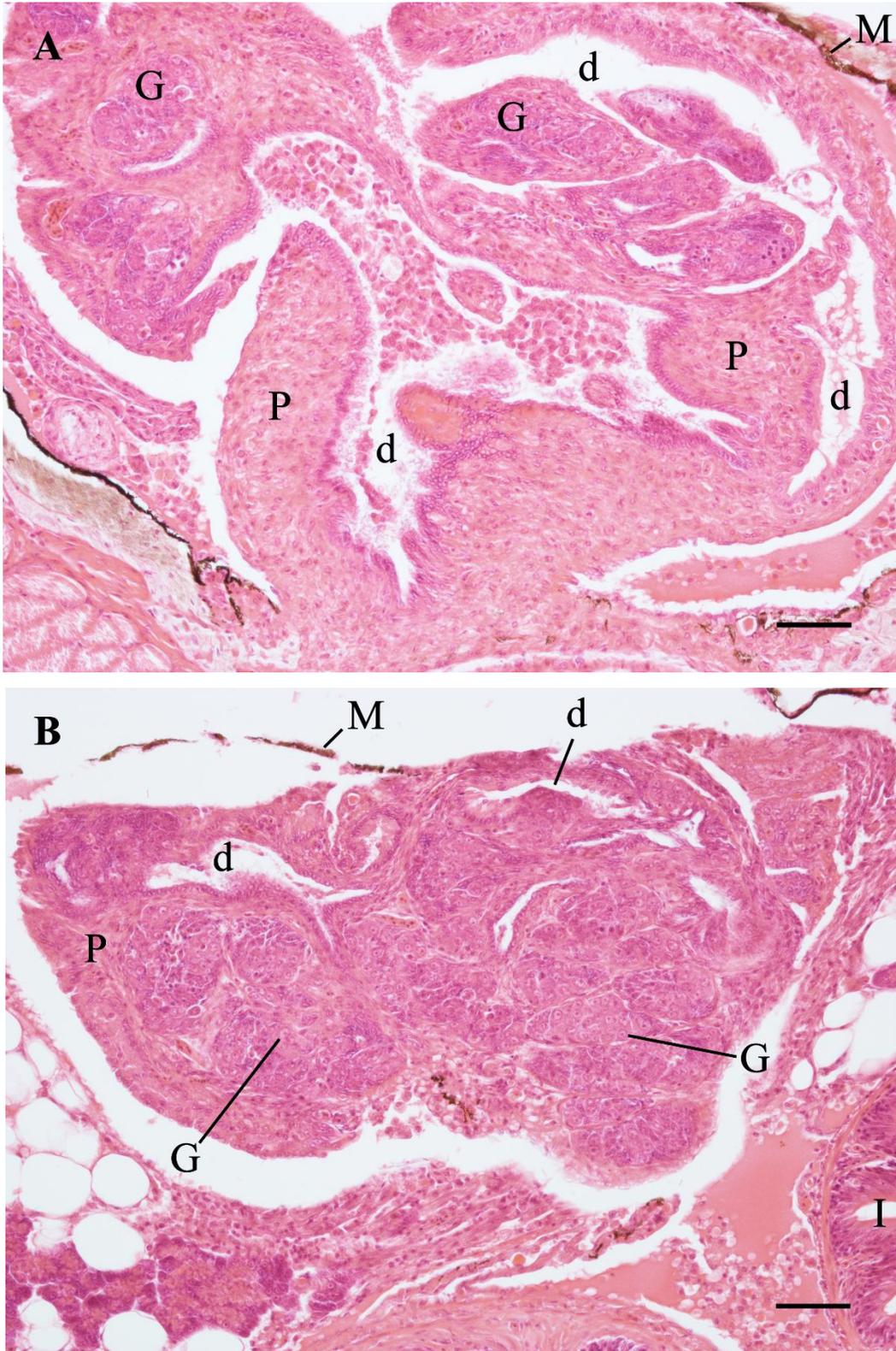


Figura 68. Histología gonadal de individuos categorizados con un fenotipo atípico expuestos a 100 ng/L de EE₂. Fenotipo atípico: características morfológicas que no se ajustaron a los criterios establecidos en el Capítulo N°1 para fenotipos normales. Se observan gónadas alteradas e indiferenciables (sin las características típicas del ovario ni del testículo). G: gonias; d: ducto; M: mesenterio; P: células del parénquima gonadal (Aumento = 20x; Barra = 50 μ m).

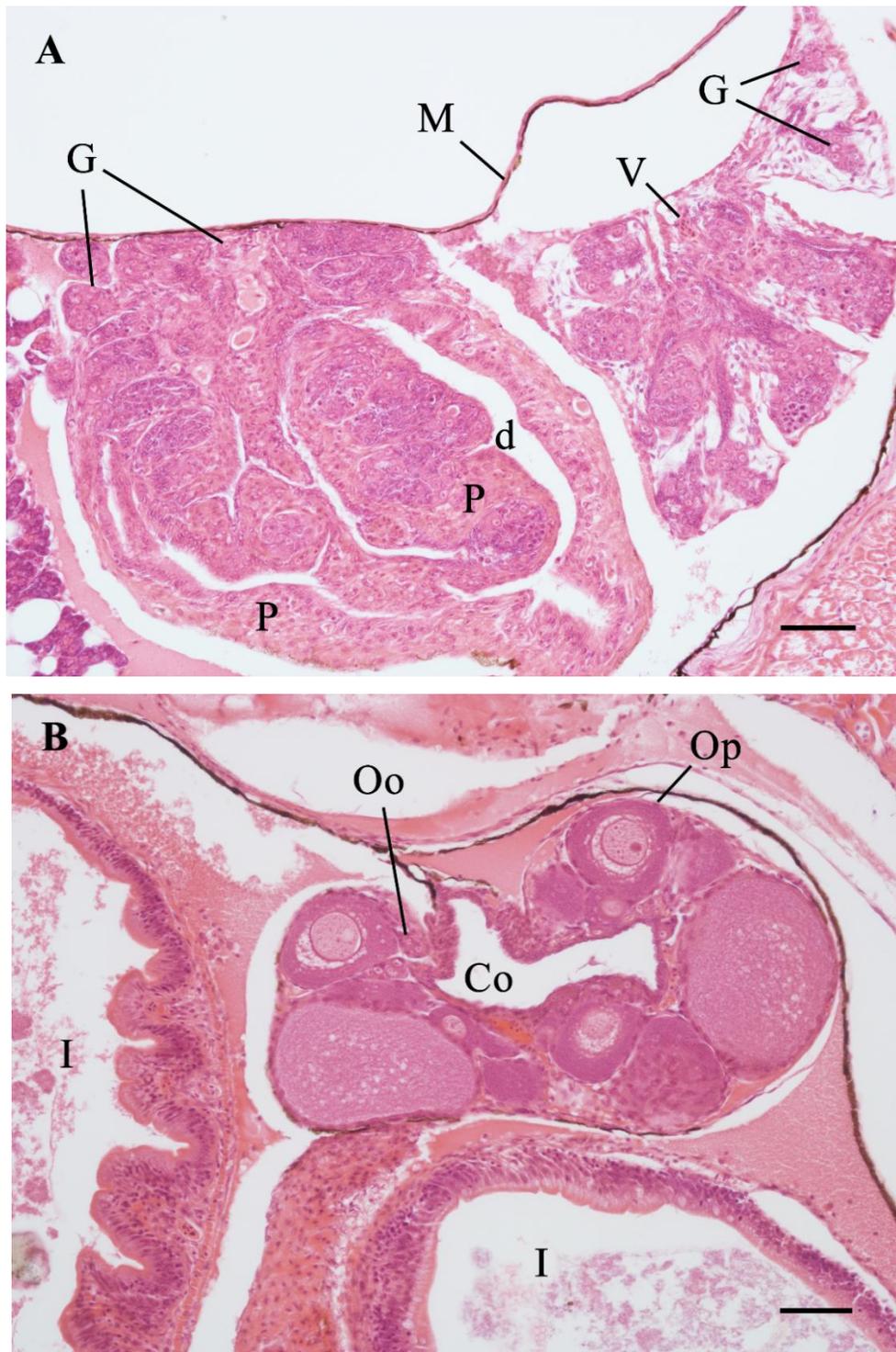


Figura 69. Histología gonadal de individuos categorizados con un fenotipo macho de *C. decemmaculatus* en Estadio 2, expuestos a 100 ng/L o 300 ng/L de EE₂. A: individuo con gónada gónadas alteradas e indiferenciables, pero con presencia de algunos cistos de espermatogonias. B: individuo con un ovario formado y se observan oocitos en distintos estadios de la oogénesis. G: gonias; V: vaso sanguíneo; d: ducto; M: mesenterio; P: células del parénquima gonadal; I: intestino; Co: cavidad ovárica; Op: oocito primario (Aumento = 20x; Barra = 50 μ m).

Pigmentación en la región perianal

Se observó la aparición de una pigmentación en la región perianal en forma concentración-dependiente en los individuos expuestos a EE₂ (Figura 70).



Figura 70. Pigmentación en la región perianal de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂. A: característica normal; B: pigmentación de individuos expuestos a EE₂.

Esta pigmentación sólo se observó en los grupos expuestos a EE₂, en proporciones de 37,5, 85,2 y 100% para las concentraciones de 30, 100 y 300 ng/L respectivamente (Figura 71). Con estos datos, se estimó una CE₅₀₋₁₃ semanas de 39,26 ng/L de EE₂, con un intervalo de confianza del 95% de 23,49 y 65,60 ng/L para los límites inferior y superior, respectivamente. En el tratamiento de 30 ng/L, se registró que un 61, 60 y 15% de los ejemplares con fenotipo sexualmente indiferenciado, macho y hembra presentaban esta pigmentación, respectivamente. En el tratamiento de 100 ng/L, se registró en un 95, 100 y 100% de los ejemplares sexualmente indiferenciados, machos y hembras,

respectivamente. Mientras que a partir de los 300 ng/L de EE₂, todos los ejemplares presentaron esta pigmentación.

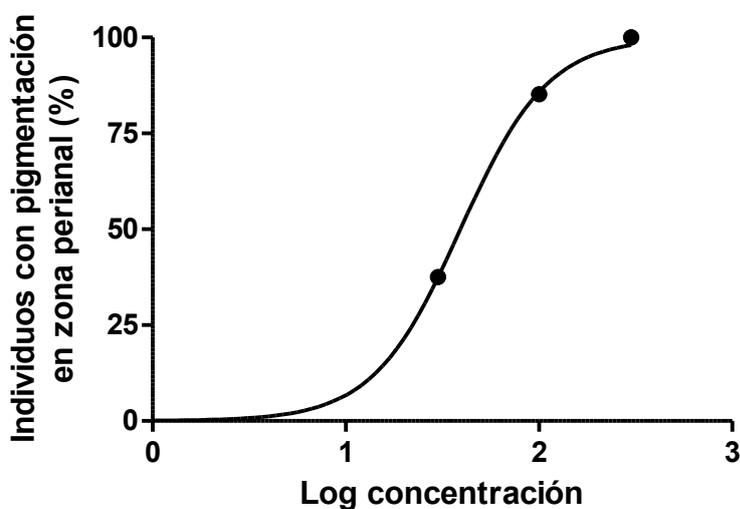


Figura 71. Porcentaje de individuos con pigmentación de la región perianal en función de la concentración de EE₂ al finalizar los 94 días de exposición.

Discusión

Los poecílicos norteamericanos han sido ampliamente utilizados para evaluar efectos inducidos por EDCs, sin embargo, hasta el inicio de esta tesis, no se hallaron trabajos publicados que utilicen a *Cnesterodon decemmaculatus* u otro poecílido sudamericano para evaluar tales efectos.

La tasa espontánea de mortalidad observada (grupo control) al cabo de 3 meses fue similar a lo publicado por Angus *et al.* (2005), utilizando juveniles de *Gambusia affinis* en experimentos de 150 días. Del mismo modo, en experimentos de 90 días de duración realizados con *Danio rerio*, se observó una mortalidad similar en el grupo control (Xu *et al.*, 2008). Por otra parte, se observó que la exposición a EE₂ indujo una mortalidad superior a la observada en los controles en una relación concentración-dependiente, mostrando que niveles de éste compuesto mayores a 100 ng/L resultan letales para juveniles de *C. decemmaculatus*. Un efecto semejante fue observado en experimentos con ejemplares en estadios tempranos del desarrollo en *Danio rerio*, a partir de 2 ng/L de EE₂ (Xu *et al.*, 2008). Sin embargo, no se han encontrado trabajos que describan cuales son los mecanismos de acción asociados a dicho efecto.

En cuanto a los efectos subletales, los experimentos realizados demuestran que el EE₂ es capaz de alterar la proporción de sexos, la histología gonadal, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y el crecimiento de los peces en forma concentración-dependiente. Dado que es sabido que el proceso de diferenciación sexual es dependiente del balance entre los niveles de andrógenos y estrógenos, los resultados sugerirían que el EE₂, por su acción como agonista superactivo de los receptores de estrógenos, sería capaz de alterar dicho balance y estaría modificando el perfil de expresión de genes en tejidos sensibles a la acción de las hormonas sexuales, de una forma pleiotrópica, tejido- y sexo-dependiente (Filby *et al.*, 2007). En particular, se ha demostrado que los estrógenos tienen la capacidad de alterar el desarrollo normal del testículo, produciendo una inhibición de los genes involucrados en el desarrollo testicular e induciendo la expresión de genes involucrados en el desarrollo ovárico (Guiguen *et al.*, 2010; Díaz y Piferrer, 2017).

En cuanto a la proporción de sexos, se registró una disminución en el porcentaje de machos y un aumento el porcentaje de ejemplares sexualmente indiferenciados y de hembras a partir de la concentración más baja ensayada. Un efecto semejante fue observado en *D. rerio* y en *Oryzias latipes* expuestos desde etapas tempranas del desarrollo a EE₂ durante 90 (Xu *et al.*, 2008) y 60 días (Örn *et al.*, 2006), respectivamente. En ambos estudios, se encontró que este xenoestrógeno indujo un aumento de la proporción de hembras. Por otra parte, Andersen *et al.* (2003) encontraron feminización completa cuando ejemplares de *D. rerio* fueron expuestos a 15 ng/L de EE₂ desde la eclosión hasta el día 60 de vida. En medaka (*O. latipes*), se observó que la exposición a 10 y 100 ng/L durante 60 días indujo la formación de intersexos (Örn *et al.*, 2006). En este estudio, se observaron gónadas alteradas e indiferenciables, cuya estructura histológica no se correspondió con la morfología típica de un testículo o un ovario. Por otra parte, algunos individuos que presentaban caracteres sexuales externos típicos de machos en el Estadio 2 (es decir con un primordio gonopodial), mostraron o bien un ovario completamente formado o gónadas totalmente alteradas e indiferenciables. De un modo semejante, Xu *et al.* (2008) registraron un aumento en la proporción de ejemplares de *D. rerio* con gónadas alteradas a tal punto que no les permitieron discernir si se trataba de machos o hembras, a partir de 2 ng/L de EE₂.

Por otra parte, en las hembras presuntivas de *C. decemmaculatus*, el EE₂ también indujo una alteración de la histoarquitectura gonadal, caracterizado por una proliferación de células somáticas y gonias, así como también necrosis celular. Es sabido que los estrógenos son mitogénicos y se comprobó que, en mamíferos, inducen tumores en el

ovario y en la glándula mamaria (Hall y Korach, 2003). Además, en este grupo de vertebrados tienen una participación en la proliferación del estroma ovárico (Britt *et al.*, 2004; Pask, 2012). En particular, en peces el estradiol participa de la morfogénesis del ovario (Nakamura, 2010; Kobayashi *et al.*, 2013), que concuerda con el momento en que ocurre una proliferación de células somáticas que generan el cierre de la cavidad ovárica (Ito *et al.*, 2005) y un aumento de la expresión de aromatasa gonadal (Fernandino *et al.*, 2008a). A su vez, dicha proliferación se observa, tanto en testículos alterados de machos fenotípicos como en ejemplares con gónadas alteradas e indiferenciables. A pesar de no haber encontrado intersexos en poecílicos expuestos a estrógenos, existe un sólo estudio que ha documentado la capacidad de los andrógenos de inducir este efecto en hembras juveniles de *G. affinis* expuestas a 17 β -trembolona (Sone *et al.*, 2005). Mientras que este sería el primer trabajo en el que se documenta que un estrógeno posee la capacidad de feminizar completamente una gónada de presuntivos machos en poecílicos, así como también de inducir un cambio en la histoarquitectura gonadal a tal punto que no permita diferenciar si corresponde a un ovario o un testículo, otorgando especial relevancia a los resultados hallados obtenidos.

Otro de los aspectos más relevantes fue la disminución concentración-dependiente de machos en estadios avanzados del desarrollo del gonopodio. En este sentido, cabe resaltar que sólo en el tratamiento control se observaron machos que alcanzaron el máximo estadio del desarrollo del gonopodio. Estos resultados concuerdan con las evidencias documentadas por Angus *et al.* (2005), quienes demostraron que EE₂ tiene la capacidad de inhibir el desarrollo del gonopodio de *Gambusia affinis*. En el mismo sentido, diversos autores demostraron que los compuestos estrogénicos son capaces de alterar el desarrollo normal del gonopodio de *G. affinis* y *holbrooki*, tanto en condiciones controladas de laboratorio como en ambientes naturales, y por ello, sugieren que la reducción de la longitud del gonopodio en relación al largo del cuerpo, o el peso, podría ser un biomarcador morfológico de utilidad para evaluar exposiciones a este tipo de sustancias en poecílicos (Batty y Lim, 1999; Doyle y Lim, 2002; Angus *et al.*, 2005; Game *et al.*, 2006).

En otros poecílicos se sabe que durante el período de diferenciación sexual, los caracteres sexuales secundarios son inducidos por los esteroides sexuales secretados por las gónadas (Ogino *et al.*, 2018). Los resultados aquí obtenidos se corresponden con estos datos ya que se han encontrado gónadas feminizadas en machos presuntivos y ovarios con morfología alterada en hembras presuntivas de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂. Por

otra parte, también se hallaron ejemplares con caracteres fenotípicos atípicos (caracteres externos que no se ajustaron a los criterios establecidos en el Capítulo N°1 para discriminar entre fenotipos y gónadas alteradas que no se asocian a las características típicas de ovarios o testículos). Integrando estos resultados con los antecedentes científicos publicados hasta la fecha, podemos hipotetizar que algunos aspectos del proceso de diferenciación sexual pueden ser alterados por compuestos estrogénicos, mientras que otros se encuentran determinados genéticamente debido a que en el momento del nacimiento un 50% de los animales tenían un ovario ya diferenciado y un 50% un testículo (Ver Capítulo N°2).

El crecimiento también se vió afectado por la exposición a EE₂ que indujo un aumento de la talla y el peso corporal sólo en ejemplares que no presentaron caracteres sexuales secundarios diferenciados. Así como se mencionó en los capítulos anteriores, el desarrollo sexual de *C. decemmaculatus* se encuentra altamente asociado al crecimiento en condiciones normales. Sin embargo, la exposición al EE₂ indujo una mayor proporción de individuos fenotípicamente indiferenciados que continuaron creciendo, lo cual implica un retraso en la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios. Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente por Ihnat y Fernandes (1996) y Terzich *et al.* (2000). Ihnat y Fernandes (1996) hallaron que el EE₂, no sólo feminiza la gónada masculina, sino que también genera un retraso en el proceso de diferenciación sexual del salmónido *Thymallus thymallus*. En el mismo sentido, Terzich *et al.* (2000) documentaron que EE₂ induce un retraso en el tiempo en el cual el poecílido *Heterandria formosa* alcanza la madurez sexual.

Una observación llamativa e inesperada fue la aparición de una pigmentación externa en la zona perianal característica sólo de aquellos ejemplares expuestos a EE₂, y que mostró una clara relación de tipo concentración-respuesta. Tal característica fue observada también en ejemplares que habitan en ambientes naturales de la Provincia de Buenos Aires, impactados por compuestos estrogénicos (Ver Anexo N°2). Es sabido que los vertebrados tienen un sistema bien desarrollado de células que contienen pigmentos (principalmente melanina), distribuidas en varios órganos (hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, piel, timo y gónadas) y tejidos (meninges y tejido conectivo que rodean los vasos sanguíneos) (Scalia *et al.*, 1988; Gallone *et al.*, 2002; Zieri *et al.*, 2007). Los distintos grupos de vertebrados presentan melanóforos (denominados melanocitos en aves y mamíferos) similares, tanto en forma y tamaño como en su respuesta a hormonas o formación de melanosomas (organelas que producen melanina) (Bagnara y Matsumoto,

2007). Algunos vertebrados, como peces, anfibios y reptiles, poseen un grupo abundante de células que contienen melanina y que están dispersas en el sistema retículo-endotelial, el cual forma una matriz de soporte de tejidos hematopoyéticos, principalmente en el riñón y el bazo (Thorsen *et al.*, 2006; Leknes, 2007). Cabe resaltar que dentro del grupo de células que contienen melanina, principalmente se diferencia entre aquellas que forman el sistema de pigmentación extracutáneo (como los macrófagos pigmentados) y los melanóforos de la epidermis, de otras células pigmentadas (Sichel *et al.*, 1997).

En cuanto a los mecanismos de acción por los cuales se induce la síntesis de melanina (melanogénesis), el principal está mediado por la hormona estimuladora de melanocitos, α -MSH (del inglés, *Melanocyte-Stimulating Hormone*), que actúa vía cAMP acoplado al receptor MC1 (MC1R) en los melanocitos para activar tirosinasa (Figura 72; Thody, 1999). La tirosinasa es la enzima que cataliza la síntesis de melanina (García-Borrón y Solano, 2002; Lai *et al.*, 2018). A su vez, α -MSH regula la dispersión de melanosomas desde los melanóforos (-citos) epidérmicos hacia sus células vecinas, los queratinocitos (Bagnara y Matsumoto, 2007). Debido al interés en intentar comprender a qué puede deberse la hiper-pigmentación en la zona perianal de *C. decemmaculatus* expuesto a compuestos estrogénicos, haremos principal foco en aquellos mecanismos que inducen la melanogénesis en células epiteliales. Sin embargo, es importante mencionar que se ha demostrado que los macrófagos pigmentados, o llamados melano-macrófagos, también tienen capacidad melanogénica (Guida *et al.*, 1998), pero los mecanismos de acción por los cuales se induce la melanogénesis en estos casos son diferentes al descrito anteriormente para melanóforos (-citos) (Guida *et al.*, 2004). En este sentido, como este grupo de células se encuentra asociado a respuestas del sistema inmune, se pueden observar cambios en la pigmentación debido a diversos procesos patológicos (Agius y Roberts, 2003; Hayes *et al.*, 2006; Franco-Belussi *et al.*, 2014; Arciuli *et al.*, 2015). Por ello, se emplean como biomarcadores del estado de salud de peces (Passantino *et al.*, 2014) y anfibios (Hayes *et al.*, 2006). A su vez, es importante mencionar que se ha documentado que pueden existir cambios en la pigmentación de los órganos que forman parte del sistema pigmentario extracutáneo, debido a alteraciones fisiológicas durante el ciclo reproductivo de los anfibios (Moresco y De Oliveira, 2009). Particularmente, el mecanismo de acción demostrado en células epiteliales humanas es la inducción de la melanogénesis por estrógenos endógenos (E_2) y exógenos (EE_2) (Natale *et al.*, 2016; Snyder *et al.*, 2017). Se sabe que estos esteroides sexuales inducen la síntesis de melanina vía señalización de cAMP por unión a GPER, un receptor de estrógenos acoplado a la

proteína G (Filardo *et al.*, 2002; Natale *et al.*, 2016). Por ello, en futuros estudios, sería interesante abordar los mecanismos de acción por los cuales se induce la pigmentación de las células que rodean la zona perianal de *C. decemmaculatus* expuesto a compuestos estrogénicos, ya que la misma podría ser inducida por acción directa de los estrógenos o por procesos patológicos.

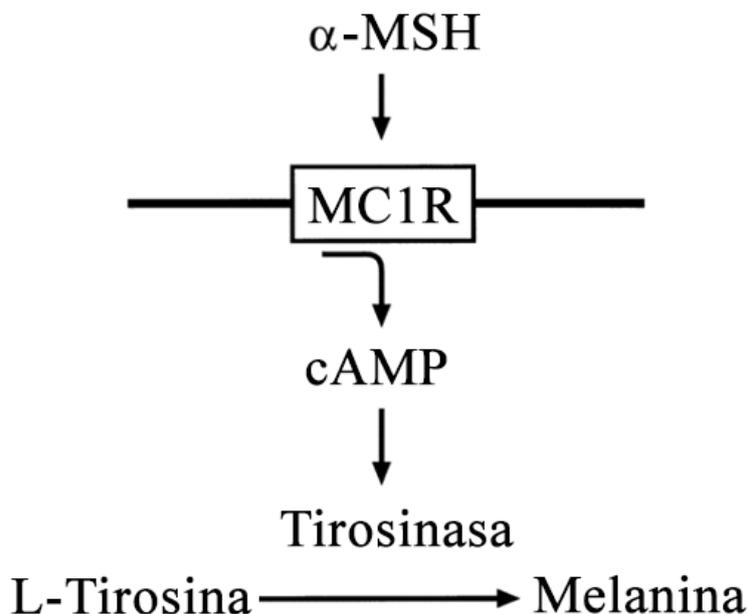


Figura 72. α -MSH actúa vía cAMP acoplado al receptor MC1 (MC1R) para activar tirosinasa y estimular la melanogénesis. Tomado de Thody (1999).

Desde un punto de vista ecotoxicológico, resulta relevante mencionar que a concentraciones de EE₂ halladas en los cuerpos de agua naturales donde habita *C. decemmaculatus*, se observó: disminución en la proporción de machos, alteraciones histológicas de ovarios y testículos y pigmentación en la zona perianal (CE₅₀-13 semanas = 39,26 ng/L). Por otro lado, se halló que el EE₂ causó mortalidad (CL₅₀-13 semanas = 109,9 ng/L) a concentraciones cercanas a las intermedias estudiadas (100 ng/L). En estas concentraciones que se encuentran entre aquellas medidas en los cuerpos de agua naturales y los efluentes cloacales que se descargan en los mismos (43 y 187 ng/L, de acuerdo a Valdés *et al.*, 2015), se observó que todos los peces presentaban algún tipo de alteración en la histología gonadal, una inducción de un fenotipo atípico, un aumento en el largo estándar del fenotipo sexualmente indiferenciado ($p < 0,05$) y un aumento en el índice de condición de los fenotipos sexualmente indiferenciado ($p < 0,01$) y macho ($p < 0,05$).

En su conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo, muestran que, tal como ha sido documentado en otras especies, los estadios tempranos del desarrollo son más sensibles a la exposición a xenobióticos (Brion *et al.*, 2004). Aunque se encontraron efectos sobre el porcentaje de mortalidad, el largo estándar y el peso corporal de ejemplares de *C. decemmaculatus* en estadios tempranos del desarrollo, estas respuestas pueden resultar como inespecíficas a la acción de EE₂. Por lo tanto, se remarca que los principales puntos finales que han respondido a la exposición de compuestos estrogénicos son la proporción de sexos, las alteraciones histológicas gonadales y la presencia de la pigmentación en la zona perianal.

CAPÍTULO 4. EXPOSICIÓN DE MACHOS ADULTOS A UN COMPUESTO ESTROGÉNICO

Introducción

Efectos de perturbadores endocrinos en peces adultos

En estadios de vida adultos, los vertebrados alcanzan una relativa estabilidad hormonal, donde ya están formados los caracteres sexuales secundarios y las gónadas funcionan con normalidad. Durante este estadio de vida, los cambios observados en los niveles de esteroides sexuales circulantes responden principalmente al momento del ciclo reproductivo o la estacionalidad. A pesar de ser un estadio del ciclo de vida con menor sensibilidad a la acción de los EDCs, éstos tienen la capacidad de modificar dicha estabilidad o equilibrio hormonal e inducir alteraciones en el sistema reproductivo.

Se han documentado diversos efectos de compuestos estrogénicos, androgénicos y/o antiandrogénicos sobre la histología gonadal, caracteres sexuales secundarios, expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis o la síntesis de receptores de esteroides, inducción de vitelogenina e intersexos y comportamiento reproductivo de una gran cantidad de especies de peces expuestos durante su estadio adulto. Entre las especies que se cuenta con evidencia de los efectos causados por compuestos estrogénicos, se pueden mencionar a *Danio rerio* expuesto a E₂ (Brion *et al.*, 2004) y EE₂ (Fenske *et al.*, 2001; Colman *et al.*, 2009), *Pimephales promelas* expuesto a EE₂ (Filby *et al.*, 2007; García-Reyero *et al.*, 2009) y efluentes domiciliarios de Estados Unidos (García-Reyero *et al.*, 2011), *Sparus aurata* expuesto a EE₂ (Cabas *et al.*, 2011), *Oncorhynchus mykiss* expuesto a EE₂ (Purdom *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2008), E₂ y efluentes cloacales del Reino Unido (Purdom *et al.*, 1994), *Cyprinodon variegatus* expuesto a DES, E₂ y EE₂ (Denslow *et al.*, 2001), *Gambusia holbrooki* expuesto a E₂ (Doyle y Lim, 2005) y *Oreochromis mossambicus* alimentado con dietas comerciales para peces, demostrando efectos estrogénicos en las mismas (Davis *et al.*, 2009). También se han documentado efectos antiandrogénicos en peces adultos, tales como *Pimephales promelas* expuesto a flutamida (Filby *et al.*, 2007) y *Poecilia reticulata* expuesto a vinclozolin y *p,p'*-DDE (Baatrup y Junge, 2001). Así como también se vieron efectos androgénicos en peces adultos, como por ejemplo *Gambusia holbrooki* expuesto a levogenestrel (Frankel *et al.*, 2016b) y 17β-trembolona (Brockmeier *et al.*, 2013), *Gambusia affinis* expuesto a efluentes de la industria papelera en Estados Unidos (Drysdale y Bortone, 1989), *Brienomyrus niger* expuesto a metiltestosterona (Herfeld y Moller, 1998) y *Pimephales promelas* expuesto a gestodene (Frankel *et al.*, 2016a).

Por otro lado, aunque hay evidencia de daño hepático por la exposición a compuestos estrogénicos en peces, a este efecto se le ha prestado menos atención que los mencionados anteriormente. El hígado es el principal órgano encargado de los procesos de transformación y metabolismo de compuestos, tanto endógenos como exógenos. Por ejemplo, se pueden mencionar los trabajos de Elias *et al.* (2007) sobre la inducción de hígados grasos de *Etheostoma caeruleum* expuesto a EE₂, Cakmak *et al.* (2006) sobre los cambios de composición, estructura y función hepática de *Oncorhynchus mykiss* expuesto a E₂ y Abdulla Bin-Dohaish (2012) sobre la alteración de la arquitectura hepática (necrosis, gotas lipídicas, lisis y pérdida del núcleo celular) de *Oreochromis spilurs* expuesto a NF.

La mayoría de los efectos de EDCs publicados en peces muestreados del ambiente, se encuentran en el estadio de vida adulto. Entre las especies que se conocen los efectos estrogénicos en ejemplares silvestres, se pueden mencionar los casos de *Gambusia holbrooki* que habitaba en ríos contaminados por efluentes cloacales (Batty y Lim, 1999) y en humedales de Australia (Game *et al.*, 2006), *Platichthys flesus* en estuarios contaminados del Reino Unido (Kirby *et al.*, 2004), *Astyanax scabripinnis* en ríos de Brasil (Pereira de Sá *et al.*, 2008), *Rutilus rutilus* en ríos, lagos y arroyos del Reino Unido (Nolan *et al.*, 2001), *Neogobius melanostomus* en el mar Báltico (Polonia) (Guellard *et al.*, 2015) y *Gobio gobio* en ríos del Reino Unido (van Aerle *et al.*, 2001). Toft *et al.* (2003) han reportado efectos antiandrogénicos en ejemplares silvestres de *Gambusia holbrooki* que habitaban en un lago de Estados Unidos. Así como también, se han documentado efectos androgénicos en poblaciones silvestres de *Gambusia holbrooki* que habitaban en cuerpos de agua dulce impactados por efluentes de la industria papelera en Estados Unidos (Howell *et al.*, 1980; Bortone *et al.*, 1989; Cody y Bortone, 1997; Bortone y Cody, 1999; Orlando *et al.*, 2002; Brockmeier *et al.*, 2014).

Se han descrito diversos efectos y mecanismos por los cuales una gónada adulta puede ser modificada por EDCs. Las principales alteraciones gonadales son la intersexualidad y la reducción del peso gonadal o índice gonado-somático (Scholz y Kluver, 2009). Sin embargo, hay especies como *Dicentrarchus labrax*, que naturalmente presentan intersexos o *testis-ova* (oocitos intratesticulares) (Saillant *et al.*, 2003). Además, algunos autores han documentado intersexos en distintas especies de peces, tanto marinos (*Zoarcetes viviparus*) como dulceacuícolas (*Gasterosteus aculeatus* y *Perca fluviatilis*), que habitan en áreas con niveles presumiblemente bajos de contaminación de Alemania (Gercken y Sordyl, 2002), Suecia (Borg y van den Hurk, 1983) y Finlandia

(Kristoffersson y Pekkarinen, 1975). Hoy se sabe, como sugirieron Gercken y Sordyl (2002), que la intersexualidad es una condición normal en algunas especies de peces. Por ello, resulta necesario conocer la morfogénesis de los ovarios y testículos en condiciones normales, es decir teniendo certeza de que los animales y sus padres, no han estado expuestos a EDCs.

Hipótesis

La exposición de machos adultos de Cnesterodon decemmaculatus a EE₂ induce alteraciones en la morfología del gonopodio, la histología gónadal y hepática.

Objetivo

- Evaluar el efecto los efectos de exposiciones subletales crónicas a EE₂ sobre la morfología del gonopodio, la histología gonadal y hepática en machos adultos de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Materiales y métodos

Origen de los organismos

Se utilizaron machos adultos de *C. decemmaculatus* en Estadio 4 de la morfogénesis del gonopodio, según los criterios establecidos en el Capítulo N°1 de la presente tesis. Estos peces fueron obtenidos del acuario establecido en el Sector de Ecotoxicología del Laboratorio de Transformación de Residuos (IMYZA-INTA).

Reactivos

En este capítulo, se utilizaron los siguientes reactivos: 17 α -etinilestradiol (CAS N° 57-63-6; Parafarm® 99% de pureza; Saporiti), [¹³C]-17 α -etinilestradiol (99% pureza; Cambridge Isotope Laboratories), benzocaína (Sigma-Aldrich), etanol absoluto, bálsamo de Canadá, parafina con punto de fusión 56-58 °C, alizarine-red, alcian-blue, eosina, hematoxilina y ácido pícrico (Biopack) y Paraplast (Leica).

Experimentos

Según los criterios establecidos en el Capítulo N°1 de la presente tesis, los ejemplares de *C. decemmaculatus* fueron sexados fenotípicamente y luego se apartaron los machos adultos, identificados dentro del Estadio 4 de morfogénesis del gonopodio. Se colocaron bajo condiciones controladas de laboratorio en una sala utilizada para bioensayos de toxicidad, mantenida a una temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperiodo (16L:8O).

Con estos ejemplares, se realizaron dos experimentos de exposición crónica de machos adultos a diferentes concentraciones de 17α -etinilestradiol (EE_2). La unidad experimental consistió de un recipiente de vidrio de 3 L de capacidad con 2,5 L del medio y los peces. Se utilizó un régimen de flujo estático con renovación completa del medio cada 48 hs. El Experimento N°1 fue considerado como una prueba preliminar. Se evaluaron 3 niveles de concentración (0, 20 y 200 ng EE_2/L) y 2 tiempos de exposición (8 y 12 semanas) sin réplicas. En cada unidad experimental, se colocaron 15 machos adultos que tenían entre 17,6 y 22,3 mm de largo estándar. El Experimento N°2 fue considerado como una prueba definitiva. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado, donde se testearon 4 niveles de concentración (0, 20, 100 y 200 ng/L) y 2 tiempos de exposición (8 y 16 semanas) por duplicado. En cada unidad experimental, se colocaron 16 machos adultos que tenían entre 16,9 y 25,9 mm de largo estándar.

Las soluciones madre y de trabajo de EE_2 fueron preparadas en etanol absoluto y almacenadas a -20°C hasta su uso. Las concentraciones testeadas fueron preparadas antes de cada renovación del medio, diluyendo alícuotas de las soluciones de trabajo en el medio de dilución. Se utilizó como medio de dilución, agua de perforación clorada, la cual debió ser declorada y aireada durante más de 48 horas, antes de ser utilizada en el acuario (pH $8,6 \pm 0,1$; conductividad eléctrica $720 \pm 3 \mu\text{S}/\text{cm}$). La concentración de etanol se mantuvo en 0,0025% para todos los tratamientos, incluyendo al control. La dieta diaria estaba compuesta por alimento balanceado Shulet® formulado en escamas.

Los peces fueron manipulados siguiendo los principios y procedimientos avalados por el CICUAE del CICVyA-INTA. Los residuos químicos y biológicos se descartaron como residuos especiales y patogénicos respectivamente, los cuales fueron colectados por una empresa encargada de su tratamiento.

Parámetros de condición general y de la morfología del gonopodio

En ambos experimentos, se registró diariamente la supervivencia en cada unidad experimental, y en el caso de observarse mortalidad, los peces muertos fueron removidos del recipiente. En cada tiempo de muestreo, los peces fueron anestesiados con hielo y luego se midió LE, R4 y R6, utilizando un calibre digital electrónico (Schwyz) con una precisión de 0,1 mm. Sólo en el Experimento N°2, los peces fueron pesados en una balanza digital Ohaus (precisión $\pm 0,1$ mg) y con estos datos, se calculó el índice de condición (Factor *K*).

Se utilizó la técnica de coloración *in toto* con Alcian-blue y Alizarine-red para caracterizar las estructuras anatómicas del gonopodio (cartílago y hueso respectivamente), descripta en el Capítulo N°1 de la presente tesis. Las estructuras fueron observadas con microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) y se fotografiaron con cámara digital (Evolution BF fase cool color 12 bits) adosada al mismo. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Image-Pro-Plus 4.5.

Histología gonadal y hepática

Los tejidos fueron fijados en líquido de Bouin durante 24 hs a 4°C, luego fueron deshidratados en una serie de alcoholes crecientes (70-100%), pasados por xileno e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de cada una de las muestras cada 60 μm en un micrótopo de rotación Leica (RM2125RT). Luego, los preparados se colorearon con hematoxilina-eosina o con PAS (del inglés, *Periodic Acid-Schiff*: ácido periódico de Schiff). Brevemente, la coloración con PAS se realizó con ácido peryódico al 1% durante 10 min y luego de una serie de lavados con agua deionizada, los cortes se colocaron en el Reactivo de Schiff durante 15 min. Se realizó otra serie de lavados y se hizo una coloración nuclear con hematoxilina de Harris para contraste.

Los preparados fueron examinados y fotografiados en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) equipado con una cámara digital (Nikon DS-Fi1). Las fotos se analizaron y procesaron usando el software NIS-Elements F 3.00.

Puntos finales histológicos

Los puntos finales histológicos cuantitativos fueron evaluados sólo al final del Experimento N°2. En las gónadas, los puntos finales evaluados fueron:

- Porcentaje de peces que presentaron *testis-ova*;
- La mediana del porcentaje de secciones histológicas con presencia de oocitos en los peces con *testis-ova*;
- La mediana del número de oocitos por testículo en peces con *testis-ova*.

Se examinaron los cortes histológicos de toda la gónada y sólo se consideraron los oocitos a los cuales se les pudo observar claramente el núcleo, con el fin de evitar el doble conteo. En el hígado, los cambios histológicos se cuantificaron de acuerdo al método propuesto por Bernet *et al.* (1999). El mismo permite calcular el índice del órgano (*I_{org}*) mediante una cuantificación estandarizada del daño en un órgano específico (Ecuación N°8).

$$I_{org} = \sum_{pr} \sum_{alt} (\alpha_{org \times pr \times alt} \times \omega_{org \times pr \times alt}) \quad \text{Ecuación N°8}$$

donde *org* es el órgano bajo análisis (en este caso, el hígado); *pr* es el patrón de reacción; *alt* es la alteración; α es la puntuación, la cual tiene valores de 0, 2, 4 o 6 para 4 niveles de grado del daño: nulo, leve, moderado o severo, respectivamente; y ω es el factor de importancia, el cual toma valores de 1, 2 o 3 clasificando al daño en 3 niveles de importancia patológica: mínima, moderada o severa, respectivamente.

Cuantificación de EE₂ en agua

Las concentraciones reales de EE₂ en el agua de prueba se identificaron y cuantificaron por HPLC-MS/MS, luego de extracción en SPE, utilizando el método mencionado en el Capítulo N°3 de la presente tesis.

Análisis de datos

Se realizó un Análisis de Variancia (ANOVA) para evaluar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) inducidas por la exposición a EE₂ sobre el largo estándar, peso corporal, factor de condición, R4, R6, índice de elongación, índice gonopodial y *organ*

index luego de comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad usando la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Cuando los efectos fueron significativos, se realizó la prueba de Tukey para estimar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por comparaciones *post hoc*. A su vez, se realizó una tabla de contingencias para comparar porcentajes y frecuencias mediante la prueba de χ^2 . También se realizó la prueba de la mediana para analizar los puntos finales evaluados sobre la histología gonadal, debido a que estos datos no se distribuyeron normalmente. Los valores de LOEC (del inglés, *Lowest-Observed-Effect Concentration*) y NOEC (del inglés, *No-Observed-Effect Concentration*) fueron estimados a partir de la mínima y máxima concentración evaluada que mostrara o no, diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, respectivamente. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software Prism 5.1 para Windows (GraphPad Software®).

Resultados

Concentración de EE₂ en agua

Las curvas de calibración área-concentración se obtuvieron obtenidas a partir del fraccionamiento del estándar de EE₂ en los iones *m/z* 295,25; 267,17 y 277,17, los cuales corresponden al ion precursor y los iones producto bajo las condiciones analizadas, respectivamente (Figura 73).

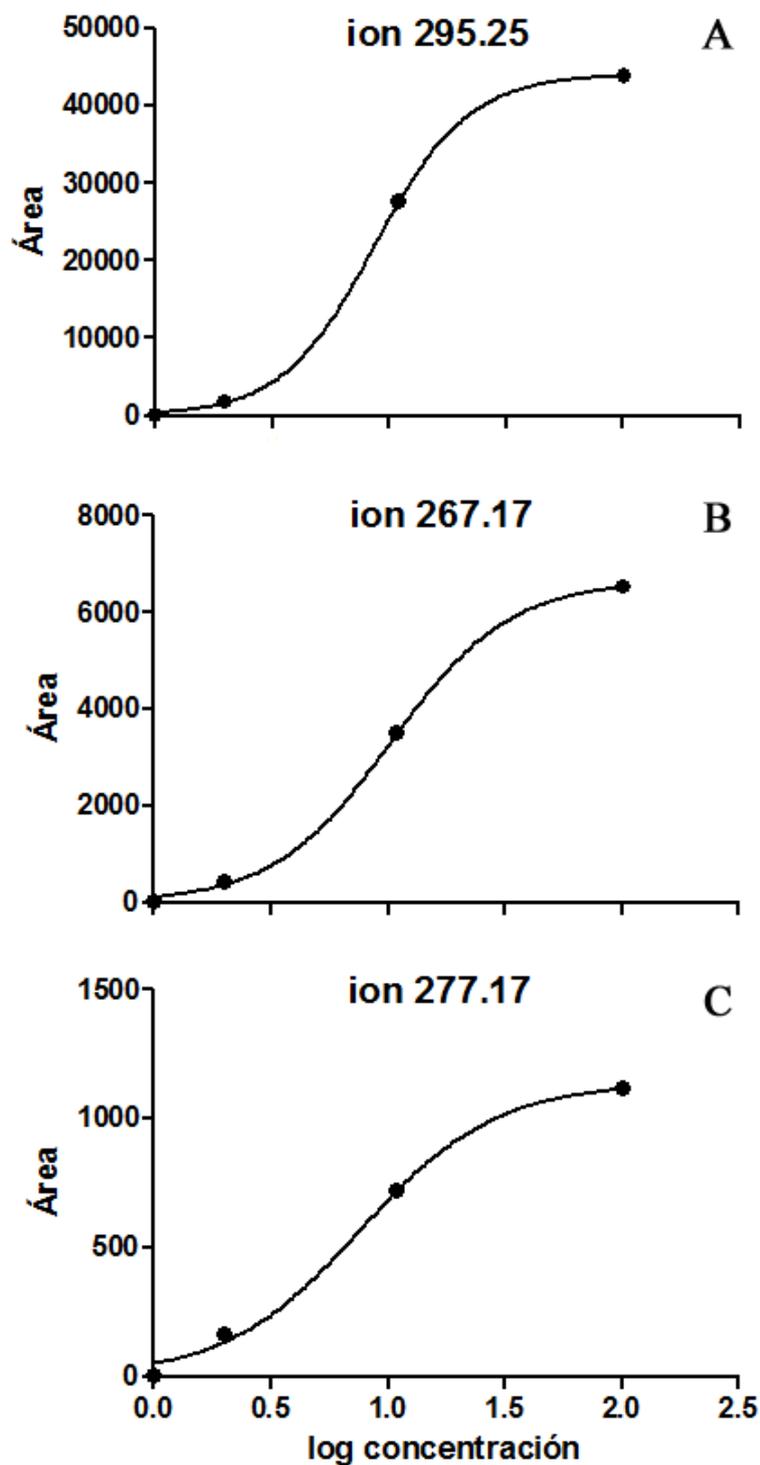


Figura 73. Curvas de calibración área-concentración utilizadas para describir el fraccionamiento de una solución estándar de EE₂. A: molécula desprotonada *m/z* 295,25 para ión precursor del EE₂; B-C: los iones producto fueron *m/z* 267,17 y *m/z* 262,25. El ión *m/z* 267,17 fue usado para cuantificación de EE₂ en muestras de agua.

Aunque se observaron algunas variaciones en las concentraciones de EE₂ medidas en las muestras de agua tomadas luego de la renovación del medio, se obtuvieron valores de concentración entre 88% y 113% del valor nominal (Tabla 10). No se detectó EE₂ en ninguna réplica del tratamiento control durante todo el período de exposición.

Tabla 10. Media (\pm desviación estándar) de las concentraciones de EE₂ medidas en el medio de cada tratamiento del Experimento N°2.

Concentración nominal	Concentración medida (ng/L)
Control	ND
20 ng/L	21,1 \pm 11,5
100 ng/L	113,1 \pm 8,8
200 ng/L	176,1 \pm 3,2

ND: concentración no detectable

Mortalidad, factor de condición y morfología del gonopodio

Al final de ambos experimentos, el porcentaje de mortalidad fue de 12,5% y 21,9%, respectivamente, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de EE₂ y el control. El largo estándar tampoco se vio afectado por la exposición a EE₂. Aunque en el Experimento N°2, se observó que el promedio del peso corporal aumentó en forma concentración-dependiente por la exposición a EE₂, no se observaron diferencias significativas. Particularmente, se evidenció un efecto concentración-dependiente inducido por EE₂ (ANOVA, $p = 0,043$) sobre el factor de condición, siendo significativamente mayor en los ejemplares expuestos durante 8 semanas a 200 ng/L y durante 16 semanas a 100 ng/L (Tabla 11).

Tabla 11. Valores promedios (\pm desviación estándar) de mortalidad, tamaño, condición y parámetros e índices de la morfología del gonopodio en machos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a las diferentes concentraciones de EE₂ en los Experimentos N°1 y N°2.

Experimento	Tratamiento	Réplica (n) ^a	Parámetro							
			Mortalidad (%)	LE (mm)	Peso (mg)	K	R4 (mm)	R6 (mm)	IG (%)	IE
1	Control	(15)	13,3	20,1 \pm 1,3	sd	sd	8,3 \pm 1,0	3,6 \pm 0,6	41,4 \pm 2,9	2,3 \pm 0,2
	20 ng/L	(15)	20,0	20,9 \pm 1,2	sd	sd	8,2 \pm 0,5	3,6 \pm 0,4	39,2 \pm 2,2	2,3 \pm 0,1
	200 ng/L	(15)	26,7	20,9 \pm 1,3	sd	sd	8,5 \pm 0,7	3,6 \pm 0,4	40,9 \pm 2,2	2,4 \pm 0,1
2	Control	A (16)	25,0	21,2 \pm 1,9	134,0 \pm 35,1	1,38 \pm 0,21	8,5 \pm 0,9	3,9 \pm 0,6	39,9 \pm 1,1	2,2 \pm 0,2
		B (16)	18,8	20,8 \pm 1,9	122,0 \pm 36,5	1,31 \pm 0,13	8,3 \pm 0,6	3,8 \pm 0,1	40,1 \pm 3,3	2,2 \pm 0,2
	20 ng/L	A (16)	25,0	21,6 \pm 1,7	138,6 \pm 33,2	1,34 \pm 0,10	8,7 \pm 0,8	4,0 \pm 0,4	40,2 \pm 3,1	2,2 \pm 0,1
		B (16)	12,5	21,1 \pm 2,1	136,7 \pm 44,2	1,42 \pm 0,24	8,5 \pm 1,0	4,0 \pm 0,5	40,4 \pm 2,9	2,1 \pm 0,1
	100 ng/L	A (16)	12,5	20,1 \pm 1,0	135,1 \pm 28,8	1,45 \pm 0,19*	8,5 \pm 0,7	3,9 \pm 0,3	40,4 \pm 2,6	2,2 \pm 0,1
		B (16)	12,5	21,0 \pm 1,9	143,6 \pm 35,0	1,53 \pm 0,18*	8,5 \pm 0,9	3,9 \pm 0,5	40,8 \pm 3,3	2,2 \pm 0,1
	200 ng/L	A (16)	18,8	21,9 \pm 2,1	155,2 \pm 48,0	1,45 \pm 0,15*	8,5 \pm 0,6	4,0 \pm 0,4	39,0 \pm 3,2	2,1 \pm 0,1
		B (16)	12,5	21,5 \pm 2,7	150,7 \pm 53,5	1,46 \pm 0,09*	8,5 \pm 0,9	4,0 \pm 0,5	39,8 \pm 4,3	2,1 \pm 0,1

LE: largo estándar, K: factor de condición, R4 y R6: longitud de los radios 4 y 6 de la aleta anal, IG: índice gonopodial, IE: índice de elongación, sd: sin datos. Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control ($p < 0,05$).

^a Número inicial de peces expuestos en cada réplica.

La Figura 74 muestra las estructuras óseas y cartilagosas del gonopodio de un macho adulto. Al finalizar los experimentos, en todos los tratamientos los machos adultos presentaron un gonopodio completamente desarrollado con sierras, ganchos y cirros. Ninguno de los parámetros morfológicos evaluados o índices calculados fue afectado por la exposición crónica a EE₂.

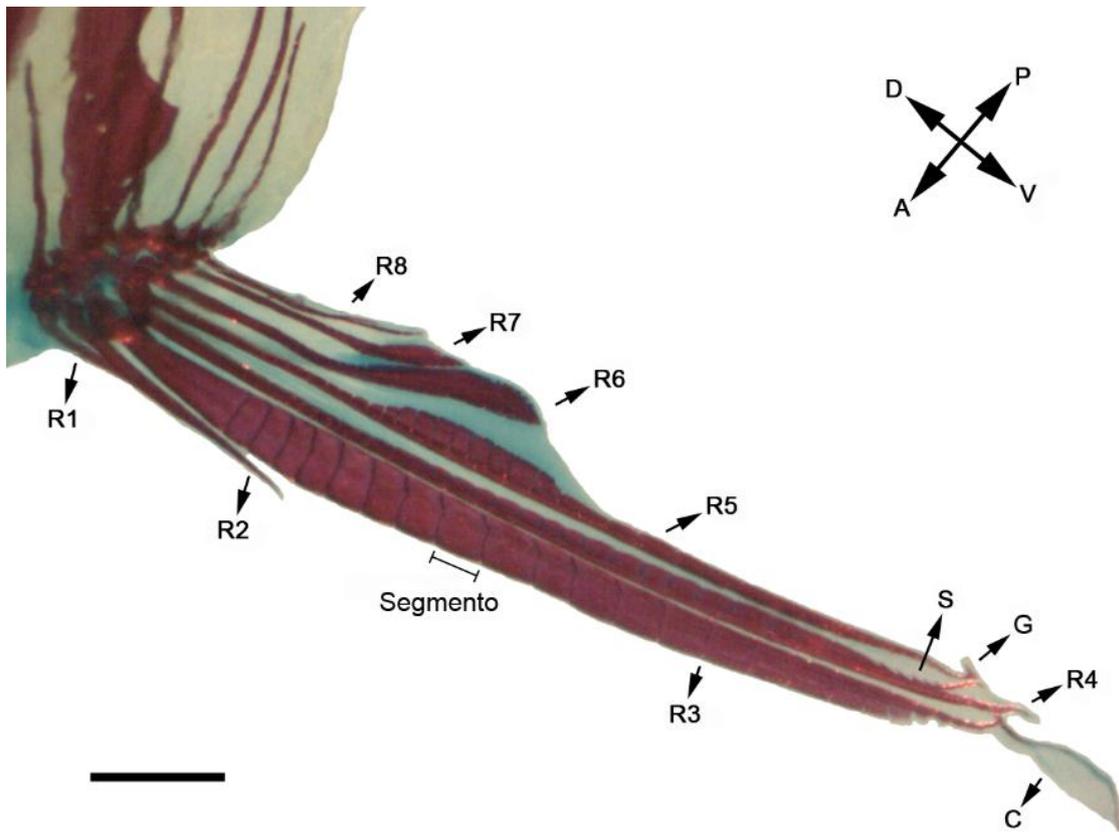


Figura 74. Aleta anal representativa de un macho adulto control de *Cnesterodon decemmaculatus* coloreado *in toto*. Las estructuras óseas y cartilagosas fueron coloreadas con Alizarin Red y Alcian Blue, respectivamente. La numeración de los radios de la aleta (R) aumenta en sentido ventral-dorsal. A: anterior; P: posterior; V: ventral; D: dorsal; S: sierras; G: ganchos; C: cirros (Barra = 1 mm).

Histología gonadal

Las imágenes ilustrativas de la histología del testículo de machos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a las distintas concentraciones de EE₂ evaluadas y del grupo control se muestran en las Figuras 75, 76, 77 y 78. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los dos experimentos entre los

peces expuestos a 20 ng/L y los del grupo control (Figura 75A y B). Para ellos, las características histológicas de los testículos de machos adultos fueron las mismas que describieron previamente Parenti *et al.* (2010). Los testículos se encontraron localizados en el centro de la cavidad corporal y fusionados como un único órgano. El centro del mismo estaba ocupado por espermatozeugmatas rodeadas por la sustancia eosinófila y PAS-positiva descrita previamente. En este estadio gonadal, las espermatogonias y las espermatidas estaban organizadas en cistos restringidos a la periferia del testículo.

En los restantes tratamientos con EE₂, se observaron alteraciones de la histología gonadal en relación concentración-respuesta. Estas estuvieron caracterizadas por la inducción de *testis-ova* y modificaciones de la histoarquitectura del testículo. En un fase temprana de la alteración, se desarrollaron algunos oocitos primarios en la periferia de los testículos fusionados (Figura 76A y B). Esta etapa fue característica de los peces expuestos a 100 y 200 ng/L durante 8 semanas o a 100 ng/L durante 16 semanas. En una fase intermedia, se incrementó el número de oocitos periféricos y los cistos con estadios inmaduros (gonias indiferenciadas, espermatoцитos y espermatidas). Además, se observó una proliferación de células intersticiales alrededor de las espermatozeugmatas, reemplazando la sustancia PAS-positiva (Figura 77A y B). Tales cambios fueron observados en todos los peces expuestos a 200 ng/L durante 12 semanas y en algunos peces expuestos a esta concentración durante 16 semanas. La etapa de alteración más avanzada, se caracterizó, además de los cambios mencionados anteriormente, por un gran número de oocitos ocupando la sección central del testículo, una marcada reducción en el número de espermatozeugmatas e hiperplasia del epitelio del ducto. Estas alteraciones sólo fueron observadas en los peces expuestos a 200 ng/L durante 16 semanas (Figura 78A y B).

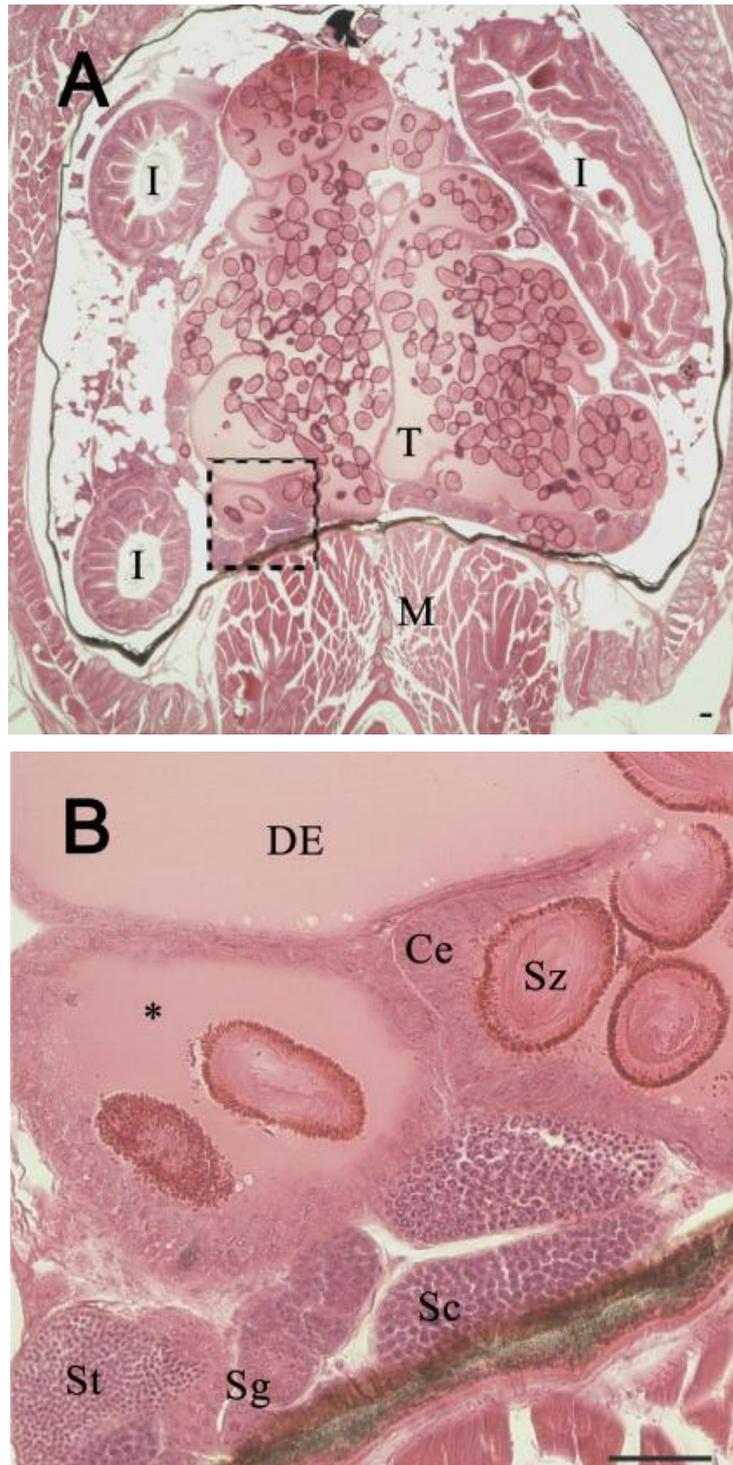


Figura 75. Histología testicular de machos adultos de *C. decemmaculatus* normal, observada en el grupo control y grupo expuestos a 20 ng/L de EE₂ en semana 16. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; Sc: cisto de espermatoцитos; Sg: cisto de espermatogonias; St: cisto de espermátidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ducto eferente; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 μ m).

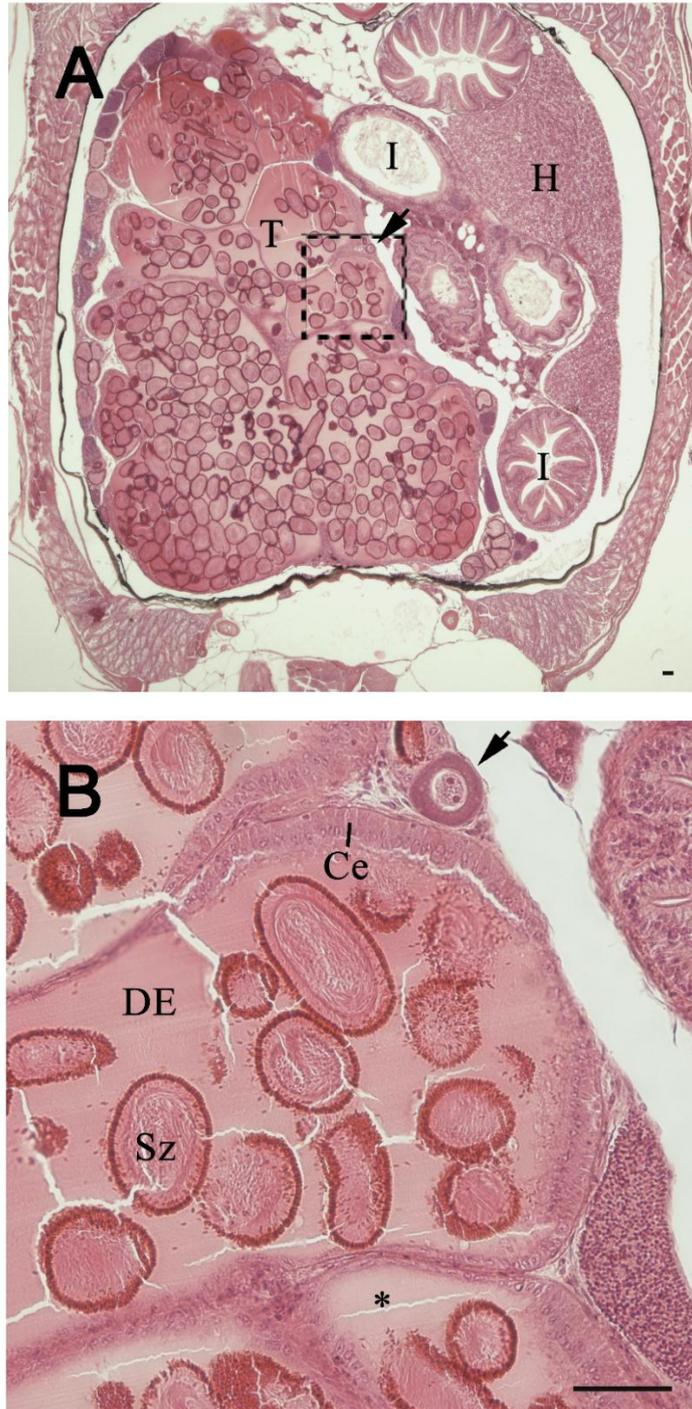


Figura 76. Histología testicular de machos adultos de *C. decemmaculatus* en fase de alteración temprana, observada en ejemplares expuestos a 100 ng/L de EE₂ en semana 8 y 16 o 200 ng/L en semana 8. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; H: hígado; Sz: espermatozeugmata; DE: ducto eferente; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 μm).

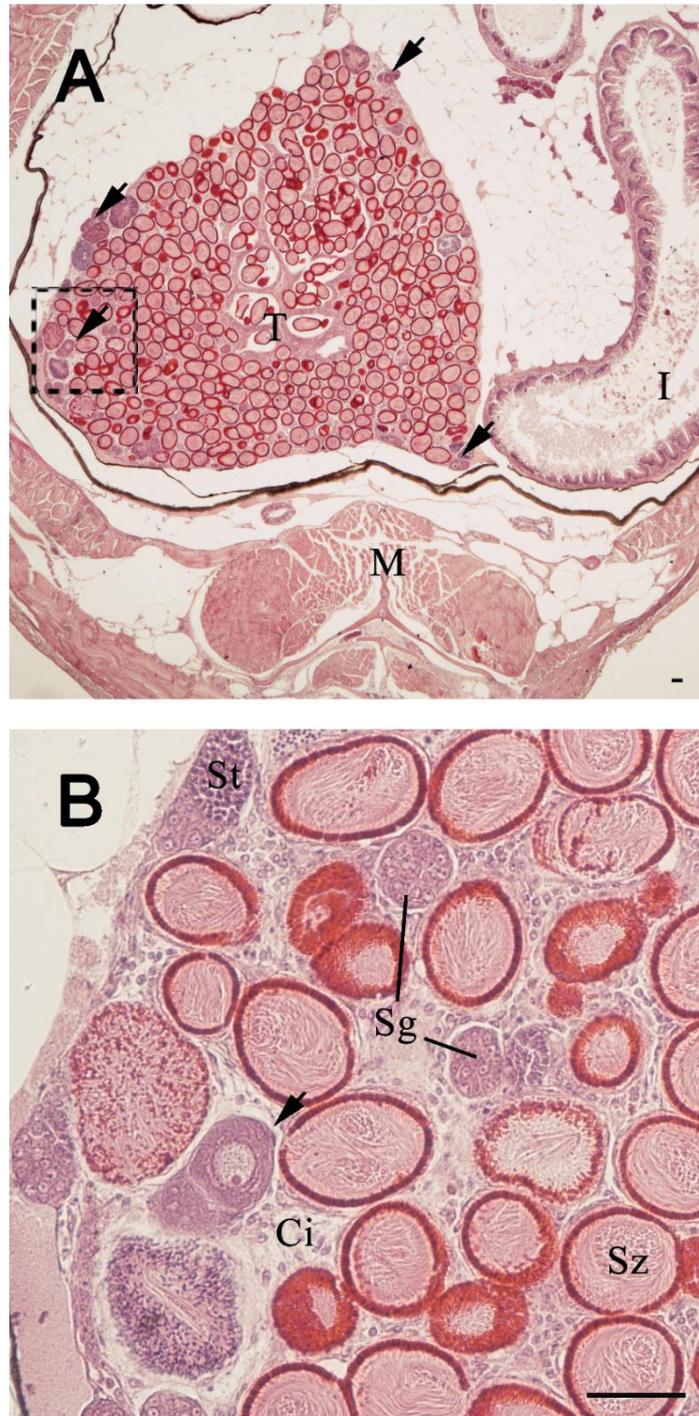


Figura 77. Histología testicular de machos adultos de *C. decemmaculatus* en fase de alteración intermedia, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L EE₂ en semana 12 y 16. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; Cg: cisto de gonias; St: cisto de espermatidas; Sz: espermatogonias; DE: ducto eferente; Ci: células intersticiales (Barra = 50 μ m).

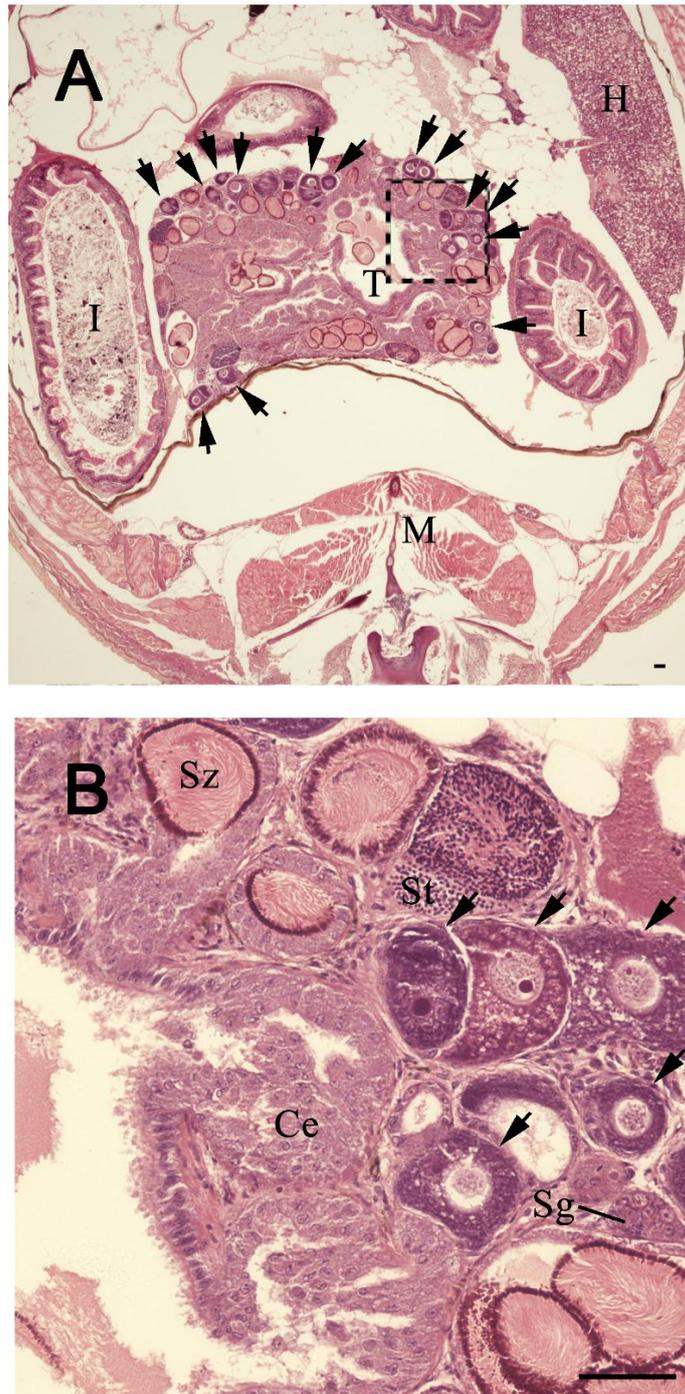


Figura 78. Histología testicular de machos adultos de *C. decemmaculatus* en fase de alteración avanzada, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L de EE₂ sólo en semana 16. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios y secundarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; H: hígado; Cg: cisto con gonias; St: cisto de espermatidas; Sz: espermatozeugmata; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 µm).

También se observó que 20% y 40% de los peces expuestos durante 8 semanas a 100 y 200 ng/L presentaron gónadas con *testis-ova*, respectivamente (Figura 79). Este efecto se incrementó desde la semana 8 a la 16 y fue mayor en 200 ng/L que en 100 ng/L en la semana 8. Estos valores pasaron de 0% en el control y en 20 ng/L hasta 62-75% en las concentraciones de 100 y 200 ng/L. La mediana del porcentaje de peces expuestos a 100 y 200 ng/L que presentan *testis-ova* luego de 16 semanas de exposición, fue significativamente diferente con respecto al control ($p < 0,05$). A su vez, los resultados del análisis histológico cuantitativo de las gónadas realizado en la semana 16 de exposición, se muestran en la Figura 80. En la misma, se observa que tanto el número de oocitos por *testis-ova* (A) como el porcentaje de cortes histológicos con oocitos (B) fueron significativamente mayores en los tratamientos de 100 y 200 ng/L ($p < 0,05$).

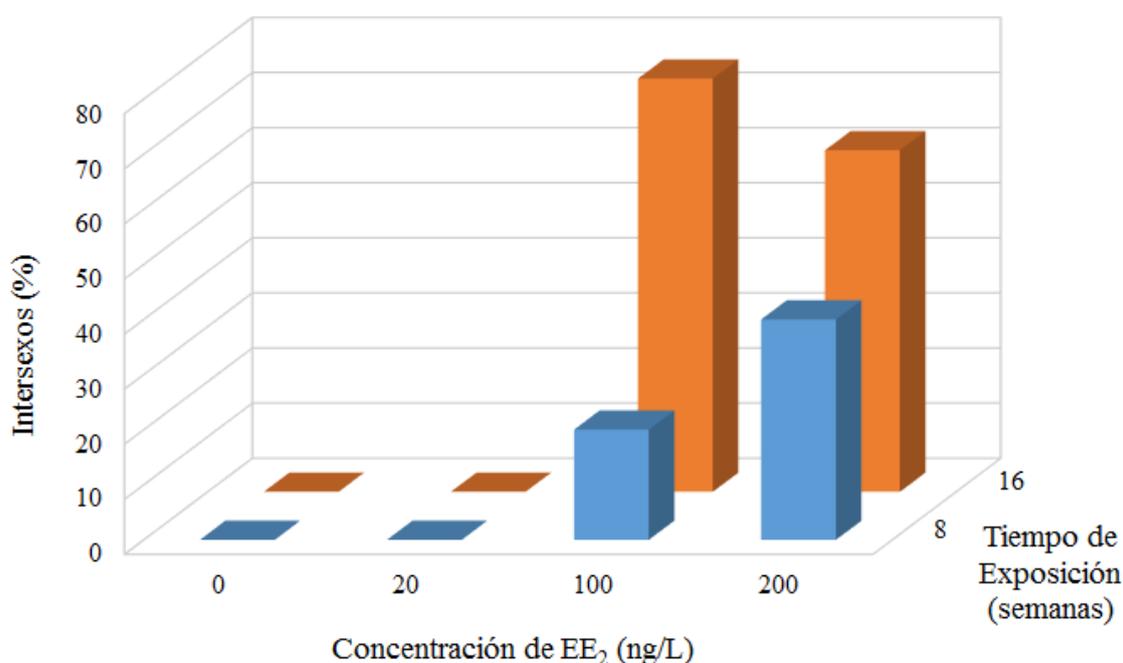


Figura 79. Porcentaje de intersexos de *C. decemmaculatus* en función de la concentración de EE₂ expuestos a durante 8 o 16 semanas (Experimento N°2).

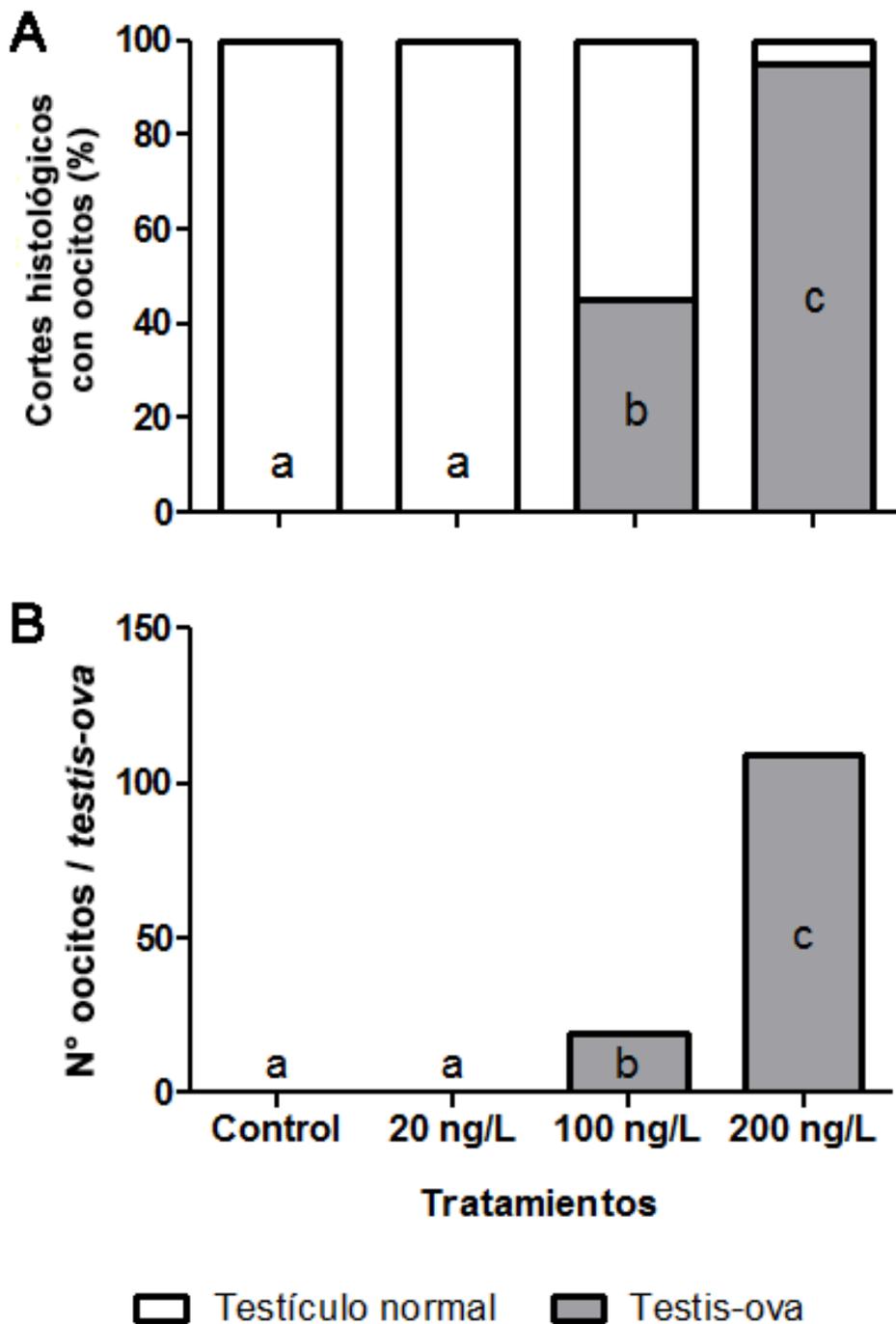


Figura 80. Cambios histológicos cuantitativos observados en las gónadas de machos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂ durante 16 semanas (Experimento N°2): (A) porcentaje de cortes histológicos con presencia de oocitos en peces con *testis-ova*; (B) número de oocitos por pez con *testis-ova*. Los valores presentados son la mediana del parámetro. Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (prueba de la mediana, $p < 0,05$) son indicadas con letras diferentes.

Daño hepático

Las alteraciones inducidas por EE₂ en el hígado fueron similares en ambos experimentos. En las Figuras 81-83 se muestran imágenes ilustrativas de la histología hepática normal en machos adultos de *C. decemmaculatus* y en los ejemplares expuestos a 20 ng/L de EE₂ hasta 16 semanas que no manifestaron diferencias significativas entre sí (Figura 81A y B). De un modo diferente, se encontraron diversas alteraciones histológicas en los peces expuestos a 100 y 200 ng/L. El hígado de los peces expuestos a 100 ng/L durante 16 semanas (Figura 82A, B y C), se caracterizó por presentar un aumento de la retención de lípidos intracelulares de los hepatocitos (esteatosis macrovesicular) y la necrosis celular, caracterizada por células con citoplasma claramente acidófilo y núcleo picnótico o incluso ausente, alteraciones descritas previamente por Levin *et al.* (1999). Por otra parte, se observaron alteraciones en peces expuestos a 200 ng/L durante 16 semanas (Figura 83) caracterizadas por una marcada esteatosis asociada a degeneración cística dada por la aparición de cistos multilobulados rodeados por septos finos llenos de un flocculento material eosinófilo con la consecuente perturbación de la organización acinar, anomalías previamente descritas por Thoolen *et al.* (2010).

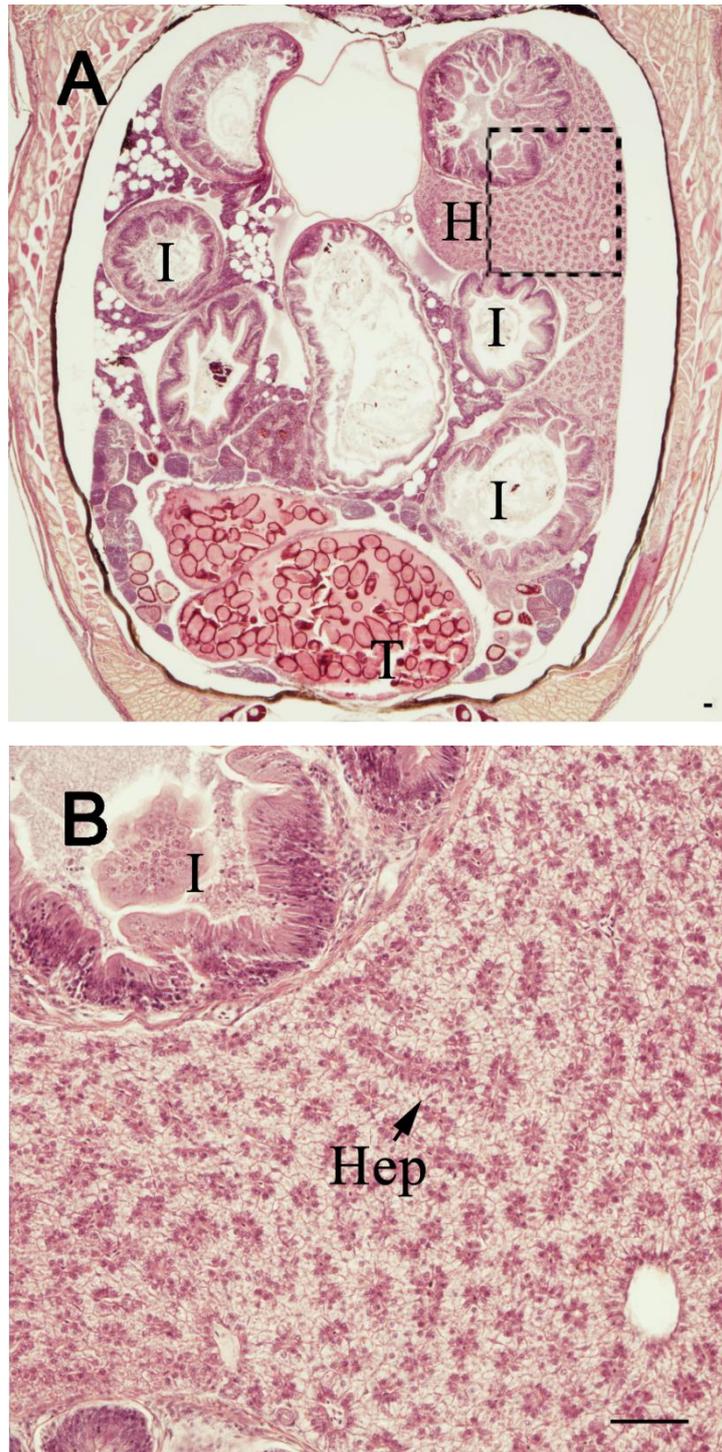


Figura 81. Histología hepática normal en machos adultos de *C. decemmaculatus*, observada en los ejemplares del grupo control y en aquellos expuestos a 20 ng/L de EE₂ durante 8 y hasta 16 semanas. Estos cortes histológicos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). H: hígado; I: intestino; T: testículo; Hep: hepatocito (Barra = 50 μ m).

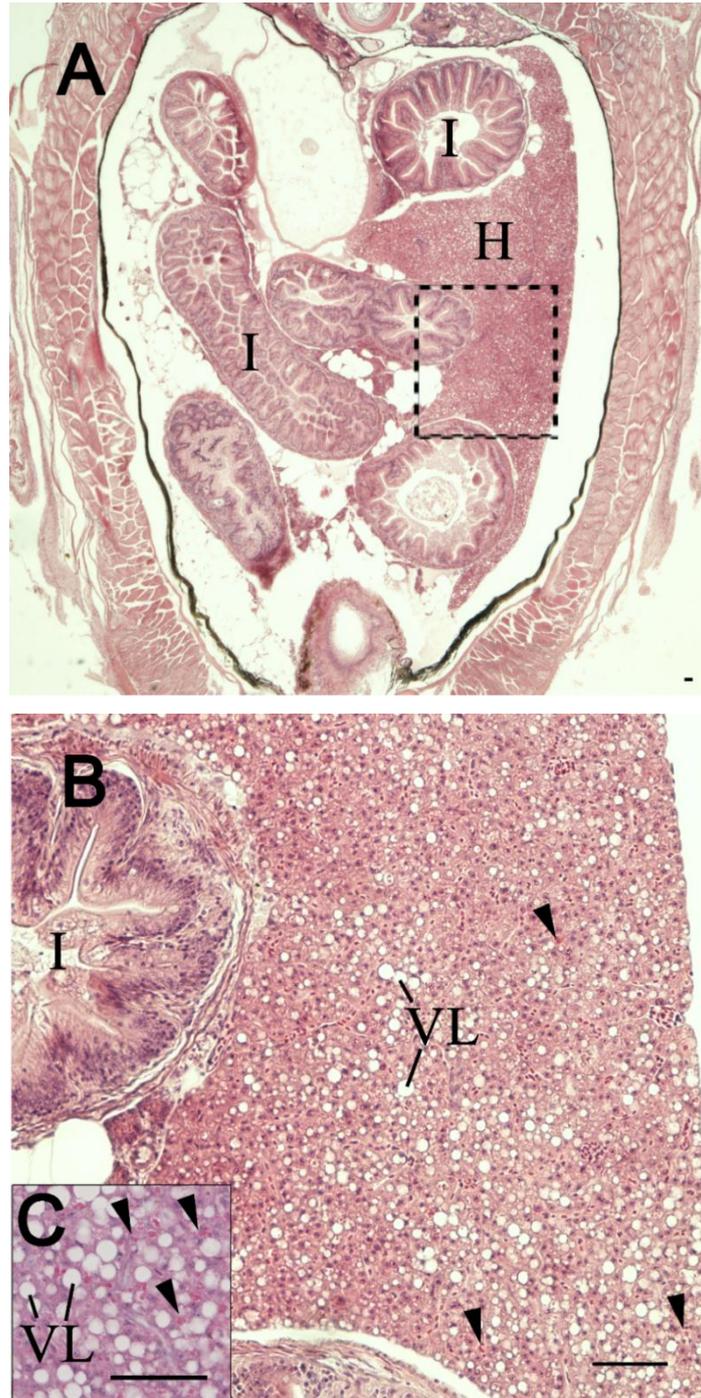


Figura 82. Histología hepática de machos adultos de *C. decemmaculatus* con alteración leve, observada en ejemplares expuestos a 100 ng/L de EE₂ durante 16 semanas o 200 ng/L durante 8 semanas. Los cortes histológicos de los paneles A y B fueron coloreados con hematoxilina-eosina, mientras que los cortes del panel C, fueron coloreados con PAS. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Las puntas de flechas indican la ubicación de células en necrosis. H: hígado; I: intestino; VL: macrovesículas lipídicas (Barra = 50 µm).

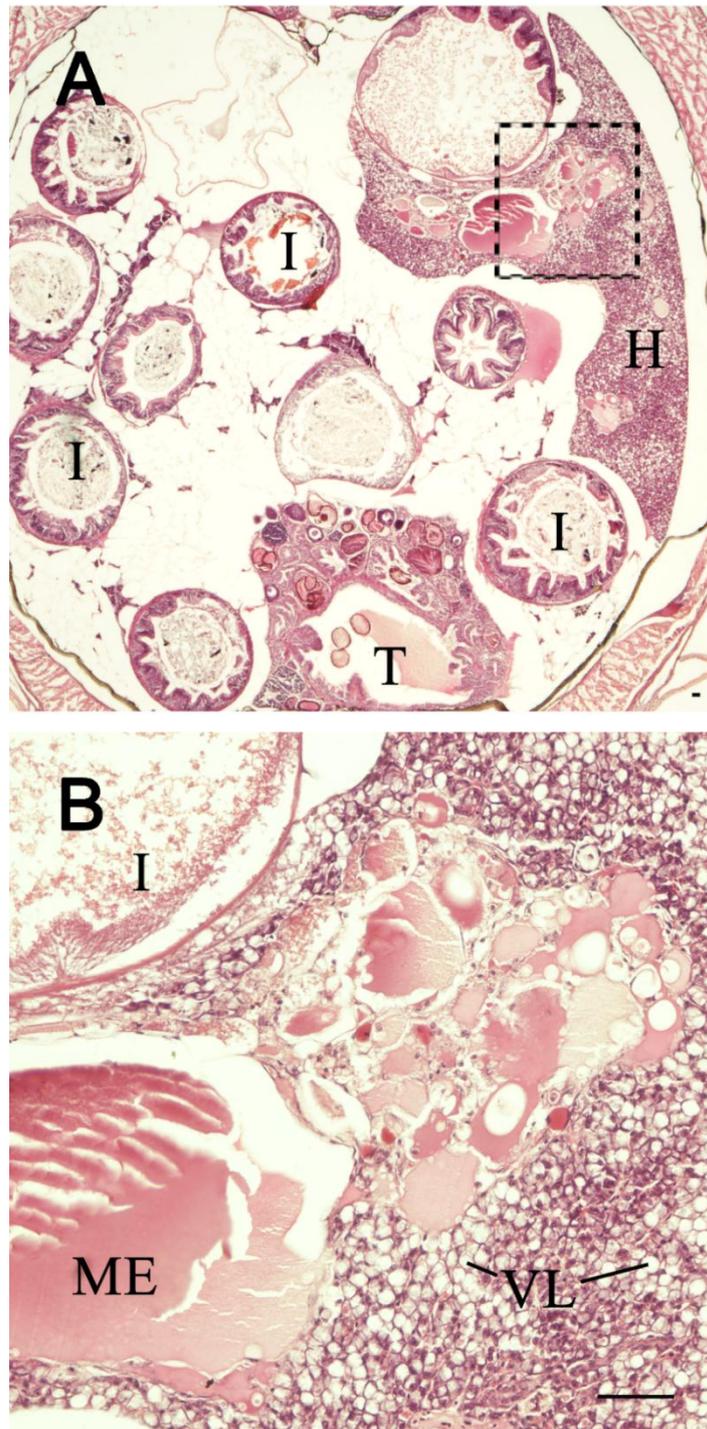


Figura 83. Histología hepática de machos adultos de *C. decemmaculatus* con alteración avanzada, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L de EE₂ durante 16 semanas. Estos cortes histológicos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Las puntas de flechas indican la ubicación de células en necrosis. H: hígado; I: intestino; T: testículo; VL: macrovesículas lipídicas; ME: material eosinófilo (Barra = 50 μ m).

El I_{org} hepático fue afectado por la exposición a EE₂ (ANOVA, $p < 0,001$), como se muestra en la Figura 84. El valor del índice sólo fue significativamente mayor en los peces expuestos a 200 ng/L durante 16 semanas, respecto a los peces del tratamiento control (Tukey, $p < 0,001$).

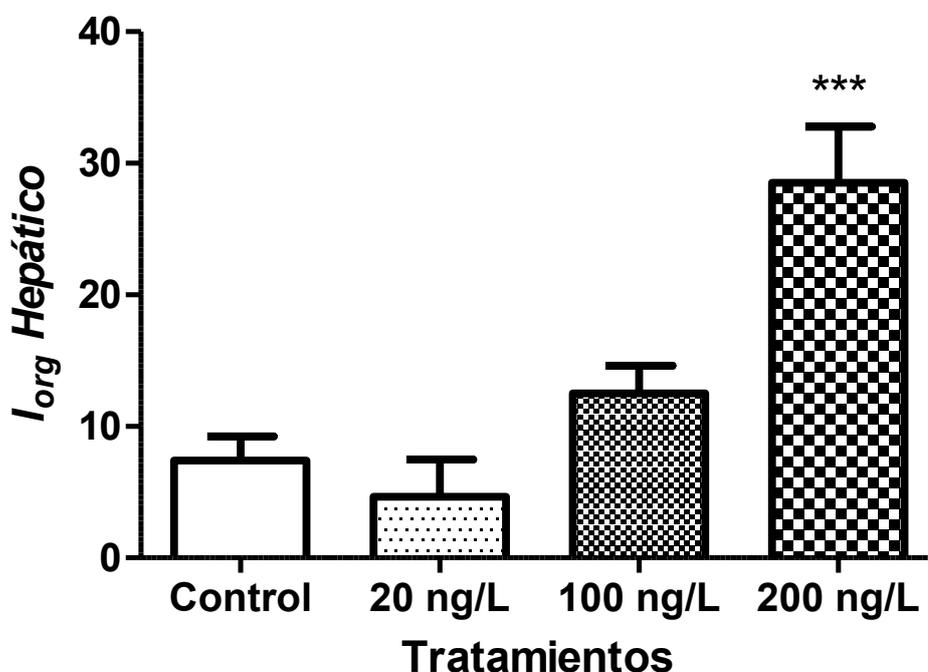


Figura 84. Daño hepático en machos adultos de *C. decemmaculatus* luego de 16 semanas de exposición a EE₂. Se muestran valores promedio (\pm error estándar) del I_{org} (del inglés, *organ index*). Los asteriscos (***) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con EE₂ y el control ($p < 0,001$).

Puntos finales ecotoxicológicos

Los valores estimados de NOEC y LOEC del factor de condición, de histología gonadal y del I_{org} hepático para los tiempos de exposición correspondientes a la semana 8 y 16, se muestran en la Tabla 12. Entre los puntos finales evaluados, el porcentaje de peces con *testis-ova* resultó la variable más sensible, la cual respondió tempranamente (semana 8 de exposición) en la concentración intermedia (100 ng/L). Fue necesario el tiempo más prolongado de exposición (16 semanas) para obtener una respuesta del factor de condición en la misma concentración y del I_{org} hepático en la más alta concentración

testeada (200 ng/L). Aunque cabe resaltar que algunas alteraciones histológicas que componen este índice de daño comenzaron a responder en 100 ng/L, como por ejemplo la esteatosis macrovesicular.

Tabla 12. Valores de NOEC y LOEC estimados en machos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂.

Punto final	8 semanas		16 semanas	
	NOEC (ng/L)	LOEC (ng/L)	NOEC (ng/L)	LOEC (ng/L)
<i>K</i>	200	-	20	100
Porcentaje de peces intersexos	20	100	20	100
<i>I</i> _{org} Hepático	nd	nd	100	200

K: factor de condición; nd: no determinado.

Discusión

Los poecílidos han sido ampliamente utilizados en todo el mundo para evaluar efectos de EDCs debido a su marcado dimorfismo sexual. Sin embargo, las especies Sudamericanas de esta familia han sido pobremente exploradas para la evaluación de tales efectos y por lo tanto se desconoce su sensibilidad a EDCs. En el presente capítulo se evaluaron los efectos sobre la morfología del gonopodio, la histología gónadal y hepática de machos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a un xenoestrógeno modelo por vía de exposición acuática, teniendo en cuenta concentraciones de interés toxicológico y ambiental.

La inducción de *testis-ova* inducido por la exposición a EE₂ en machos adultos fue el hallazgo más significativo en este capítulo. Dicho proceso tuvo una respuesta tiempo- y concentración-dependiente, el cual procede gradualmente desde la aparición de algunos oocitos primarios en la periferia del testículo hasta la alteración de toda la histoarquitectura de la gónada. Se modificaron tanto el número y proporción de cada tipo de gameta, como así también el de las células somáticas, como por ejemplo las células intersticiales y las del epitelio del ducto eferente. Estas alteraciones podrían llegar a producir una eventual discapacidad reproductiva de los machos. La inducción de

intersexos por xenoestrógenos se encuentran documentadas en diferentes especies de peces gonocóricos de Europa (*Rutilus rutilus*, *Gobio gobio*, *Platichthys flesus*, *Xiphias gladius*) e incluso hay antecedentes en Sudamérica (*Astyanax scabripinnis*) (Nolan *et al.*, 2001; Rodgers-Gray *et al.*, 2001; Kirby *et al.*, 2004; Pereira de Sá *et al.*, 2008). Existen antecedentes de alteraciones histológicas de poecílicos expuestos a EDCs (Elias *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Kaptaner y Ünal, 2011), sin embargo, sólo se ha documentado previamente la inducción de intersexos en ejemplares de *G. affinis* expuestos al andrógeno 17 β -trembolona (Sone *et al.*, 2005). Por lo tanto, considerando la literatura disponible, este sería el primer estudio documentando la inducción de intersexos causada por la exposición a estrógenos en poecílicos a nivel mundial, sugiriendo que esta respuesta podría ser hallada en otras especies de la familia.

El daño hepático, indicado por *I_{org}*, fue otro importante efecto inducido por EE₂ en machos adultos de *C. decemmaculatus*, el cual respondió en forma concentración y tiempo dependiente. Las alteraciones observadas comenzaron con una leve esteatosis macrovesicular y necrosis celular (como, por ejemplo, algunas células apoptóticas aisladas), y luego se observó un progresivo incremento de la esteatosis macrovesicular con degeneración cística en diversos sectores del hígado lleno de un material eosinófilo floculante. La esteatosis inducida por EE₂ en machos juveniles de *Etheostoma caeruleum* (Elias *et al.*, 2007) y por 17 β -estradiol (E₂) en machos de *Rhamdia quelen* (Costa *et al.*, 2010) ha sido previamente documentada. Además, se han observado hepatocitos apoptóticos (considerados como una forma de necrosis) inducidos por la exposición a EE₂ en *Oryzias latipes* y *Chalcalburnus tarichi* (Weber *et al.*, 2004; Kaptaner y Ünal, 2011). De acuerdo con estos estudios, el incremento en el contenido de lípidos podría deberse a la síntesis de lipoproteínas inducidas por estrógenos, las cuales se encuentran involucradas en la producción de vitelogenina y vitelo. También se ha documentado la degeneración y la necrosis de los hepatocitos de ratas alimentadas con altas concentraciones de EE₂ (Pandey *et al.*, 2011). Además, se ha interpretado a la necrosis celular (ej. por apoptosis) como un efecto directo de hepatotoxicidad inducida por EE₂. La alteración de la estructura de los cistos no ha sido previamente documentada en peces expuestos a EE₂. Sin embargo, este efecto fue descrito en ratas expuestas a otro tipo de xenobióticos. A pesar de ello, el mecanismo de este proceso patológico no se encuentra completamente comprendido. Esto podría ocurrir como una consecuencia indirecta de la exposición a EE₂ debido a la síntesis y acumulación anormal de vitelogenina. Sin

embargo, serán necesarios futuros estudios para comprender dicho proceso histopatológico.

El factor de condición fue otro parámetro biológico de interés que resultó afectado en la máxima concentración de EE₂ testada (200 ng/L). En la mayoría de los estudios realizados con otras especies de peces expuestas a EE₂, se han publicado la pérdida de peso y de condición como respuestas que son afectadas por este compuesto (Metcalf *et al.*, 2001; Pawlowski *et al.*, 2004). Sin embargo, el incremento en el factor de condición de machos de *C. decemmaculatus* observado en este estudio, parecería ser una respuesta específica de la especie, dada probablemente por un efecto anabólico del EE₂. Por lo tanto, en este caso el incremento en el factor de condición sería entendido como un daño en la salud de los peces (peces gordos y enfermos).

Entre todas las respuestas biológicas estudiadas, los resultados más inesperados fueron aquellos relacionados con la morfología del gonopodio. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el gonopodio completamente desarrollado de un macho adulto de *C. decemmaculatus* parecería ser totalmente insensible a un potente compuesto estrogénico como el EE₂, incluso en concentraciones relativamente elevadas tales como las halladas en efluentes cloacales. Se ha documentado que el desarrollo del gonopodio en otras especies de poecílidos se encuentra regulado hormonalmente (Ogino *et al.*, 2004; Offen *et al.*, 2013). Consecuentemente, diversos autores han utilizado las características morfológicas de la aleta anal para evaluar respuestas a la exposición a EDCs. Por ejemplo, se ha visto que el gen sonic hedgehog (*Shh*), inducido por los receptores de andrógenos, se encuentra involucrado en el desarrollo del gonopodio y que la exposición a un agonista de andrógenos fue capaz de modular dicho mecanismo (Ogino *et al.*, 2004). Aunque menos estudiado, también se ha documentado que el desarrollo del gonopodio puede ser alterado por exposición a compuestos estrogénicos. Tanto EE₂ como E₂ han demostrado su capacidad de alterar el desarrollo del gonopodio y la talla en machos juveniles de *Gambusia affinis* y *G. holbrooki* (Doyle y Lim, 2002; Angus *et al.*, 2005). Sin embargo, al igual que en este estudio, cuando se expusieron machos adultos de *G. affinis* a E₂ no se han observado alteraciones del gonopodio completamente formado (Doyle y Lim, 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos en la presente tesis, la ventana de sensibilidad parecería ser crítica para las respuestas a nivel del gonopodio en poecílidos y que, una vez que se haya desarrollado, el gonopodio se torna insensible a los estrógenos. Esto es coherente con los resultados obtenidos en el Capítulo N°3.

Desde una perspectiva ambiental, los puntos finales ecotoxicológicos tales como NOEC y LOEC son parámetros útiles para la evaluación de potenciales riesgos de contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos. De acuerdo con los valores de NOEC y LOEC de los puntos finales estimados, la respuesta biológica más sensible resultó ser la inducción de intersexos, considerando tanto el tiempo de exposición como la concentración. Luego de 8 semanas de exposición, se obtuvieron valores de 20 y 100 ng/L para NOEC y LOEC respectivamente. Las concentraciones de EE₂ reportadas para efluentes cloacales y cuerpos de agua receptores en el área de distribución de *C. decemmaculatus* en Argentina fueron de 187 y 43 ng/L, respectivamente (Valdés *et al.*, 2015). Además, las máximas concentraciones halladas en aguas superficiales de Brasil, otro país latinoamericano, fueron de 54,0 y 63,8 ng/L (Moreira *et al.*, 2011). Por lo tanto, sería esperable que, en cursos de agua con caudales bajos y receptores de descargas cloacales, se pudieran encontrar machos adultos de *C. decemmaculatus* externamente normales, pero con *testis-ova*. Recientemente, Zambrano *et al.* (2018) han muestreado machos adultos de *C. decemmaculatus* en sitios del Río Suquía (Córdoba, Argentina) donde se ha detectado la presencia de compuestos estrogénicos (Valdés *et al.* (2014). En dicho estudio, mostraron la relación de la baja calidad del agua con diversos parámetros de condición general y de la morfología del gonopodio, así como también con la histología hepática.

En conclusión, el presente capítulo de tesis muestra por primera vez que la gónada y el hígado de machos adultos *C. decemmaculatus* son sensibles a EE₂. Sin embargo, el gonopodio completamente desarrollado ha sido insensible a la acción del xenoestrógeno. Es importante resaltar que, entre los diferentes puntos finales evaluados, sólo los testículos fueron afectados por concentraciones usualmente encontradas en efluentes cloacales.

DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha mencionado previamente, *Cnesterodon decemmaculatus* es una especie nativa ampliamente distribuida en cuerpos de agua dulce de Argentina, Brasil y Uruguay (Froese y Pauly, 2018) y ha sido utilizada en diversos estudios ecotoxicológicos, tales como bioensayos de letalidad y subletalidad (biomarcadores de estrés oxidativo, genotoxicidad y bioquímicos) (de la Torre *et al.*, 1997; de la Torre *et al.*, 2005; Carriquiriborde *et al.*, 2007; Candiotti *et al.*, 2010). A su vez, presenta la ventaja de ser un organismo que puede ser fácilmente mantenido bajo condiciones controladas de laboratorio (Somma *et al.*, 2011).

En cuanto a la biología reproductiva, se sabe que *C. decemmaculatus* es ovovivípara y posee dimorfismo sexual. Además, la estructura de las gónadas de los adultos ha sido detalladamente descrita, particularmente en machos (Siccardi, 1954; Sotelo y Trujillo-Cenóz, 1958; Parenti *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento, no había sido descrito el proceso de diferenciación sexual en esta especie.

En este marco, uno de los aportes importantes de esta tesis ha sido que por primera vez se ha descrito el desarrollo gonadal desde etapas tempranas, encontrando que en todos los individuos las gónadas de *C. decemmaculatus* ya se encuentran diferenciadas, como ovarios o testículos, al momento del nacimiento. Comparando con lo estudiado en otras especies de poecílidos, se encontró un sólo trabajo en el que se había descrito el mismo fenómeno para *G. affinis* (Koya *et al.*, 2003). Sin embargo, estos autores describieron que, durante la embriogénesis, primero se observan sólo oocitos primarios en todas las gónadas y luego, en el caso del desarrollo testicular, estos oocitos regresionan a medida que se desarrollan elementos de la línea testicular. A este proceso, Koya *et al.* (2003) lo denominaron como hermafroditismo temporal, mientras que anteriormente, Devlin y Nagahama (2002) lo llamaron “desarrollo indiferenciado”, denominación que se utiliza actualmente. Dado que en la presente tesis sólo se estudiaron las etapas de desarrollo gonadal desde el nacimiento y no durante las etapas de gestación, se desconoce si en *C. decemmaculatus* sucede un proceso similar. Sin dudas, ello resulta un tema interesante para futuros estudios. Además, en el presente estudio se observó que la relación de sexos verificada mediante histología gonadal, mostró un número equivalente de machos y de hembras, conduciendo a pensar que el sexo gonadal en *C. decemmaculatus* estaría determinado genéticamente.

Desde un punto de vista práctico, conocer que al momento de nacer los individuos ya se encuentran sexualmente diferenciados, resulta de gran relevancia dado que ello indicaría que en individuos recién nacidos ya pueden encontrarse activadas vías de regulación endócrina dimórficas que puedan responder de modo diferencial a contaminantes que actúen sobre tal sistema, y en el marco de esta tesis, contribuye a interpretar los resultados obtenidos en los ensayos de exposición a EE₂ durante etapas tempranas.

En cuanto al proceso de desarrollo de las gónadas de *C. decemmaculatus* desde el nacimiento y hasta la madurez sexual, se observó que en ambos sexos las mismas primero presentan dos lóbulos independientes que posteriormente se fusionan formando un único órgano semejante al que ocurre en otras especies de poecílidos. Tal fenómeno ha sido previamente descrito en *Gambusia affinis*, *Xiphophorus maculatus*, *X. pygmaeus-nigrensis* y *X. nigrensis* (Kramer y Kallman, 1985; Koya *et al.*, 2003). Describir por primera vez dicho proceso en *C. decemmaculatus* ha resultado indispensable para luego poder identificar las alteraciones producto de las exposiciones a EE₂.

Conjuntamente con el desarrollo gonadal, se ha determinado por vez primera en este estudio, el tiempo de diferenciación de los caracteres sexuales secundarios de *C. decemmaculatus*, encontrando que dicho evento es extremadamente variable entre individuos. El carácter sexual secundario más conspicuo en poecílidos es el gonopodio, que como ya se mencionara en el Capítulo N°1, es el órgano copulador masculino, que se origina a partir de una serie de cambios morfológicos que sufre la aleta anal. Las primeras manifestaciones morfológicas del proceso implican el engrosamiento del tercer radio y la elongación de los radios tercero, cuarto y quinto. El proceso es semejante al previamente documentado en detalle para *G. affinis* (Turner, 1941a). Debido a la transformación de la aleta anal, el fenotipo macho de *C. decemmaculatus* puede ser identificado antes que el fenotipo hembra, al formarse el primordio gonopodial. Sin embargo, en este estudio se demostró que, tanto para el desarrollo del gonopodio como para el de las gónadas, el tamaño del individuo tiene mayor importancia que la edad. Observaciones semejantes han sido documentadas para el desarrollo gonadal y los caracteres sexuales secundarios de otras especies de peces (Fuiman *et al.*, 1998; Adriaens y Verraes, 2002; Sæle y Pittman, 2010). Un ejemplo de esto es lo documentado en especies como el pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, donde el proceso de diferenciación gonadal también está íntimamente ligado al crecimiento (Karube *et al.*, 2007; Chalde *et al.*, 2011). Esto es sumamente importante porque permite advertir que, en ambientes naturales, sería posible encontrar ejemplares

de *C. decemmaculatus* indiferenciados que probablemente han nacido antes que otros individuos completamente diferenciados y que por tanto el reconocimiento de las diferentes cohortes en estudios a campo no resultaría trivial. Se desconoce la razón por la cual algunos individuos crecen y se desarrollan más rápido que otros, pero algunas observaciones realizadas durante esta tesis sugerirían la existencia de una cierta dominancia entre individuos, encontrando ejemplares dominantes y subordinados, de un modo equivalente al previamente descrito para *Xiphophorus variatus* (Borowsky, 1973).

En la presente tesis, se han propuesto cinco estadios de desarrollo del ovario y del testículo de *C. decemmaculatus* y se estableció una relación con distintos parámetros de condición general y de desarrollo del gonopodio. De la misma manera, en otras especies de poecílidos se han publicado descripciones de los estadios del desarrollo gonadal (Van den Hurk, 1974), de los estadios de la morfogénesis de la aleta anal (Kramer y Kallman, 1985) y de la relación entre estos parámetros (Schreibman *et al.*, 1982). La relación entre el desarrollo de las gónadas con el momento en que se manifiestan los caracteres sexuales secundarios nos permite comprender cómo ocurre el desarrollo sexual, aunque aún faltarían nuevos estudios para dilucidar qué posibles mecanismos fisiológicos y moleculares se encuentran involucrados.

La diferenciación gonadal y el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios se encuentra regulada por las hormonas sexuales, entre ellas los estrógenos. Por ello, el desarrollo gonadal y gonopodial podrían ser susceptibles de ser alterados por la exposición a contaminantes ambientales con actividad estrogénica. En esta tesis se seleccionó al 17 α -etinilestradiol (EE₂) como un xenoestrógenos de referencia. Entre los efectos observados se registró no sólo un retraso sino también la interrupción del desarrollo del gonopodio de *C. decemmaculatus* en los ejemplares expuestos a EE₂ desde etapas tempranas, mientras que no se encontraron efectos sobre esta estructura en machos adultos. Se ha demostrado en *G. affinis* que los andrógenos juegan un papel muy importante en etapas tempranas del desarrollo del gonopodio (Ogino *et al.*, 2004; Ogino *et al.*, 2018). Por lo tanto, resulta razonable que exposiciones a xenoestrógenos durante estas etapas del ciclo de vida, interfieran con el balance entre andrógenos y estrógenos y afecten la morfogénesis del gonopodio. En este sentido, diversos autores han publicado alteraciones morfológicas del gonopodio en poecílidos machos de otras especies, expuestos a compuestos estrogénicos (Toft y Baatrup, 2001, 2003; Toft *et al.*, 2003). Por ejemplo, experimentos bajo condiciones de flujo continuo, han demostrado que juveniles

de *G. holbrooki* expuestos a concentraciones iguales o mayores a 100 ng/L de E₂ durante 84 días, evidencian un acortamiento del gonopodio y una reducción de la relación en la longitud entre el cuarto y sexto radio (Doyle y Lim, 2002). Sin embargo, la ausencia de efectos del EE₂ sobre el gonopodio de machos adultos en *C. decemmaculatus* estuvo acorde con los resultados obtenidos por Doyle y Lim (2005), quienes expusieron machos adultos de *G. holbrooki* a E₂ durante 84 días. Ello indicaría que, una vez que se encuentra completamente formada, esta estructura resulta insensible a la acción de los EDCs. Esto podría deberse a la imposibilidad de revertirse la longitud del gonopodio, luego de que ocurra la osificación de los radios. El índice gonopodial, ha sido utilizado para evidenciar la masculinización de hembras de *Gambusia holbrooki*, *Heterandria formosa* y *Poecilia latipinna*, expuestas a efluentes de pulpa de celulosa en USA (Bortone y Cody, 1999). Recientemente, también se ha utilizado para documentar el hallazgo de hembras masculinizadas de *C. decemmaculatus* que habitaban en aguas superficiales de Uruguay (Vidal *et al.*, 2018).

Uno de los principales hallazgos en esta tesis fue la inducción de intersexos o *testis-ova* en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂. Este efecto ha sido bien documentado en diversas especies de peces. Por ejemplo, en *Danio rerio*, expuesto crónicamente a bajas concentraciones de EE₂ desde estadios de vida tempranos (Nash *et al.*, 2004), o también en *Rutilus rutilus* L. expuestos a efluentes cloacales (Rodgers-Gray *et al.*, 2001). A su vez, se ha publicado la aparición de intersexos en capturas realizadas en ambientes naturales del Reino Unido en poblaciones de *R. rutilus* L. (Jobling *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 2001), *Gobio gobio* (van Aerle *et al.*, 2001), *Platichthys flesus* (Kirby *et al.*, 2004) y *Cyprinus carpio* (Solé *et al.*, 2003), en *Xiphias gladius* en el Mar Mediterráneo (De Metrio *et al.*, 2003) y en *Astyanax scabripinnis* en Brasil (Pereira de Sá *et al.*, 2008). En contraposición, ninguna de las publicaciones disponibles en las que diversos autores evaluaron histología gonadal de poecílidos expuestos a compuestos estrogénicos, se detectaron intersexos (Leusch *et al.*, 2006).

En los experimentos de juveniles de *C. decemmaculatus* expuestos a EE₂, se encontraron efectos sobre la supervivencia, el crecimiento, la histología gonadal y la proporción de sexos. Inesperadamente, se observó también que el EE₂ fue capaz de inducir una pigmentación externa en la región perianal. Una posible explicación, sería que los compuestos estrogénicos estén induciendo la síntesis de melanina en las células epiteliales que rodean la zona anal. En células epiteliales humanas, se ha demostrado que

la melanogénesis puede ser inducida por acción directa de estrógenos endógenos (E_2) y exógenos (EE_2) (Natale *et al.*, 2016; Snyder *et al.*, 2017). También se sabe que estos esteroides sexuales pueden inducir la melanogénesis vía señalización de cAMP por unión a GPER, un receptor de estrógenos acoplado a la proteína G (Filardo *et al.*, 2002; Natale *et al.*, 2016). Futuros estudios podrían contribuir a explicar los mecanismos por los cuales los estrógenos inducen dicha pigmentación de las células que rodean la zona perianal de *C. decemmaculatus*. Tal manifestación fenotípica resultaría de gran utilidad en estudios ecotoxicológicos como un potencial biomarcador de exposición a este tipo de compuestos. Estudios preliminares realizados a campo en el marco de esta tesis, detectaron la presencia de dicha pigmentación en poblaciones de *C. decemmaculatus* que habitaban cursos de agua receptores de descarga de efluentes cloacales, con una frecuencia cercana al 30%. Sin embargo, dichos animales no mostraron alteraciones ni en la gónada ni en el gonopodio.

Desde un punto de vista ecotoxicológico, contar con puntos finales estadísticos tales como CL_{50} , CE_{50} , NOEC y LOEC, resulta de gran utilidad dado que permite comparar los efectos adversos observados en los organismos y las concentraciones de los EDCs encontradas en el ambiente. Tal información resulta un insumo indispensable en las evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. En los machos adultos, la inducción de intersexos por la exposición a EE_2 arrojó valores de NOEC y LOEC de 20 y 100 ng/L, respectivamente. Estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los reportados en estudios previos donde evaluaron efectos sobre la relación entre el largo del cuarto y sexto radio del gonopodio en *G. holbrooki* (Doyle y Lim, 2002). En Argentina, se ha detectado simultáneamente la presencia de diferentes compuestos estrogénicos en aguas, efluentes y sedimentos. Por tanto, la potencia estrogénica total de dichas mezclas sería mayor que la de cada compuesto individualmente (Tabla 13). Entre las sustancias encontradas se incluyen E_1 (Valdés *et al.*, 2014), E_2 (Valdés *et al.*, 2015), EE_2 (Martínez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2015; Scala-Benuzzi *et al.*, 2018) y NF (Babay *et al.*, 2008; Babay *et al.*, 2014). Por ejemplo, en la Región Pampeana se han determinado concentraciones de EE_2 entre 43 y 187 ng/L, tanto en aguas receptoras como en efluentes cloacales crudos, respectivamente (Valdés *et al.*, 2015). El LOEC para las alteraciones observadas a nivel de la histología gonadal y la aparición de la pigmentación en la zona perianal en ejemplares de *C. decemmaculatus* en estadios de desarrollo temprano fue de 30 ng/L, por tanto, las concentraciones de este compuesto en

aguas superficiales superarían dichos valores. Incluso la CE₅₀-13 semanas para la pigmentación en la zona perianal, se encuentra en valores de 39,3 ng/L. También, la CL₅₀-13 semanas estimada fue de 109,9 ng/L de EE₂, la cual se encuentra entre las concentraciones halladas en los cuerpos de agua receptores y los efluentes. Por otro lado, cuando se observa el valor de NOEC estimado para la aparición de oocitos en el testículo de machos adultos, se puede mencionar que éste se encontraba por debajo de los valores máximos reportados para aguas receptoras en los ambientes donde habita *C. decemmaculatus*. En el caso del valor de LOEC, ha sido superior a las concentraciones ambientales. Todo esto estimaría una baja probabilidad de hallar efectos para ejemplares adultos en estos cuerpos de agua, pero una elevada probabilidad de hallar efectos de compuestos estrogénicos expuestos desde estadios tempranos del ciclo de vida.

Finalmente, las alteraciones inducidas a nivel de la gónada de los machos adultos (*testis-ova*) y del desarrollo de los juveniles por el xenoestrógeno modelo estudiado, muestran a *C. decemmaculatus* como una especie útil para el desarrollo de bioensayos de laboratorio dirigido a estudiar efectos estrogénicos, empleando dichas respuestas como puntos finales de evaluación. Algunos organismos internacionales de normalización como la OECD, han propuesto una diversidad de bioensayos destinados a evaluar los efectos de EDCs sobre peces (Hutchinson *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2006). Sin embargo, Argentina no cuenta con este tipo de herramientas ecotoxicológicas con peces nativos. Los puntos finales propuestos para *C. decemmaculatus* presentan la ventaja de ser muy relevantes desde un punto de vista biológico y ecológico, ya que si la reproducción se encuentra comprometida, esto puede llevar incluso al colapso poblacional, tal como fuera reportado para otra especie de peces (Kidd *et al.*, 2007). Otra ventaja para destacar es que, para evaluar estos puntos finales, relacionados a la histología y los parámetros morfológicos externos, no se requiere de gran infraestructura o equipamiento sofisticado, resultando relativamente económico en términos de costo-beneficio. Sin embargo, una desventaja que se puede mencionar es el tiempo que se requiere para determinar este tipo de efectos. Por ello, sería interesante que futuros estudios aborden los mecanismos moleculares por los cuales ocurren tales efectos, tal como los bioensayos propuestos por Scholz y Mayer (2008). Tal aproximación permitiría acortar los tiempos de evaluación, aunque aumentarían los costos en reactivos, equipamiento, infraestructura y personal altamente especializado necesarios para realizarlos.

La utilización de peces nativos como organismos de prueba, en comparación con especies exóticas modelo, suele presentar la dificultad asociada a que para la mayoría de ellos se desconocen varios aspectos de su biología reproductiva y se cuenta con herramientas bioquímicas (ej. anticuerpos) y moleculares (ej. secuencias de genes de interés). Sin embargo, presenta la gran ventaja vinculada a que permiten comparar directamente los efectos observados en el laboratorio con aquellos que se manifiestan en los individuos que naturalmente habitan en los cuerpos de agua de la región, evitando así las extrapolaciones y la introducción de especies.

Tabla 13. Estadística descriptiva de las concentraciones de compuestos estrogénicos publicadas en distintas matrices ambientales de Argentina.

Matriz ambiental	Compuesto	Unidades	n	Estadística descriptiva			
				Media (\pm DE)	Mediana	Mínimo	Máximo
Agua superficial	E ₁	ng/L	1	6	6	6	6
	E ₂	ng/L	1	369	369	369	369
	EE ₂	ng/L	14	10,2 \pm 10,1	7,7	2,8	43,0
	NF	μ g/L	13	3,8 \pm 7,2	1,6	0,1	27,0
Agua de consumo	EE ₂	ng/L	3	2,0 \pm 0,3	2,1	1,6	2,2
Efluente cloacal	E ₂	ng/L	3	307,7 \pm 281,0	170	122	631
	EE ₂	ng/L	3	110,7 \pm 66,5	80	65	187
	NF	μ g/L	2	21,0 \pm 19,8	21	7	35
Sedimento	NF	μ g/kg	11	1206,5 \pm 1830,1	544	21	6359

E₁: estrona; E₂: 17 β -estradiol; EE₂: 17 α -etinilestradiol; NF: 4-nonilfenol. Elaboración propia en base a los antecedentes reportados por Babay *et al.* (2008), Babay *et al.* (2014), Martínez *et al.* (2010), Martínez *et al.* (2012), Scala-Benuzzi *et al.* (2018) y Valdés *et al.* (2015).

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis, se logró describir el desarrollo de las gónadas y del gonopodio de *C. decemmaculatus*, lo cual permitió evaluar luego cómo es éste afectado por perturbadores endocrinos con actividad estrogénica en distintos momentos del ciclo de vida. A su vez, se lograron identificar respuestas biológicas útiles para evaluar perturbación estrogénica en estudios ecotoxicológicos. Por consiguiente, las principales conclusiones que se obtuvieron son:

- El registro de los parámetros de condición general y de los caracteres sexuales externos desde el nacimiento hasta la adultez, permitió proponer 4 estadios que describen la morfogénesis del gonopodio, los cuales fueron comparados con la estructura de la aleta anal de la hembra. Basándose en el uso de la longitud del cuarto radio de la aleta anal, el índice gonopodial y el índice de elongación como principales parámetros cuantitativos, los primeros indicios de diferenciación de los caracteres sexuales secundarios permitieron evidenciar que este dimorfismo depende más del tamaño que de la edad y comienza a manifestarse a partir de los 12,6 y 18,0 mm de largo estándar (32 y 85 mg de peso) para machos y hembras respectivamente. El principal descriptor que permite diferenciar a los machos de las hembras y de los ejemplares sexualmente indiferenciados es la aparición del primordio gonopodial. La formación de las sierras, ganchos y cirros en el extremo distal del gonopodio indican que los machos han alcanzado la madurez sexual. El uso del índice de desarrollo del gonopodio permite asignar cada uno de los estadios utilizando sólo 2 parámetros cuantitativos y 2 cualitativos, independizándose de la edad de los ejemplares.
- En cuanto a los aspectos relacionados a la biología reproductiva de *C. decemmaculatus*, uno de los principales hallazgos de esta tesis fue documentar que todos los ejemplares nacen con las gónadas histológicamente diferenciadas. Por ello, sería interesante que futuros estudios describan la morfogénesis de estas estructuras durante la embriogénesis. A su vez, la descripción de los cambios histológicos que caracterizan el desarrollo gonadal desde el nacimiento hasta la adultez permitió proponer 5 estadios de desarrollo para el ovario y 5 para el testículo. Ambas gónadas surgen como dos lóbulos independientes en ejemplares recién nacidos, que pueden ser claramente diferenciadas porque el ovario contiene

al menos un oocito primario, mientras que el testículo tiene las gonias organizadas en cistos. La relación establecida entre los distintos estadios de morfogénesis de la aleta anal y del desarrollo gonadal con las tallas y edades, puede ser de gran utilidad para estudios que se enfoquen sobre diversos aspectos de la biología reproductiva de esta especie, así como también para estudios ecotoxicológicos que necesiten la información para diseñar nuevos bioensayos de toxicidad.

- Los efectos evaluados sobre ejemplares expuestos crónicamente desde etapas tempranas del desarrollo a concentraciones ambientalmente relevantes para los sitios donde habita *C. decemmaculatus* (30 ng/L de 17 α -etinilestradiol, un EDC con actividad estrogénica conocida), permitieron identificar diversos puntos finales. Para los efectos letales, la CL₅₀-13 semanas estimada fue de 109,9 ng/L. Entre los efectos subletales, las alteraciones en la histología del ovario y del testículo, el retraso en el desarrollo del gonopodio y una reducción de machos con aumento de ejemplares indiferenciados en la proporción de sexos. A partir de 30 ng/L, se observaron algunos ejemplares con alteraciones en la histología gonadal, mientras que a partir de 100 ng/L, todos ellos presentaron algún tipo de alteración, incluyendo intersexos.
- En los experimentos realizados con machos adultos, se rechazó la hipótesis que afirmaba que el gonopodio completamente desarrollado podía ser alterado por exposición a EE₂. En cambio, la observación del estado de los testículos permitió verificar la aparición de elementos provenientes de la línea oogenética (femenina) dependientes del tiempo de exposición y de las concentraciones de EE₂, fenómeno que dentro de la ecotoxicología se conoce como intersexo o *testis-ova*. Este punto final podría ser utilizado como biomarcador histológico de efecto en experimentos realizados en el laboratorio o en capturas de ejemplares que habitan en ambientes naturales.
- El EE₂ es capaz de inducir, en ejemplares expuestos desde etapas tempranas del ciclo de vida en experimentos controlados de laboratorio en una relación concentración y tiempo-respuesta de una pigmentación en la zona perianal. Tal pigmentación fue también observada a campo en ejemplares colectados en ambientes contaminados con compuestos estrogénicos. Se presenta como un

potencial biomarcador de exposición a este tipo de compuestos y la CE_{50-13} semanas estimada para este efecto fue de 39,3 ng/L.

- Finalmente, los resultados obtenidos en la presente tesis alientan el empleo de *C. decemmaculaus* para protocolizar un bioensayo que permita cuantificar los efectos de la exposición a perturbadores endocrinos con actividad estrogénica. En este sentido, el EE₂ podría ser usado como tóxico de referencia (control positivo). Además, la etapa más sensible a EDCs transcurre durante las etapas tempranas de la diferenciación sexual.

REFERENCIAS

Abdulla Bin-Dohaish, E.-j., 2012. The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromus spilurs*) in Jeddah. *Biological research* 45, 15-20.

Abouelenien, F., Kitamura, Y., Nishio, N., Nakashimada, Y., 2009. Dry anaerobic ammonia–methane production from chicken manure. *Applied microbiology and biotechnology* 82, 757-764.

Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S.J., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2008. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol* 20, 394-405.

Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment international* 99, 107-119.

Adriaens, D., Verraes, W., 2002. An empirical approach to study the relation between ontogeny, size and age using geometric morphometrics. in: Aerts, P., D'Août, K., Herrel, A., Van Damme, R. (Eds.). *Topics in functional and ecological vertebrate morphology*. Maastricht, Shaker Publishing, pp. 293-324.

Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26, 499-509.

Al Hazzaa, R., Hussein, A., 2007. Larval development of himri, *Barbus luteus* (Cyprinidae: Cypriniformes) reared in the laboratory. *Turkish Journal of Zoology* 31, 27-33.

Amiri-Moghaddam, J., Maniei, F., Mahboobi-Soofiani, N., Asadollah, S., 2010. Use of 17 α -methyltestosterone for production of male secondary sexual characteristics in the adult female green swordtail (*Xiphophorus hellerii*) *International Journal of the Bioflux Society* 3, 1-8.

Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L., Petersen, G.I., 2003. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 134, 365-374.

Angus, R.A., McNatt, H.B., Howell, W.M., Peoples, S.D., 2001. Gonopodium Development in Normal Male and 11-Ketotestosterone-Treated Female Mosquitofish (*Gambusia affinis*): A Quantitative Study Using Computer Image Analysis. *General and Comparative Endocrinology* 123, 222-234.

Angus, R.A., Stanko, J., Jenkins, R.L., Watson, R.D., 2005. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of male western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 330-339.

Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, N.D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovic, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.-L.,

- Watanabe, K.H., 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology* 92, 168-178.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Cavallin, J.E., Martinovic, D., Wehmas, L.C., Mueller, N.D., Villeneuve, D.L., 2010. Use of chemical mixtures to differentiate mechanisms of endocrine action in a small fish model. *Aquat Toxicol* 99, 389-396.
- Aoki, Y., Nagao, I., Saito, D., Ebe, Y., Kinjo, M., Tanaka, M., 2008. Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Dev Dyn* 237, 800-807.
- Arciuli, M., Brunetti, A., Fiocco, D., Zacchino, V., Centoducati, G., Aloï, A., Tommasi, R., Santeramo, A., De Nitto, E., Gallone, A., 2015. A multidisciplinary study of the extracutaneous pigment system of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). A possible relationship between kidney disease and dopa oxidase activity level. *Fish Shellfish Immunol* 42, 184-192.
- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international* 69, 104-119.
- Awruch, C.A., 2016. Chapter 7: Reproduction strategies. in: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.). *Physiology of Elasmobranch Fishes: Structure and Interaction with Environment*. Academic Press, UK, pp. 255-310.
- Baatrup, E., Junge, M., 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environmental health perspectives* 109, 1063-1070.
- Babay, P.A., Itria, R.F., Romero Ale, E.E., Becquart, E.T., Gautier, E.A., 2014. Ubiquity of Endocrine Disruptors Nonylphenol and Its Mono- and Di-Ethoxylates in Freshwater, Sediments, and Biosolids Associated with High and Low Density Populations of Buenos Aires, Argentina. *CLEAN – Soil, Air, Water* 42, 731-737.
- 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. *Journal of environmental monitoring* : JEM 10, 443-452.
- Bagnara, J.T., Matsumoto, J., 2007. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. in: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Oetting, W.S., Ortonne, J. (Eds.). *The Pigmentary System*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, p. 1313 pp.
- Balunas, M.J., Su, B., Brueggemeier, R.W., Kinghorn, A.D., 2008. Natural Products as Aromatase Inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 8, 646-682.
- Bártíková, H., Podlipná, R., Skálová, L., 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144, 2290-2301.

- Basolo, A.L., 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science* 250, 808-810.
- Basolo, A.L., 1995. A further examination of a pre-existing bias favouring a sword in the genus *Xiphophorus*. *Animal Behaviour* 50, 365-375.
- Basolo, A.L., Trainor, B.C., 2002. The conformation of a female preference for a composite male trait in green swordtails. *Animal Behaviour* 63, 469-474.
- Batty, J., Lim, R., 1999. Morphological and Reproductive Characteristics of Male Mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) Inhabiting Sewage-Contaminated Waters in New South Wales, Australia. *Archives of environmental contamination and toxicology* 36, 301-307.
- Baumann, L., Holbech, H., Keiter, S., Kinnberg, K.L., Knorr, S., Nagel, T., Braunbeck, T., 2013. The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. *Aquat Toxicol* 128-129, 34-42.
- Bayley, M., Junge, M., Baatrup, E., 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic Toxicology* 56, 227-239.
- Behringer, R.R., Finegold, M.J., Cate, R.L., 1994. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415-425.
- Berlinsky, D.L., Taylor, J.C., Howell, R.A., Bradley, T.M., Smith, T.I.J., 2004. The Effects of Temperature and Salinity on Early Life Stages of Black Sea Bass *Centropristis striata*. *Journal of the World Aquaculture Society* 35, 335-344.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.
- Bieniarz, K., Epler, P., 1992. Advances in reproductive endocrinology of fish. *J Physiol Pharmacol* 43, 215-222.
- Bitgood, M.J., McMahon, A.P., 1995. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172, 126-138.
- Bitman, J., Cecil, H.C., 1970. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18, 1108-1112.
- Bitman, J., Cecil, H.C., Harris, S.J., Fries, G.F., 1968. Estrogenic activity of o,p'-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. *Science* 162, 371-372.
- Bittner, D., Bernet, D., Wahli, T., Segner, H., KÜng, C., Largiadèr, C.R., 2009. How normal is abnormal? Discrimination between deformations and natural variation in gonad morphology of European whitefish *Coregonus lavaretus*. *Journal of Fish Biology* 74, 1594-1614.

- Bogers, R., De Vries-Buitenweg, S., Van Gils, M., Baltussen, E., Hargreaves, A., van de Waart, B., De Roode, D., Legler, J., Murk, A., 2006. Development of chronic tests for endocrine active chemicals Part 2: An extended fish early-life stage test with an androgenic chemical in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 80, 119-130.
- Böhne, A., Schultheis, C., Galiana-Arnoux, D., Froschauer, A., Zhou, Q., Schmidt, C., Selz, Y., Ozouf-Costaz, C., Dettai, A., Segurens, B., Couloux, A., Bernard-Samain, S., Barbe, V., Chilmonczyk, S., Brunet, F., Darras, A., Tomaszewicz, M., Semon, M., Scharl, M., Volff, J.N., 2009. Molecular analysis of the sex chromosomes of the platyfish *Xiphophorus maculatus*: Towards the identification of a new type of master sexual regulator in vertebrates. *Integr Zool* 4, 277-284.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 109, 219-245.
- Borg, B., van den Hurk, R., 1983. Oocytes in the Testes of the Three-Spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Copeia* 1983, 259-261.
- Borowsky, R.L., 1973. Social Control of Adult Size in Males of *Xiphophorus variatus*. *Nature* 245, 332.
- Bortone, S.A., Cody, R.P., 1999. Morphological Masculinization in Poeciliid Females from a Paper Mill Effluent Receiving Tributary of the St. Johns River, Florida, USA. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 63, 150-156.
- Bortone, S.A., Davis, W.P., 1994. Fish intersexuality as an indicator of environmental stress. *Bioscience* 44, 165-172.
- Bortone, S.A., Davis, W.P., Bundrick, C.M., 1989. Morphological and Behavioral Characters in Mosquitofish as Potential Bioindication of Exposure to Kraft Mill Effluent. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 43, 370-377.
- Bratus, A., Slota, E., 2006. DMRT1/Dmrt1, the sex determining or sex differentiating gene in Vertebrata. *Folia Biol (Krakow)* 54, 81-86.
- Breder, C.M., 1926. The locomotion of fishes. *Zoologica* 4, 159-297.
- Breder, C.M., Rosen, D.E., 1966. Modes of reproduction in fishes. American Museum of Natural History, Natural History Press, Garden City, N.Y., USA.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68, 193-217.
- Britt, K.L., Stanton, P.G., Misso, M., Simpson, E.R., Findlay, J.K., 2004. The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinology* 145, 3950-3960.
- Brockmeier, E.K., Jayasinghe, B.S., Pine, W.E., Wilkinson, K.A., Denslow, N.D., 2014. Exposure to Paper Mill Effluent at a Site in North Central Florida Elicits Molecular-Level

Changes in Gene Expression Indicative of Progesterone and Androgen Exposure. PLOS ONE 9, e106644.

Brockmeier, E.K., Ogino, Y., Iguchi, T., Barber, D.S., Denslow, N.D., 2013. Effects of 17 β -trenbolone on Eastern and Western mosquitofish (*Gambusia holbrooki* and *G. affinis*) anal fin growth and gene expression patterns. Aquatic Toxicology 128–129, 163-170.

Brown, K.H., Schultz, I.R., Cloud, J.G., Nagler, J.J., 2008. Aneuploid sperm formation in rainbow trout exposed to the environmental estrogen 17 α -ethynylestradiol. PNAS 105, 19786-19791.

Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1986. The Decline of the Gastropod *Nucella Lapillus* Around South-West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 66, 611-640.

Burlington, H., Lindeman, V.F., 1950. Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. Proc Soc Exp Biol Med 74, 48-51.

Cabas, I., Chaves-Pozo, E., García Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A., 2011. Dietary intake of 17 α -ethynylestradiol promotes leukocytes infiltration in the gonad of the hermaphrodite gilthead seabream. Molecular Immunology 48, 2079–2086.

Cajthaml, T., Kresinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K., Rezanka, T., 2009. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987) 157, 3325-3335.

Cakmak, G., Togan, I., Severcan, F., 2006. 17 β -Estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. Aquatic Toxicology 77, 53-63.

Candioti, J.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2010. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). Mutation research 703, 180-186.

Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. Chemosphere 68, 613-621.

Cédat, B., de Brauer, C., Métivier, H., Dumont, N., Tutundjan, R., 2016. Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. Water research 100, 357-366.

Cerdá- Reverter, J.M., Canosa, L.F., 2009. Chapter 1: Neuroendocrine Systems of the Fish Brain. Fish Physiology. Academic Press, pp. 3-74.

Clark, R.L., Antonello, J.M., Grossman, S.J., Wise, L.D., Anderson, C., Bagdon, W.J., Prahalada, S., MacDonald, J.S., Robertson, R.T., 1990. External genitalia abnormalities in male rats exposed in utero to finasteride, a 5 α -reductase inhibitor. Teratology 42, 91-100.

- Cody, R.P., Bortone, S.A., 1997. Masculinization of Mosquitofish as an Indicator of Exposure to Kraft Mill Effluent. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 58, 429-436.
- Colborn, T., Clement, C., 1992. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The wildlife/Human Connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Princeton Scientific Pub, USA, pp. 129-145.
- Colman, J.R., Baldwin, D., Johnson, L.L., Scholz, N.L., 2009. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 91, 346-354.
- Costa, D.D., Neto, F.F., Costa, M.D., Morais, R.N., Garcia, J.R., Esquivel, B.M., Ribeiro, C.A., 2010. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17 β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 151, 248-257.
- Croxtall, J.D., McKeage, K., 2011. Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Drugs* 71, 363-380.
- Cunha, G.R., Chung, L.W., Shannon, J.M., Reese, B.A., 1980. Stromal-epithelial interactions in sex differentiation. *Biology of reproduction* 22, 19-42.
- Chalde, T., Fernández, D.A., Cussac, V.E., Somoza, G.M., 2011. The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis*: morphological indicators of development. *Neotropical Ichthyology* 9, 747-756.
- Chang, C., Lee, S.O., Wang, R.S., Yeh, S., Chang, T.M., 2013. Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. *Biology of reproduction* 89.
- Chapin, R.E., Stevens, J.T., Hughes, C.L., Kelce, W.R., Hess, R.A., Daston, G.P., 1996. *Endocrine Modulation of Reproduction. Fundamental and applied toxicology* 29, 1-17.
- Chelemal, M., Jamili, S., Sharifpour, I., 2009. Reproductive Biology and Histological Studies in Abu Mullet, *Liza abu* in the Water of the Khozestan Province. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 4, 1-11.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31-62.
- Davis, L.K., Fox, B.K., Lim, C., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hirano, T., Grau, E.G., 2009. Induction of vitellogenin production in male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by commercial fish diets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 154, 249-254.
- de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L., Salibian, A., 1997. Toxicity of Reconquista river water: bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 58, 558-565.

- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibian, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP 131, 271-280.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibian, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59, 577-583.
- De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., de la Serna, J.M., Megalofonou, P., Kime, D.E., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine pollution bulletin* 46, 358-361.
- De Mitcheson, Y.S., Liu, M., 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries* 9, 1-43.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10972-10976.
- Deakin, J.E., 2017. Implications of monotreme and marsupial chromosome evolution on sex determination and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 244, 130-138.
- Defelice, D.A., Rasch, E.M., 1969. Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in poeciliid fishes. *Journal of Experimental Zoology* 171, 191-207.
- Denslow, N.D., Bowman, C.J., Ferguson, R.J., Lee, H.S., Hemmer, M.J., Folmar, L.C., 2001. Induction of Gene Expression in Sheepshead Minnows (*Cyprinodon variegatus*) Treated with 17 β -Estradiol, Diethylstilbestrol, or Ethinylestradiol: The Use of mRNA Fingerprints as an Indicator of Gene Regulation. *General and Comparative Endocrinology* 121, 250-260.
- Denslow, N.D., Sepúlveda, M., 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. in: Babin, P.J., al., e. (Eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer, pp. 255-322.
- 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 Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Silvana, G., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 380-391.
- Di Marzio, W.D., Tortorelli, M.C., 1994. Effects of paraquat on survival and total cholinesterase activity in fry of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 52, 274-278.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2011. *InfoStat*.

- Díaz, N., Piferrer, F., 2017. Estrogen exposure overrides the masculinizing effect of elevated temperature by a downregulation of the key genes implicated in sexual differentiation in a fish with mixed genetic and environmental sex determination. *BMC genomics* 18, 973-973.
- Dietrich, D.R., Krieger, H.O., 2008. *Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish*. John Wiley & Sons, Inc.
- Dodds, E.C., Lawson, W., 1936. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* 137, 996.
- Doyle, C.J., Lim, R.P., 2002. The effect of 17 β -estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2719-2724.
- Doyle, C.J., Lim, R.P., 2005. Sexual behavior and impregnation success of adult male mosquitofish following exposure to 17 β -estradiol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 392-397.
- Drèze, V., Monod, G., Cravedi, J.-P., Biagianni-Risbourg, S., Le Gac, F., 2000. Effects of 4-Nonylphenol on Sex Differentiation and Puberty in Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology* 9, 93-100.
- Drysdale, D.T., Bortone, S.A., 1989. Laboratory Induction of Intersexuality in the Mosquitofish, *Gambusia affinis*, Using Paper Mill Effluent. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 43, 611-617.
- El-Greisy, Z.A., El-Gamal, A.E., 2012. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38, 59–66.
- Elias, E.E., Kalombo, E., Mercurio, S.D., 2007. Tamoxifen protects against 17 α -ethynylestradiol-induced liver damage and the development of urogenital papillae in the rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1879-1889.
- Eurostat, 2018. Chemicals production and consumption statistics.
- Facemire, C.F., Gross, T.S., Guillette, L.J., 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environmental health perspectives* 103, 79-86.
- Fan, P., Maximov, P.Y., Curpan, R.F., Abderrahman, B., Jordan, V.C., 2015. The molecular, cellular and clinical consequences of targeting the estrogen receptor following estrogen deprivation therapy. *Molecular and cellular endocrinology* 418 Pt 3, 245-263.
- Fenske, M., van Aerle, R., Brack, S., Tyler, C.R., Segner, H., 2001. Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 129, 217-232.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kimura, H., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2008a. Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal

development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics* 237, 3192-3199.

Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl-Mazzulla, P.H., Strussmann, C.A., Somoza, G.M., 2008b. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 2, 316-324.

Fick, J., Soderstrom, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G., 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 28, 2522-2527.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., Jr., Bland, K.I., 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology* 16, 70-84.

Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R., 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81, 219-231.

Foyle, T.P., 1993. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. *Journal of Fish Biology* 42, 699-712.

Franco-Belussi, L., Leite, G.B., Freitas, J.S., Oliveira, C.d., 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). 64, 261.

Frankel, T.E., Meyer, M.T., Kolpin, D.W., Gillis, A.B., Alvarez, D.A., Orlando, E.F., 2016a. Exposure to the Contraceptive Progestin, Gestodene, Alters Reproductive Behavior, Arrests Egg Deposition, and Masculinizes Development in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 50, 5991-5999.

Frankel, T.E., Meyer, M.T., Orlando, E.F., 2016b. Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Gen Comp Endocrinol* 234, 161-169.

Froese, R., Pauly, D., 2018. FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org/>.

Fry, D.M., Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213, 922-924.

Fry, D.M., Toone, C.K., Speich, S.M., Peard, R.J., 1987. Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxicological considerations. *Stud. Av. Biol* 10, 26-43.

Fucic, A., Gamulin, M., Ferencic, Z., Katic, J., Kraymer von Krauss, M., Bartonova, A., Merlo, D.F., 2012. Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environmental Health* 11, S8.

- Fuiman, L.A., Poling, K.R., Higgs, D.M., 1998. Quantifying Developmental Progress for Comparative Studies of Larval Fishes. *Copeia* 1998, 602-611.
- Fujimura, K., Okada, N., 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Dev Growth Differ* 49, 301-324.
- Fulton, T.W., 1911. The sovereignty of the sea - an historical account of the claims of England to the dominion of the British seas, and the evolution of the territorial waters : with special reference to the rights of fishing and the naval salute. Edinburgh and London.
- Furuichi, T., Kannan, K., Suzuki, K., Tanaka, S., Giesy, J.P., Masunaga, S., 2006. Occurrence of Estrogenic Compounds in and Removal by a Swine Farm Waste Treatment Plant. *Environmental Science & Technology* 40, 7896-7902.
- Gallone, A., Guida, G., Maida, I., Cicero, R., 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? *Pigment cell research* 15, 32-40.
- Game, C., Gagnon, M.M., Webb, D., Lim, R.P., 2006. Endocrine disruption in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting wetlands in Western Australia. *Ecotoxicology* 15, 665-672.
- García-Borrón, J.C., Solano, F., 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment cell research* 15, 162-173.
- García-Reyero, N., Kroll, K.J., Liu, L., Orlando, E.F., Watanabe, K.H., Sepúlveda, M.S., Villeneuve, D.L., Perkins, E.J., Ankley, G.T., Denslow, N.D., 2009. Gene expression responses in male fathead minnows exposed to binary mixtures of an estrogen and antiestrogen. *BMC Genomics* 10, 308.
- 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, M.E., Demichelis, S.O., de la Torre, E.R., Ferrari, L., 1998. Freshwater toxicity to *Cnesterodon* sp.: bioassays with water from the Reconquista River. *SIL Proceedings, 1922-2010* 26, 1216-1218.
- Gárriz, A., Menéndez-Helman, R.J., Miranda, L.A., 2015. Effects of estradiol and ethinylestradiol on sperm quality, fertilization, and embryo-larval survival of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Aquat Toxicol* 167, 191-199.
- Genovese, G., Da Cuña, R., Towle, D.W., Maggese, M.C., Lo Nostro, F., 2011. Early expression of zona pellucida proteins under octylphenol exposure in *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol* 101, 175-185.
- Genovese, G., Regueira, M., Da Cuña, R.H., Ferreira, M.F., Varela, M.L., Lo Nostro, F.L., 2014. Nonmonotonic response of vitellogenin and estrogen receptor alpha gene expression after octylphenol exposure of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol* 156, 30-40.

- Genovese, G., Regueira, M., Piazza, Y., Towle, D.W., Maggese, M.C., Lo Nostro, F., 2012. Time-course recovery of estrogen-responsive genes of a cichlid fish exposed to waterborne octylphenol. *Aquat Toxicol* 114-115, 1-13.
- Gercken, J., Sordyl, H., 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. *Marine environmental research* 54, 651-655.
- Ghedotti, M.J., 2000. Phylogenetic analysis and taxonomy of the poecilioid fishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 130, 1-53.
- Giesy, J.P., Ludwig, J.P., Tillitt, D.E., 1994. Deformities in birds of the Great Lakes region. Assigning causality. *Environmental Science & Technology* 28, 128A-135A.
- Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T., Komen, H., 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384, 221-222.
- Godwin, J., 2010. Neuroendocrinology of Sexual Plasticity in Teleost Fishes. *Frontiers in neuroendocrinology* 31, 203-216.
- Goetz, F.W., Donaldson, E.M., Hunter, G.A., Dye, H.M., 1979. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 17, 267-278.
- Gonzalez-Martinez, D., Zmora, N., Saligaut, D., Zanuy, S., Elizur, A., Kah, O., Munoz-Cueto, J.A., 2004. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 28, 1-15.
- Gonzalez-Martinez, D., Zmora, N., Zanuy, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., Munoz-Cueto, J.A., 2002. Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 23, 255-267.
- González, A., Fernandino, J.I., Somoza, G.M., 2015. Effects of 5 α -dihydrotestosterone on expression of genes related to steroidogenesis and spermatogenesis during the sex determination and differentiation periods of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 182, 1-7.
- Goo, I.B., Kim, J.E., Kim, M.H., Choi, H.S., Kong, H.J., Lee, J.H., Park, I.S., 2016. Gonadogenesis and Sex Differentiation in the Korean Rose Bitterling, *Rhodeus uyekii*. *Dev Reprod* 20, 289-296.
- Gordon, M., Rosen, D.E., 1951. Genetic of species differences in the morphology of the male genitalia of Xiphophorin fishes. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 95, 409-464.
- Gourmelon, A., Ahtiainen, J., 2007. Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances- the OECD perspective. *Ecotoxicology* 16, 161-167.

- Govoroun, M., McMeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., Guiguen, Y., 2001. 17 β -estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. *Endocrinology* 142, 1841-1848.
- Gray, L.E., Jr., Ostby, J., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., Goldman, J., Slott, V., Laskey, J., 1989. A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 12, 92-108.
- Grier, H., Linton, J., Leatherland, J., De Vlaming, V., 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal of Anatomy* 159, 331-345.
- Grier, H.J., Uribe, M.C., Parenti, L.R., De la Rosa, G., 2005. Fecundity, the germinal epithelium, and folliculogenesis in viviparous fishes. in: Grier, H.J., Uribe, M.C. (Eds.). *Viviparous Fishes*. New Life Publications, Homestead. Florida, USA, pp. 193-217.
- Gross-Sorokin, M.Y., Roast, S.D., Brighty, G.C., 2006. Assessment of Feminization of Male Fish in English Rivers by the Environment Agency of England and Wales. *Environmental health perspectives* 114, 147-151.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C., 2002. Production and Actions of Estrogens. *New England Journal of Medicine* 346, 340-352.
- Guellard, T., Sokołowska, E., Arciszewski, B., 2015. First report on intersex in invasive round goby *Neogobius melanostomus* from the Baltic Sea (Gulf of Gdańsk, Poland). *Oceanologia* 57, 102-106.
- Guerrero-Estevez, S., Moreno-Mendoza, N., 2012. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J Fish Biol* 80, 572-594.
- Guida, G., Maida, I., Gallone, A., Boffoli, D., Cicero, R., 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 34, 393-400.
- Guida, G., Zanna, P., Gallone, A., Argenzio, E., Cicero, R., 2004. Melanogenic response of the Kupffer cells of *Rana esculenta* L. to melanocyte stimulating hormone. *Pigment cell research* 17, 128-134.
- 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. *General and Comparative Endocrinology* 165, 352-366.
- Guilgur, L.G., Moncaut, N.P., Canario, A.V., Somoza, G.M., 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144, 272-283.
- Guillette Jr, L.J., Pickford, D.B., Crain, D.A., Rooney, A.A., Percival, H.F., 1996. Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. *General and Comparative Endocrinology* 101, 32-42.

- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental health perspectives* 102, 680-688.
- Guraya, S.S., 1994. Gonadal development and production of gametes in fish. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Part B* 60, 15- 32.
- Hall, J.M., Korach, K.S., 2003. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology* 17, 792-803.
- Hallers-Tjabbes, C.C.T., Kemp, J.F., Boon, J.P., 1994. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: Relation to shipping traffic intensities. *Marine pollution bulletin* 28, 311-313.
- Hannah, R., D'Aco, V.J., Anderson, P.D., Buzby, M.E., Caldwell, D.J., Cunningham, V.L., Ericson, J.F., Johnson, A.C., Parke, N.J., Samuelian, J.H., Sumpter, J.P., 2009. Exposure assessment of 17 α -ethinylestradiol in surface waters of the United States and Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2725-2732.
- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C., Szabo, N.J., Diaz, C.S., 2006. Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of environmental quality* 35, 695-700.
- Haraguchi, R., Mo, R., Hui, C., Motoyama, J., Makino, S., Shiroishi, T., Gaffield, W., Yamada, G., 2001. Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 128, 4241-4250.
- Harding, A.K., Daston, G.P., Boyd, G.R., Lucier, G.W., Safe, S.H., Stewart, J., Tillitt, D.E., Van Der Kraak, G., 2006. Endocrine disrupting chemicals research program of the U.S. Environmental Protection Agency: summary of a peer-review report. *Environmental health perspectives* 114, 1276-1282.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Matthiessen, P., Neall, P., Rycroft, R., Tylor, T., Jobling, S., Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1993-2002.
- Haselman, J.T., Kosian, P.A., Korte, J.J., Olmstead, A.W., Degitz, S.J., 2018. Effects of multiple life stage exposure to the fungicide prochloraz in *Xenopus laevis*: Manifestations of antiandrogenic and other modes of toxicity. *Aquatic Toxicology* 199, 240-251.
- Hattori, R.S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S.K., Sakamoto, T., Fernandino, J.I., Somoza, G.M., Yokota, M., Strussmann, C.A., 2012. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2955-2959.
- Hayes, D.B., Brodziak, J.K.T., O'Gorman, J.B., 1995. Efficiency and bias of estimators and sampling designs for determining length-weight relationships of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 84-92.

- Hayes, T.B., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool* 281, 373-399.
- Hayes, T.B., Stuart, A.A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., Kpodzo, D., 2006. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental health perspectives* 114 Suppl 1, 134-141.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *The New England journal of medicine* 284, 878-881.
- Herfeld, S., Moller, P., 1998. Effects of 17 α -methyltestosterone on sexually dimorphic characters in the weakly discharging electric fish, *Brienomyrus niger* (Gunther, 1866) (Mormyridae): electric organ discharge, ventral body wall indentation, and anal-Fin ray bone expansion. *Hormones and behavior* 34, 303-319.
- Hill, R.A., Boon, W.C., 2009. Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models. *Semin Reprod Med* 27, 218-228.
- Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M., Tatarazako, N., 2006. Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol: formation of testis-ova and sex-transformation during early-ontogeny. *Aquat Toxicol* 77, 78-86.
- Horth, L., Binckley, C., Wilk, R., Reddy, P., Reddy, A., 2010. Color, Body Size, and Genitalia Size Are Correlated Traits in Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Copeia* 2010, 196-202.
- Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen years after "Wingspread"-environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 105, 235-259.
- Howell, W.M., Black, D.A., Bortone, S.A., 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia*, 676-681.
- Howell, W.M., Denton, T.E., 1989. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environmental Biology of Fishes* 24, 43-51.
- Hrbek, T., Seckinger, J., Meyer, A., 2007. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. *Molecular phylogenetics and evolution* 43, 986-998.
- Hughes, A.L., 1985. Seasonal trends in body size of adult male mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, with evidence for their social control. *Environmental Biology of Fishes* 14, 251-258.

- Huhtaniemi, I.T., Themmen, A.P., 2005. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 26, 207-217.
- Hutchins, S.R., White, M.V., Hudson, F.M., Fine, D.D., 2007. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations for estrogens and estrogen conjugates. *Environ Sci Technol* 41, 738-744.
- Hutchinson, T., Yokota, H., Hagino, S., Ozato, K., 2003. Development of fish tests for endocrine disruptors. *Pure and applied chemistry* 75, 2343-2353.
- Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R., 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts," not "traffic lights," in risk assessment. *Environmental health perspectives* 114 Suppl 1, 106-114.
- IARC, 2007. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT. (Multivolume work). Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, p. V91 379.
- Ihnat, M., Fernandes, L., 1996. Trace elemental characterization of composted poultry manure. *Bioresource Technology* 57, 143-156.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., Nagahama, Y., 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of reproduction* 78, 333-341.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059-3087.
- Iovine, M.K., 2007. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. *Nat Chem Biol* 3, 613-618.
- IRAM, 2008. Calidad ambiental, Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. IRAM 29112.
- Ito, L.S., Yamashita, M., Takashima, F., Strüssmann, C.A., 2005. Dynamics and histological characteristics of gonadal sex differentiation in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) at feminizing and masculinizing temperatures. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 303, 504-514.
- Iwamatsu, T., Kobayashi, H., Hamaguchi, S., Sagegami, R., Shuo, T., 2005. Estradiol-17 β content in developing eggs and induced sex reversal of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology* 303, 161-167.
- Jackman, K.W., Veldhoen, N., Miliano, R.C., Robert, B.J., Li, L., Khojasteh, A., Zheng, X., Zaborniak, T.S.M., van Aggelen, G., Lesperance, M., Parker, W.J., Hall, E.R., Pyle, G.G., Helbing, C.C., 2018. Transcriptomics investigation of thyroid hormone disruption in the olfactory system of the *Rana [Lithobates] catesbeiana* tadpole. *Aquat Toxicol* 202, 46-56.

Jalabert, B., Baroiller, J.-F., Breton, B., Fostier, A., Le Gac, F., Guiguen, Y., Monod, G., 2000. Main Neuro-Endocrine, Endocrine and Paracrine Regulations of Fish Reproduction, and Vulnerability to Xenobiotics. *Ecotoxicology* 9, 25-40.

Jenyns, L., 1842. Fish. In Jenyns, L., ed, *The zoology of the voyage of H.M.S. Beagle, under the command of Captain Fitzroy, R.N., during the years 1832 to 1836*. London. Smith, Elder, and Co issued in 4 parts. Fish, Voyage Beagle: i-xvi + 1-172, Pls. 1-29, 115-117.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.

Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G., 2006. Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environmental health perspectives* 114, 32-39.

Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ Sci Technol* 35, 4697-4703.

Johnston, P.M., 1951. The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacépède). *Journal of Morphology* 88, 471-542.

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153, 346-364.

Kallman, K.D., 1984. A New Look at Sex Determination in Poeciliid Fishes. in: Turner, B.J. (Ed.). *Evolutionary Genetics of Fishes*. Springer US, Boston, MA, pp. 95-171.

Kanai, Y., Hiramatsu, R., Matoba, S., Kidokoro, T., 2005. From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J Biochem* 138, 13-19.

Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Oka, Y., 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149, 2467-2476.

Kaptaner, B., Ünal, G., 2011. Effects of 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. *Environmental toxicology* 26, 610-622.

Karube, M., Fernandino, J.I., Strobl-Mazzulla, P., Strussmann, C.A., Yoshizaki, G., Somoza, G.M., Patino, R., 2007. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P-450 aromatase (cyp19A1) gene during thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 307, 625-636.

Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D., Scott, A.P., 2006. Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens. *Environmental health perspectives* 1, 115-121.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental health perspectives* 104 Suppl 4, 715-740.

Kawakami, Y., Nozaki, J., Seoka, M., Kumai, H., Ohta, H., 2008. Characterization of thyroid hormones and thyroid hormone receptors during the early development of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Gen Comp Endocrinol* 155, 597-606.

Kendall, R.J., Dickerson, R.L., 1996. Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1253-1254.

Kester, M.H., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., Bergman, A., Safe, S.H., Kuiper, G.G., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J., 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141, 1897-1900.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8897-8901.

Kime, D.E., 1993. "Classical" and "non-classical" reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3, 160-180.

Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *The Science of the total environment* 225, 3-11.

Kime, D.E., 2001. *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Academic Publication, Boston, USA.

Kime, D.E., Nash, J.P., Scott, A.P., 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177, 345-352.

Kime, D.E., Van Look, K.J., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 130, 425-433.

Kirby, M.F., Allen, Y.T., Dyer, R.A., Feist, S.W., Katsiadaki, I., Matthiessen, P., Scott, A.P., Smith, A., Stentiford, G.D., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L., Waldock, M.J., 2004. Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: temporal trends, 1996 to 2001. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 23, 748-758.

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150, 821-831.

- Klaassen, C.D., 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th edition ed. McGraw-Hill, New York, USA.
- Kobayashi, H., Iwamatsu, T., 2005. Sex reversal in the medaka *Oryzias latipes* by brief exposure of early embryos to estradiol-17 β . *Zoological Science* 22, 1163-1167.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y., 2002. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of development* 111, 167-171.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y., Nakamura, M., 2013. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex Dev* 7, 115-125.
- Kobelkowsky, A., Alva-García, A., 2000. Anatomía sexual de *Gambusia regani* (Pisces: Poeciliidae). *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología* 71, 133-142.
- Kopiejewska, W., Szczerbowski, A., 2005. Ovarian structure and development in juvenile perch, *Perca fluviatilis* (L.) under intensive breeding. *Acta Sci. Pol., Piscaria* 4, 71-82.
- Kordon, C., Gaillard, R.C., 2006. Hormones and the Brain. Research and Perspectives in Endocrine Interactions. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA.
- Koya, Y., Fujita, A., Niki, F., Ishihara, E., Miyama, H., 2003. Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zoological science* 20, 1231-1242.
- Kramer, C.R., Kallman, K.D., 1985. Sex differentiation of somatic tissue in the unsexualised gonad primordia of the embryos of three species of poeciliid fish. *Journal of Anatomy* 140, 269-277.
- Kristoffersson, R., Pekkarinen, M., 1975. Histological changes in the testes of brackish-water *Zoarcetes viviparus* (L.) in relation to the reproductive cycle. *Annales Zoologici Fennici* 12, 205-210.
- Krol, J., Glogowski, J., Demska-Zakes, K., Hliwa, P., 2006. Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during a spawning period. *Czech J. Anim. Sci* 51, 220-226.
- Kunath, F., Grobe, H.R., Rucker, G., Motschall, E., Antes, G., Dahm, P., Wullich, B., Meerpohl, J.J., 2014. Non-steroidal antiandrogen monotherapy compared with luteinising hormone-releasing hormone agonists or surgical castration monotherapy for advanced prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 30.
- Kuntz, A., 1914. Notes on the habits, morphology of the reproductive organs, and embryology of the viviparous fish *Gambusia affinis*. *Bull US Bur Fish* 33, 177-190.
- Künzler, R., Bakker, T.C.M., 2001. Female preferences for single and combined traits in computer animated stickleback males. *Behavioral Ecology* 12, 681-685.
- Kurokawa, H., Saito, D., Nakamura, S., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, K.-i., Tanaka, M., 2007. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka

gonad. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 16958-16963.

Kuster, M., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2005. Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Laforest, L., Brown, C.W., Poleo, G., Geraudie, J., Tada, M., Ekker, M., Akimenko, M.A., 1998. Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. Development 125, 4175-4184.

Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. Environmental Science & Technology 34, 3890-3894.

Lai, X., Wichers, H.J., Soler-Lopez, M., Dijkstra, B.W., 2018. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. Chemistry 24, 47-55.

Lamatsch, D.K., Stöck, M., 2009. Sperm-Dependent Parthenogenesis and Hybridogenesis in Teleost Fishes. in: Schön, I., Martens, K., Dijk, P. (Eds.). Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 399-432.

Lambert, M.R., Giller, G.S.J., Barber, L.B., Fitzgerald, K.C., Skelly, D.K., 2015. Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 11881-11886.

Lampert, K.P., Schartl, M., 2008. The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 363, 2901-2909.

Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E., Förlin, L., 1999. Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquatic Toxicology 45, 91-97.

Laws, E.A., 2000. Aquatic pollution: an introductory text, 3rd edition ed. John Wiley & Sons, USA.

Le Cren, E.D., 1951. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). Journal of Animal Ecology 20, 201-219.

Leet, J.K., Gall, H.E., Sepulveda, M.S., 2011. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. J Appl Toxicol 31, 379-398.

Leknes, I.L., 2007. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). Acta histochemica 109, 164-168.

Leusch, F.D., Chapman, H.F., Kay, G.W., Gooneratne, S.R., Tremblay, L.A., 2006. Anal fin morphology and gonadal histopathology in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*)

exposed to treated municipal sewage effluent. Archives of environmental contamination and toxicology 50, 562-574.

Levin, E.R., 2018. Membrane estrogen receptors signal to determine transcription factor function. Steroids 132, 1-4.

Levin, S., Bucci, T.J., Cohen, S.M., Fix, A.S., Hardisty, J.F., Legrand, E.K., Maronpot, R.R., Trump, B.F., 1999. The Nomenclature of Cell Death: Recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. Toxicologic Pathology 27, 484-490.

Lewis, R.J.S., 2007. Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 15th Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, p. 515.

Lin, F., Dabrowski, K., Timmermans, L.P.M., 1997. Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). Canadian Journal of Zoology 75, 1262-1269.

Liotta, J., 2005. Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. in: N°3, S.D. (Ed.). ProBiota, Argentina, p. 701.

Livingston, J.D., Kahn, A.T., Jennions, M.D., 2014. Sex differences in compensatory and catch-up growth in the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. Evolutionary Ecology 28, 687-706.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. General and Comparative Endocrinology 165, 367-389.

Lucinda, P.H.F., 2005. Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). Neotropical Ichthyology 3, 259-270.

Lucinda, P.H.F., Reis, R.E., 2005. Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe Cnesterodontini Hubbs. Neotropical Ichthyology 3, 1-60.

Maack, G., Segner, H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. Journal of Fish Biology 62, 895-906.

Mackie, M., Lewis, P., 2001. Assessment of gonad staging systems and other methods used in the study of the reproductive biology of narrow-barred Spanish mackerel, *Scomberomorus commerson*, in Western Australia. Fisheries Research Report No. 136, Australia.

Mancini, M., Grosman, F., 2008. El pejerrey de las lagunas pampeanas. Análisis de casos tendientes a una gestión integral de las pesquerías, Primera edición ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Mansell, D.S., Bryson, R.J., Harter, T., Webster, J.P., Kolodziej, E.P., Sedlak, D.L., 2011. Fate of endogenous steroid hormones in steer feedlots under simulated rainfall-induced runoff. Environ Sci Technol 45, 8811-8818.

- Marchese, M., Gagneten, A.M., Parma, M.J., Pavé, P.J., 2008. Accumulation and Elimination of Chromium by Freshwater Species Exposed to Spiked Sediments. *Archives of environmental contamination and toxicology* 55, 603.
- Markman, S., Guschina, I.A., Barnsley, S., Buchanan, K.L., Pascoe, D., Müller, C.T., 2007. Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. *Chemosphere* 70, 119-125.
- Martínez, N.A., Pereira, S.V., Bertolino, F.A., Schneider, R.J., Messina, G.A., Raba, J., 2012. Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. *Analytica Chimica Acta* 723, 27-32.
- Martínez, N.A., Schneider, R.J., Messina, G.A., Raba, J., 2010. Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of ethinylestradiol (EE2) in river water samples. *Biosensors & bioelectronics* 25, 1376-1381.
- Martinez, V.H., Monasterio de Gonzo, G., Uribe, M.C., Grier, H.J., 2015. Testicular structure in three viviparous species of teleosts in the genus *Jenynsia* (Anablepidae). *Spermatogenesis* 4, Sep-Dec.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559.
- Matsumoto, Y., Buemio, A., Chu, R., Vafae, M., Crews, D., 2013. Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (*cyp19a1*) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles. *PLOS ONE* 8, e63599.
- McKim, J.M., 1995. Appendix B. Early life stage toxicity tests. in: Rand, G.M. (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor & Francis, Washington D.C., USA, pp. 974-1011.
- McLachlan, J.A., 2016. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 4, 684-694.
- McLachlan, J.A., Korach, K.S., 1995. Symposium on estrogens in the environment, III. *Environmental health perspectives* 103, 3-4.
- Mechaly, A.S., Vinas, J., Piferrer, F., 2013. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *Gen Comp Endocrinol* 188, 258-268.
- Meijide, F.J., Lo Nostro, F.L., Guerrero, G.A., 2005. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light- and electron-microscopic study. *J Morphol* 264, 191-210.
- Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 20, 297-308.

- Meyer, A., 1997. The evolution of sexually selected traits in male swordtail fishes (*Xiphophorus*: Poeciliidae). *Heredity* 79, 329.
- Meyer, A., Morrissey, J.M., Schartl, M., 1994. Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature* 368, 539-542.
- Meyer, A., Salzburger, W., Schartl, M., 2006. Hybrid origin of a swordtail species (Teleostei: *Xiphophorus clemenciae*) driven by sexual selection. *Mol Ecol* 15, 721-730.
- Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Development, Growth & Differentiation* 38, 257-262.
- Miura, T., Kudo, N., Miura, C., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1998. Two testicular cDNA clones suppressed by gonadotropin stimulation exhibit ZP2- and ZP3-like structures in Japanese eel. *Molecular Reproduction and Development* 51, 235-242.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 5774-5778.
- Miyagawa, S., Matsumaru, D., Murashima, A., Omori, A., Satoh, Y., Haraguchi, R., Motoyama, J., Iguchi, T., Nakagata, N., Hui, C.C., Yamada, G., 2011. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology* 152, 2894-2903.
- Miyagawa, S., Moon, A., Haraguchi, R., Inoue, C., Harada, M., Nakahara, C., Suzuki, K., Matsumaru, D., Kaneko, T., Matsuo, I., Yang, L., Taketo, M.M., Iguchi, T., Evans, S.M., Yamada, G., 2009. Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/beta-catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program. *Development* 136, 3969-3978.
- Miyashita, H., Nakagawa, H., Kobayashi, K., Hoshi, M., Matsumoto, M., 2011. Effects of 17 β -Estradiol and Bisphenol A on the Formation of Reproductive Organs in Planarians. *The Biological Bulletin* 220, 47-56.
- Miyata, S., Koike, S., Kubo, T., 1999. Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16, 335-340.
- Miyata, S., Kubo, T., 2000. In Vitro Effects of Estradiol and Aromatase Inhibitor Treatment on Sex Differentiation in *Xenopus Laevis* Gonads. *General and Comparative Endocrinology* 119, 105-110.
- Molero, A.M., Pisanó, A., 1987. Estudios de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae). *Rev. Brasil. Biol.* 47, 115-125.
- Moreira, M., Aquino, S., Coutrim, M., Silva, J., Afonso, R., 2011. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). *Environmental technology* 32, 1409-1417.

- Moresco, R.M., De Oliveira, C., 2009. A Comparative Study of the Extracutaneous Pigmentary System in Three Anuran Amphibian Species Evaluated During the Breeding Season. *South American Journal of Herpetology* 4, 1-8.
- Mueller, S.O., Korach, K.S., 2001. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 1, 613-619.
- Munakata, A., Kobayashi, M., 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 456-468.
- Murakami, R., Mizuno, T., 1986. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissues in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. *J Embryol Exp Morphol* 92, 133-143.
- Murphy, B.F., Leis, J.M., Kavanagh, K.D., 2007. Larval development of the Ambon damselfish *Pomacentrus amboinensis*, with a summary of pomacentrid development. *Journal of Fish Biology* 71, 569-584.
- Nagahama, Y., Miura, T., Kobayashi, T., Ding, J., 1997. The Role of Activin in Spermatogenesis in Fish. in: Aono, T., Sugino, H., Vale, W.W. (Eds.). *Inhibin, Activin and Follistatin: Regulatory Functions in System and Cell Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 196-203.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ* 50, 13.
- Nakajo, M., Kanda, S., Karigo, T., Takahashi, A., Akazome, Y., Uenoyama, Y., Kobayashi, M., Oka, Y., 2018. Evolutionally Conserved Function of Kisspeptin Neuronal System Is Nonreproductive Regulation as Revealed by Nonmammalian Study. *Endocrinology* 159, 163-183.
- Nakamura, M., 1982. Gonadal sex differentiation in whitespotted char, *Salvelinus leucomaenis*. *Japanese Journal of Ichthyology* 28, 431-436.
- Nakamura, M., 2010. The mechanism of sex determination in vertebrates-are sex steroids the key-factor? *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313, 381-398.
- Nakamura, M., 2013. *Morphological and Physiological Studies on Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish Aqua-BioScience Monographs* 6, 1-47.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.-T., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology* 281, 362-372.
- Nakamura, S., Kobayashi, D., Aoki, Y., Yokoi, H., Ebe, Y., Wittbrodt, J., Tanaka, M., 2006. Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev Biol* 295, 678-688.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., Schartl, M., 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11778-11783.

- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental health perspectives* 112, 1725-1733.
- Natale, C.A., Duperret, E.K., Zhang, J., Sadeghi, R., Dahal, A., O'Brien, K.T., Cookson, R., Winkler, J.D., Ridky, T.W., 2016. Sex steroids regulate skin pigmentation through nonclassical membrane-bound receptors. *eLife* 5.
- Neill, J.D., 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd Edition ed. Academic Press, USA.
- Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., 2016. *Fishes of the World*, Fifth Edition ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Neumann, C.J., Grandel, H., Gaffield, W., Schulte-Merker, S., Nusslein-Volhard, C., 1999. Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of sonic hedgehog activity. *Development* 126, 4817-4826.
- Nikolsky, G.V., 1963. *The ecology of fishes*. English edition, T.F.H. Publications, Inc. Ltd. USA.
- Nishimura, T., Tanaka, M., 2014. Gonadal Development in Fish. *Sexual Development* 8, 252-261.
- Nishimura, T., Tanaka, M., 2016. The Mechanism of Germline Sex Determination in Vertebrates. *Biology of reproduction* 95, 30.
- Nolan, M., Jobling, S., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. A histological description of intersexuality in the roach. *Journal of Fish Biology* 58, 160-176.
- O'Shaughnessy, K.L., Dahn, R.D., Cohn, M.J., 2015. Molecular development of chondrichthyan claspers and the evolution of copulatory organs. *Nature Communications* 6, 6698.
- OECD, 1992. *Fish Early Life Stage Test. Test Guideline 210*. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- OECD, 2004. *Draft Proposal for a Fish Partial Life Cycle Test (or Extended Early Life-Stage Test)*. . Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals: ENV/JM/MONO 18 Annex E.
- OECD, 2011. *Fish Sexual Development Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 234*. p. 44 pp.
- OECD, 2012. *Fish Short Term Reproduction Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 229*. p. 40 pp.
- Oehlmann, J., Markert, B., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., Bauer, B., Fioroni, P., 1996. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry* 354, 540-545.

- Offen, N., Blum, N., Meyer, A., Begemann, G., 2008. Fgfr1 signalling in the development of a sexually selected trait in vertebrates, the sword of swordtail fish. *BMC Dev Biol* 8, 98.
- Offen, N., Kang, J.H., Meyer, A., Begemann, G., 2013. Retinoic Acid Is Involved in the Metamorphosis of the Anal Fin into an Intromittent Organ, the Gonopodium, in the Green Swordtail (*Xiphophorus hellerii*). *PLOS ONE* 8, e77580.
- Offen, N., Meyer, A., Begemann, G., 2009. Identification of novel genes involved in the development of the sword and gonopodium in swordtail fish. *Developmental Dynamics* 238, 1674-1687.
- Ogino, Y., Hirakawa, I., Inohaya, K., Sumiya, E., Miyagawa, S., Denslow, N., Yamada, G., Tatarazako, N., Iguchi, T., 2014. Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology* 155, 449-462.
- Ogino, Y., Katoh, H., Yamada, G., 2004. Androgen dependent development of a modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of secondary sexual character expression in vertebrates. *FEBS letters* 575, 119-126.
- Ogino, Y., Miyagawa, S., Katoh, H., Prins, G.S., Iguchi, T., Yamada, G., 2011. Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics. *Evol Dev* 13, 315-325.
- Ogino, Y., Tohyama, S., Kohno, S., Toyota, K., Yamada, G., Yatsu, R., Kobayashi, T., Tatarazako, N., Sato, T., Matsubara, H., Lange, A., Tyler, C.R., Katsu, Y., Iguchi, T., Miyagawa, S., 2018. Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 0760, 30324-30328.
- Ohga, H., Selvaraj, S., Matsuyama, M., 2018. The Roles of Kisspeptin System in the Reproductive Physiology of Fish With Special Reference to Chub Mackerel Studies as Main Axis. *Frontiers in Endocrinology* 9, 147.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T., 2007. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Biology of reproduction* 77, 970-977.
- Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol* 193, 3-15.
- 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. *Environmental health perspectives* 110 Suppl 3, 429-433.
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L., 2006. Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology Between Zebrafish and Japanese Medaka After Exposure to 17 α -Ethinylestradiol and 17 β -Trenbolone. *Archives of environmental contamination and toxicology* 51, 237-243.

- Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLOS ONE* 3, e2837.
- Pandey, G., Pandey, S.P., Sharma, M., 2011. Experimental Hepatotoxicity Produced by Ethinyl estradiol. *Toxicology international* 18, 160-162.
- Parenti, L.R., Grier, H.J., 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology* 44, 333-348.
- Parenti, L.R., LoNostro, F.L., Grier, H.J., 2010. Reproductive Histology of *Tomeurus gracilis* Eigenmann, 1909 (Teleostei: Atherinomorpha: Poeciliidae) With Comments on Evolution of Viviparity in Atherinomorph Fishes.
- Park, I.-S., Gil, H.W., Lee, T.H., Nam, Y.K., Kim, D.S., 2016. Comparative Study of Growth and Gonad Maturation in Diploid and Triploid Marine Medaka, *Oryzias dancena*. *Development & Reproduction* 20, 305-314.
- Parmentier, H.K., Timmermans, L.P., 1985. The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *J Embryol Exp Morphol* 90, 13-32.
- Parzefall, J., 1969. Zur vergleichenden Ethologie verschiedener Molliesia-Arten einschliesslich einer Höhlenform von *M. sphenops*. *Behaviour* 33, 1-37.
- Pask, A.J., 2012. A role for estrogen in somatic cell fate of the mammalian gonad. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 20, 239-245.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F., Corriero, A., 2014. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *J Fish Dis* 37, 241-250.
- Patzner, R.A., Kaurin, G., 1997. Sexual differentiation in *Salaria (=Blennius) pavo*. *Journal of Fish Biology* 50, 887-894.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C.R., Braunbeck, T., 2004. Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 330-345.
- Peden, A.E., 1972. The function of gonopodial parts and behavioral pattern during copulation by *Gambusia* (Poeciliidae). *Canadian Journal of Zoology* 50, 955-968.
- Pennell, M.W., Mank, J.E., Peichel, C.L., 2018. Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Mol Ecol* 27, 3950-3963.
- Pereira de Sá, M.d.F., Fragoso-Moura, E.N., Fenerich-Verani, N., Ferro, D.A.d.M., 2008. Occurrence of intersexuality in "Lambaris", *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842), small characids from the Brazilian streams. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51, 315-322.

- Pereira, R.O., Postigo, C., de Alda, M.L., Daniel, L.A., Barceló, D., 2011. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere* 82, 789-799.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 941-946.
- Perez, R.L., Escandar, G.M., 2014. Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. *Anal Chim Acta* 835, 19-28.
- Pieau, C., Dorizzi, M., 2004. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *The Journal of endocrinology* 181, 367-377.
- Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture* 77, 251-262.
- Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1992. The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 106, 183-193.
- Piferrer, F., Guiguen, Y., 2008. Fish Gonadogenesis. Part II: Molecular Biology and Genomics of Sex Differentiation. *Reviews in Fisheries Science* 16, 35-55.
- Piovesana, M.F., Gerbasi, J.R., Vigliano, F.A., 2014. Diafanización: una técnica que permite la visualización diferencial de cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces. *Revista de la Sociedad Argentina de Histotecnología* 25, 10-14.
- Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Clemens, J.Q., Bak, P.M., Bushman, W., 1999. Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium. *Dev Biol* 209, 28-39.
- Pollux, B.J.A., Meredith, R.W., Springer, M.S., Garland, T., Reznick, D.N., 2014. The evolution of the placenta drives a shift in sexual selection in livebearing fish. *Nature* 513, 233.
- Potter, H., Kramer, C.R., 2000. Ultrastructural observations on sperm storage in the ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: poeciliidae): the role of the duct epithelium. *J Morphol* 245, 110-129.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology* 8, 275-285.
- Quint, E., Smith, A., Avaron, F., Laforest, L., Miles, J., Gaffield, W., Akimenko, M.A., 2002. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and *bmp2b* or exposure to cyclopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8713-8718.

Quintans, F., Scasso, F., Loureiro, M., Yafe, A., 2009. Diet of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) and *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay. *Iheringia. Série Zoologia* 99, 99-105.

Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S., 1995. Chapter 1: Introduction to aquatic toxicology. in: Rand, G.M.e. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment*. Taylor & Francis, USA.

Rasmussen, T.H., Jespersen, A., Korsgaard, B., 2006. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarcetes viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): a histological and ultrastructural study. *J Morphol* 267, 1032-1047.

Rearick, D.C., Fleischhacker, N.T., Kelly, M.M., Arnold, W.A., Novak, P.J., Schoenfuss, H.L., 2014. Phytoestrogens in the environment, I: occurrence and exposure effects on fathead minnows. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 33, 553-559.

Reinli, K., Block, G., 1996. Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26, 123-148.

Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current biology* : CB 16, 1730-1735.

Ricker, W.E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bull. Fish. Res. Board Can.* vol. 108. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service, Ottawa, p. 382.

Roa, J., Tena-Sempere, M., 2007. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol* 153, 132-140.

Rocha, M.J., Rocha, E., 2015. Chapter 7. Estrogenic Compounds in Estuarine and Coastal Water Environments of the Iberian Western Atlantic Coast and Selected Locations Worldwide — Relevancy, Trends and Challenges in View of the EU Water Framework Directive. in: Andreazza, A.C. (Ed.). *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. IntechOpen.

Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environ Sci Technol* 35, 462-470.

Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.L., Bremiller, R.A., Wilson, C., Canestro, C., Postlethwait, J.H., 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5, 655-667.

Roggio, M.A., Guyon, N.F., Hued, A.C., Ame, M.V., Valdes, M.E., Giojalas, L.C., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2014. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the

fish *Jenynsia multidentata*. Bulletin of environmental contamination and toxicology 92, 579-584.

Ronco, A., Díaz Báez, M.C., Pica Granados, Y., 2004. Conceptos generales. in: Castillo, G.E. (Ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, México, pp. 71-79.

Rosa-Molinar, E., Burke, A.C., 2002. Starting from fins: parallelism in the evolution of limbs and genitalia: the fin-to-genitalia transition. *Evol Dev* 4, 124-126.

Rosa-Molinar, E., Fritsch, B., Hendricks, S.E., 1996. Organizational-activational concept revisited: sexual differentiation in an atherinomorph teleost. *Hormones and behavior* 30, 563-575.

Rosa-Molinar, E., Hendricks, S.E., Rodriguez-Sierra, J.F., Fritsch, B., 1994. Development of the anal fin appendicular support in the western mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard, 1854): a reinvestigation and reinterpretation. *Acta anatomica* 151, 20-35.

Rosen, D.E., Bailey, R.M., 1963. The Poeciliid fishes (Cyprinodontiformes) their structure, zoogeography and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 126, 1-176.

Rosen, D.E., Gordon, M., 1953. Functional anatomy and evolution of male genitalia in Poeciliid fishes. *Zoologica : scientific contributions of the New York Zoological Society*. 38, 1-47.

Rosenthal, G.G., Evans, C.S., 1998. Female preference for swords in *Xiphophorus helleri* reflects a bias for large apparent size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4431-4436.

Roush, D., Rhen, T., 2018. Developmental plasticity in reptiles: Critical evaluation of the evidence for genetic and maternal effects on temperature-dependent sex determination. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology* 329, 287-297.

Sæle, Ø., Pittman, K.A., 2010. Looking closer at the determining of a phenotype? Compare by stages or size, not age. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 294-297.

Saillant, E., Chatain, B., Menu, B., Fauvel, C., Vidal, M.O., Fostier, A., 2003. Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Zoology* 260, 53-63.

Satoh, N., Egami, N., 1972. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 28, 385-395.

Scala-Benuzzi, M.L., Raba, J., Soler-Illia, G., Schneider, R.J., Messina, G.A., 2018. Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples. *Analytical chemistry* 90, 4104-4111.

- Scalia, M., Geremia, E., Corsaro, C., Santoro, C., Sciuto, S., Sichel, G., 1988. The extracutaneous pigmentary system: evidence for the melanogenesis in Amphibia and Reptilia liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 89, 715-717.
- Schlenk, D., 1999. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Marine pollution bulletin* 39, 48-53.
- Schlupp, I., Plath, M., 2005. Male mate choice and sperm allocation in a sexual/asexual mating complex of *Poecilia* (Poeciliidae, Teleostei). *Biology letters* 1, 169-171.
- Schnute, J.T., Richards, L., 2002. Chapter 6. Surplus Production Models. in: Hart, P.J.B., Reynolds, J.D. (Eds.). *Handbook of Fish Biology and Fisheries*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 105-126.
- Scholz, S., Kluver, N., 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. *Sex Dev* 3, 136-151.
- Scholz, S., Mayer, I., 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and cellular endocrinology* 293, 57-70.
- Schrager, S., Potter, B.E., 2004. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician* 69, 2395-2400.
- Schreibman, M.P., Berkowitz, E.J., Van den Hurk, R., 1982. Histology and histochemistry of the testis and ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Cell and Tissue Research* 224, 81-87.
- Schultheis, C., Böhne, A., Schartl, M., Volff, J.N., Galiana-Arnoux, D., 2009. Sex determination diversity and sex chromosome evolution in poeciliid fish. *Sex Dev* 3, 68-77.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390-411.
- Schulz, R.W., Nóbrega, R.H., 2011. Regulation of Spermatogenesis. in: Farrell, A.P. (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego: Academic Press, pp. 627-634.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* 349, 1614-1627.
- Shammas, N.K., 2007. Endocrine disruptors: Properties, effects, and removal processes. in: Wang, L.K., Hung, Y-T., Shammas, N.K. (Ed.). *Handbook of environmental engineering, volume 5: Advanced physicochemical treatment technologies*. The Human Press Inc., NJ, USA, pp. 485-504.

- Shappell, N.W., Billey, L.O., Forbes, D., Matheny, T.A., Poach, M.E., Reddy, G.B., Hunt, P.G., 2007. Estrogenic Activity and Steroid Hormones in Swine Wastewater through a Lagoon Constructed-Wetland System. *Environmental Science & Technology* 41, 444-450.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S., Sumpster, J.P., 1995. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental health perspectives* 103, 1136-1143.
- Shelton, W.L., Wanniasingham, V., Hiott, A.E., 1995. Ovarian differentiation in common carp (*Cyprinus carpio*) in relation to growth rate. *Aquaculture* 137, 203-211.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., Crews, D., 2007. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn* 236, 1055-1063.
- Siccardi, E., 1954. La reproducción de los Cyprinodontiformes. *Ichthys* 1, 137-144.
- Sichel, G., Scalia, M., Mondio, F., Corsaro, C., 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment cell research* 10, 271-287.
- Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution* 165, 38-58.
- Silversides, D.W., Price, C.A., Cooke, G.M., 1995. Effects of short-term exposure to hydroxyflutamide in utero on the development of the reproductive tract in male mice. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 1582-1588.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- Smith, C.A., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: Expression of estrogen receptor and aromatase genes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 60, 295-302.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., Sinclair, A.H., 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267-271.
- Smith, C.A., Sinclair, A.H., 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26, 120-132.
- Smith, S.B., Donahue, A.P., Lipkin, R.J., Blazer, V., Schmitt, C.J., Goede, R.W., 2002. Illustrated field guide for assessing external and internal anomalies in fish. Information and Technology Report. USGS-VRD-ITR, USA, p. 56 pp.
- Snyder, A., Schiechert, R.A., Zaiac, M.N., 2017. Melasma Associated with Topical Estrogen Cream. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 10, 57-58.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2009. Introduction to Biostatistics, Second Edition ed. Dover Publications Inc., New York, USA.
- Solé, M., Raldua, D., Piferrer, F., Barceló, D., Porte, C., 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 136, 145-156.
- Somma, A., Mastrángelo, M., Ferrari, L., 2011. Manual de producción de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Editorial Utopías, Argentina.
- Sone, K., Hinago, M., Itamoto, M., Katsu, Y., Watanabe, H., Urushitani, H., Tooi, O., Guillette, L.J., Iguchi, T., 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology* 143, 151-160.
- Sornalingam, K., McDonagh, A., Zhou, J.L., 2016. Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous systems: Progress and future challenges. *Science of The Total Environment* 550, 209-224.
- Sotelo, J.R., Trujillo-Cenóz, O., 1958. Electron microscope study of the kinetic apparatus in animal sperm cells. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 48, 565-601.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental health perspectives* 103, 113-122.
- Sparre, P., Venema, S.C., 1997. Introducción a la evaluación de recursos pesqueros tropicales. Parte 1. Manual. Documento Técnico de Pesca FAO N° 306.1. p. 420.
- Stanko, J.P., Angus, R.A., 2007. In vivo assessment of the capacity of androstenedione to masculinize female mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed through dietary and static renewal methods. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 26, 920-926.
- Strauss, R.E., Bond, C.E., 1990. Taxonomic methods: morphology. in: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds). (Ed.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Maryland, USA, p. 684.
- Strussmann, C.A., Conover, D.O., Somoza, G.M., Miranda, L.A., 2010. Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family Atherinopsidae). *J Fish Biol* 77, 1818-1834.
- Strussmann, C.A., Ito, L.S., 2005. Where does gonadal sex differentiation begin? Gradient of histological sex differentiation in the gonads of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). *J Morphol* 265, 190-196.
- Strüssmann, C.A., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 13-29.

- Strüssmann, C.A., Takashima, F., Toda, K., 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139, 31-45.
- Sumpter, J.P., 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology letters* 82-83, 737-742.
- Sumpter, J.P., 2002. Endocrine Disruption in the Aquatic Environment. in: Metzler, M. (Ed.). *Endocrine Disruptors* Part II. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 271-289.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C., 2005a. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology* 39, 4321-4332.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C., 2005b. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* 39, 4321-4332.
- Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y., 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology* 71, 292-301.
- Suzuki, K., Ogino, Y., Murakami, R., Satoh, Y., Bachiller, D., Yamada, G., 2002. Embryonic development of mouse external genitalia: insights into a unique mode of organogenesis. *Evol Dev* 4, 133-141.
- Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biology of reproduction* 44, 29-38.
- Tabb, M.M., Blumberg, B., 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular endocrinology* 20, 475-482.
- Takada, S., Ota, J., Kansaku, N., Yamashita, H., Izumi, T., Ishikawa, M., Wada, T., Kaneda, R., Choi, Y.L., Koinuma, K., Fujiwara, S., Aoki, H., Kisanuki, H., Yamashita, Y., Mano, H., 2006. Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck *Sox9* genes. *Gen Comp Endocrinol* 145, 208-213.
- Tang, H., Liu, Y., Luo, D., Ogawa, S., Yin, Y., Li, S., Zhang, Y., Hu, W., Parhar, I.S., Lin, H., Liu, X., Cheng, C.H., 2015. The kiss/kissr systems are dispensable for zebrafish reproduction: evidence from gene knockout studies. *Endocrinology* 156, 589-599.
- Tena-Sempere, M., 2006. KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* 83, 275-281.
- Terzich, M., Pope, M.J., Cherry, T.E., Hollinger, J., 2000. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. *The Journal of Applied Poultry Research* 9, 287-291.
- Thody, A.J., 1999. α -MSH and the regulation of melanocyte function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885, 217-229.

Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D.E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M.P., Brix, A.E., Singh, B., Belpoggi, F., Ward, J.M., 2010. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. *Toxicologic Pathology* 38, 5S-81S.

Thorsen, J., Hoyheim, B., Koppang, E.O., 2006. Isolation of the Atlantic salmon tyrosinase gene family reveals heterogenous transcripts in a leukocyte cell line. *Pigment cell research* 19, 327-336.

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*). *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 24, 352-359.

Tillitt, D.E., Gale, R.W., Meadows, J.C., Zajicek, J.L., Peterman, P.H., Heaton, S.N., Jones, P.D., Bursian, S.J., Kubiak, T.J., Giesy, J.P., Aulerich, R.J., 1996. Dietary Exposure of Mink to Carp from Saginaw Bay. 3. Characterization of Dietary Exposure to Planar Halogenated Hydrocarbons, Dioxin Equivalents, and Biomagnification. *Environmental Science & Technology* 30, 283-291.

Tillitt, D.E., Kubiak, T.J., Ankley, G.T., Giesy, J.P., 1993. Dioxin-like toxic potency in Forster's tern eggs from Green Bay, Lake Michigan, North America. *Chemosphere* 26, 2079-2084.

Timmermans, L.P.M., Taverne, N., 1989. Segregation of primordial germ cells: Their numbers and fate during early development of *Barbus conchoni* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by 3H-thymidine incorporation. *Journal of Morphology* 202, 225-237.

Toft, G., Baatrup, E., 2001. Sexual Characteristics Are Altered by 4-tert-Octylphenol and 17 β -Estradiol in the Adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 76-84.

Toft, G., Baatrup, E., 2003. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 β -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 228-237.

Toft, G., Edwards, T.M., Baatrup, E., Guillette, L.J., Jr., 2003. Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors. *Environmental health perspectives* 111, 695-701.

Tomczak, M.T., Sapota, M.R., 2006. The fecundity and gonad development cycle of the round goby (*Neogobius melanostomus* Pallas 1811) from the Gulf of Gdańsk *International Journal of Oceanography and Hydrobiology* 35, 353-367.

Tovar Bohórquez, M.O., Mechaly, A.S., Hughes, L.C., Campanella, D., Ortí, G., Canosa, L.F., Somoza, G.M., 2017. Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 204, 146-156.

Treasurer, J.W., Holliday, F.G.T., 1981. Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. *Journal of Fish Biology* 18, 359-376.

- Troy, D.B., 2005. The Science and Practice of Pharmacy. Remington. 21 st Edition. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, USA, p. 1464.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. Rev Reprod 2, 55-68.
- Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol Environ Saf 1, 151-173.
- Turner, C.L., 1941a. Morphogenesis of the gonopodium in *Gambusia affinis affinis*. Journal of Morphology 69, 161-185.
- Turner, C.L., 1941b. Regeneration of the gonopodium of *Gambusia* during morphogenesis. The Journal of Experimental Zoology 87, 181-209.
- Turner, C.L., 1942a. Morphogenesis of the gonopodial suspensorium in *Gambusia affinis* and the induction of male suspensorial characters in the female by androgenic hormones. Journal of Experimental Zoology 91, 167-193.
- Turner, C.L., 1947. The rate of morphogenesis and regeneration of the gonopodium in normal and castrated males of *Gambusia affinis*. The Journal of Experimental Zoology 106, 125-143.
- Turner, C.L., 1960. The Effects of Steroid Hormones on the Development of Some Secondary Sexual Characters in Cyprinodont Fishes Transactions of the American Microscopical Society 79, 320 -333.
- Turner, C.L.C.F.p.d.J., 1942b. A Quantitative Study of the Effects of Different Concentrations of Ethynyl Testosterone and Methyl Testosterone in the Production of Gonopodia in Females of *Gambusia affinis*. Physiological Zoology 15, 263-280.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. Critical Reviews in Toxicology 28, 319-361.
- Tyler, C.R., Spary, C., Gibson, R., Santos, E.M., Shears, J., Hill, E.M., 2005. Accounting for differences in estrogenic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: Salmonidae) and roach (*Rutilus rutilus*: Cyprinidae) exposed to effluents from wastewater treatment works. Environmental Science and Technology 39, 2599-2607.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Reviews in Fish Biology and Fisheries 6, 287-318.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. The Journal of experimental biology 205, 711-718.
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejia-Roa, V., 2015. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. Spermatogenesis 4, Sep-Dec.
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejia-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. Spermatogenesis 4, e983400.

USEPA, 1996. Fish Early-Life Stage Toxicity Test. Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.1400. EPA 712-C-96-121. Environmental Protection Agency, USA.

USEPA, 1998. Chapter 7. Compilation of EDSTAC Recommendations. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

USEPA, 2018. What is Endocrine Disruption? United States Environmental Protection Agency.

USNIH, 2008. US National Institute Health; DailyMed. Current Medication Information FEMHRT (norethindrone acetate/ethinyl estradiol) tablet (October 2008). Available from, as of December 10, 2018: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=23194>.

Vaillant, S., Magre, S., Dorizzi, M., Pieau, C., Richard-Mercier, N., 2001. Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev Dyn* 222, 228-237.

Valdés, M.E., Amé, M.V., Bistoni Mde, L., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Cordoba, Argentina). *The Science of the total environment* 472, 389-396.

Valdés, M.E., Marino, D.J., Wunderlin, D.A., Somoza, G.M., Ronco, A.E., Carriquiriborde, P., 2015. Screening Concentration of E1, E2 and EE2 in Sewage Effluents and Surface Waters of the "Pampas" Region and the "Rio de la Plata" Estuary (Argentina). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*.

van Aerle, R., Nolan, T.M., Jobling, S., Christiansen, L.B., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 20, 2841-2847.

van Aerle, R., Pounds, N., Hutchinson, T., Maddix, S., Tyler, C., 2002. Window of Sensitivity for the Estrogenic Effects of Ethinylestradiol in Early Life-Stages of Fathead Minnow, *Pimephales promelas*. *Ecotoxicology* 11, 423-434.

Van den Hurk, R., 1974. Steroidogenesis in the testis and gonadotropic activity in the pituitary during postnatal development of the black molly (*Mollienisia latipinna*). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Series C* 77, 193-200.

Van den Hurk, R., Meek, J., Peute, J., 1974. Ultrastructural study of the testis of the black molly (*Mollienisia latipinna*). II. Sertoli cells and Leydig cells. *Proc Koninkl Nederl Akad Wetensch Ser C* 77, 47-476.

van den Hurk, R., Slof, G.A., 1981. A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res* 218, 487-497.

Van Der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R.E., Itoh, H., Kawauchi, H., 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology* 85, 217-229.

- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- Van Winkoop, A., Timmermans, L.P., Goos, H.J., 1994. Stimulation of gonadal and germ cell development in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) by homologous pituitary extract. *Fish Physiol Biochem* 13, 161-171.
- Vardanyan, R., Hruby, V., 2016. Chapter 28 - Antineoplastic Agents. *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Academic Press, Boston, pp. 495-547.
- Vaughan, E.D., 2003. Long-Term Experience with 5 α -Reductase Inhibitors. *Reviews in Urology* 5, S28-S33.
- Verhoeven, G., Willems, A., Denolet, E., Swinnen, J.V., De Gendt, K., 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365, 1537-1556.
- Vidal, N., Loureiro, M., Hued, A.C., Eguren, G., Texeira de Mello, F., 2018. Female masculinization and reproductive success in *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiforme: Poeciliidae) under anthropogenic impact. *Ecotoxicology*, 1-10.
- Vilela, D.A.R., Silva, S.G.B., Peixoto, M.T.D., Godinho, H.P., França, L.R., 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 187-190.
- Villalpando, I., Merchant-Larios, H., 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *The International journal of developmental biology* 34, 281-285.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., Guiguen, Y., 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dyn* 236, 2198-2206.
- Volff, J.N., Scharl, M., 2001. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111, 101-110.
- Volff, J.N., Scharl, M., 2002. Sex determination and sex chromosome evolution in the medaka, *Oryzias latipes*, and the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cytogenet Genome Res* 99, 170-177.
- 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.
- Vrijenhoek, R.C., Angus, R.A., Schultz, R.J., 1977. Variation and Heterozygosity in Sexually Vs. Clonally Reproducing Populations of *Poeciliopsis*. *Evolution* 31, 767-781.
- Wallis, M.C., Waters, P.D., Delbridge, M.L., Kirby, P.J., Pask, A.J., Grutzner, F., Rens, W., Ferguson-Smith, M.A., Graves, J.A., 2007. Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes.

Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology 15, 949-959.

Waye, A., Trudeau, V.L., 2011. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 14, 270-291.

Weber, L.P., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., Janz, D.M., 2004. Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 792-797.

WHO/IPCS, 2002. Global assessment of the state-of-the science of endocrine disruptors. in: Organization, W.H. (Ed.). *World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2.*

Wilson, J.D., 1999. The role of androgens in male gender role behavior. *Endocrine reviews* 20, 726-737.

Wilson, M.P., Schwarzman, M.R., 2009. Toward a new U.S. chemicals policy: rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. *Environmental health perspectives* 117, 1202-1209.

Williot, P., 2011. Sex Determination and Staging of Gonads. in: Williot, P., Rochard, E., Desse-Berset, N., Kirschbaum, F., Gessner, J. (Eds.). *Biology and Conservation of the European Sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758: The Reunion of the European and Atlantic Sturgeons.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 369-382.

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, L.E., 1931. The history of the germ cells in the viviparous teleost *Platypoecilius maculatus*. *J. Morphol.* 52, 115- 153.

Wourms, J.P., 1981. Viviparity: The Maternal-Fetal Relationship in Fishes. *American Zoologist* 21, 473-515.

Wourms, J.P., Grove, B.D., Lombardi, J., 1988. The Maternal-Embryonic Relationship in Viviparous Fishes. in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.). *Fish Physiology.* Academic Press, pp. 1-134.

Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H., 2008. Exposure to 17 α -ethinylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 88, 1-8.

Yamada, G., Satoh, Y., Baskin, L.S., Cunha, G.R., 2003. Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation* 71, 445-460.

Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., Kitano, T., 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and biophysical research communications* 359, 935-940.

- Yamamoto, T.-o., 1962. Harmonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *General and Comparative Endocrinology* 1, 341-345.
- Yamamoto, T.-O., Suzuki, H., 1955. The manifestation of the urinogenital papillae of the medaka (*Oryzias latipes*) by sex-hormones. *Embryologia* 2, 133-144.
- Yamamoto, Y., Zhang, Y., Sarida, M., Hattori, R.S., Strüssmann, C.A., 2014. Coexistence of Genotypic and Temperature-Dependent Sex Determination in Pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLOS ONE* 9, e102574.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., Guiguen, Y., 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current biology : CB* 22, 1423-1428.
- Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129, 49-73.
- Yasar, P., Ayaz, G., User, S.D., Gupur, G., Muyan, M., 2017. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive medicine and biology* 16, 4-20.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B.F., Hung, M.C., Zhang, S., Gan, L., Chang, C., 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13498-13503.
- Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., Ito, M., 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2469-2474.
- Young, B.J., 2011. Desarrollo de un bioensayo para evaluar disrupción endocrina mediante el análisis de alteraciones en el desarrollo del gonopodio de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, p. 121.
- Yue, M., Zhao, J., Tang, S., Zhao, Y., 2018. Effects of Estradiol and Testosterone on the Expression of Growth-related Genes in Female and Male Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 49, 216-228.
- Zambrano, M.J., Rautenberg, G.E., Bonifacio, A.F., Filippi, I., Amé, M.V., Bonansea, R.I., Hued, A.C., 2018. Effects of water quality on aspects of reproductive biology of *Cnesterodon decemmaculatus*. *Science of The Total Environment* 645, 10-21.
- Zauner, H., Begemann, G., Mari-Beffa, M., Meyer, A., 2003. Differential regulation of msx genes in the development of the gonopodium, an intromittent organ, and of the "sword" a sexually selected trait of swordtail fishes (*Xiphophorus*). *Evol Dev* 5, 466-477.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Lange, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 28, 2663-2670.

Zhang, Z., Feng, Y., Liu, Y., Sun, Q., Gao, P., Ren, N., 2010. Kinetic degradation model and estrogenicity changes of EE₂ (17 α -ethinylestradiol) in aqueous solution by UV and UV/H₂O₂ technology. *Journal of hazardous materials* 181, 1127-1133.

Zhao, C., Xu, S., Liu, Y., Wang, Y., Liu, Q., Li, J., 2016. Gonadogenesis analysis and sex differentiation in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol Biochem* 43, 265-278.

Zheng, W., Yates, S.R., Bradford, S.A., 2008. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. *Environ Sci Technol* 42, 530-535.

Zheng, Z., Armfield, B.A., Cohn, M.J., 2015. Timing of androgen receptor disruption and estrogen exposure underlies a spectrum of congenital penile anomalies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E7194-7203.

Zieri, R., Taboga, S.R., de Oliveira, C., 2007. Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): histological, stereological, and ultrastructural aspects. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 290, 795-800.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165, 438-455.

ANEXO 1. Recomendaciones sobre el uso de solventes en experimentación con juveniles de *C. decemmaculatus*

En este anexo, se presentan resultados complementarios al Capítulo N°3 “Exposición de juveniles a un compuesto estrogénico”, en relación a datos obtenidos de un experimento preliminar realizado con individuos de *C. decemmaculatus* fenotípicamente indiferenciados de 0 a 4 días de edad. Estos peces también fueron obtenidos del acuario establecido en el Sector de Ecotoxicología del Laboratorio de Transformación de Residuos (IMYZA-INTA). La particularidad de este experimento fue que se utilizó etanol como vehículo para disolver el etinilestradiol (EE₂).

Para ello, se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se realizaron 4 tratamientos por duplicado: control con solvente (etanol), 30, 100 y 300 ng/L de EE₂. La solución stock consistió en diluir EE₂ (Sigma-Aldrich) en etanol absoluto y se utilizó una alícuota de la misma para ajustar cada una de las concentraciones experimentales. La unidad experimental consistió en un frasco de vidrio de 3 L. de capacidad con 2,5 L del medio acuoso y 16 peces. El experimento duró 28 días. Se utilizó un régimen estático con renovación completa del medio cada 48 hs. La concentración de solvente se mantuvo constante en todos los tratamientos a 0,0025% de etanol. Se utilizó un total de 128 animales.

Entre los resultados más relevantes de este experimento, se registró una elevada mortalidad en todos los tratamientos, incluso en los controles (>37,5%). Estos valores de mortalidad, no permitieron evaluar los efectos del EE₂ como perturbador endocrino. Este efecto letal podría ser asignado al uso del etanol como solvente, ya que indujo un crecimiento microbiano que enturbió el medio acuoso del experimento en todos los tratamientos. Los animales muertos presentaban hifas en las branquias, lo cual posiblemente les impidió respirar con normalidad.

Debido a este inconveniente, se recomienda utilizar dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente para experimentos con juveniles de *C. decemmaculatus*. En el caso de los adultos, a pesar de haberse observado las mismas características en el medio acuoso por el uso de etanol como solvente, no se registraron valores de mortalidad diferentes a los documentados para otras especies de peces utilizadas para experimentos crónicos.

ANEXO 2. Muestreos exploratorios de peces en un ambiente impactado por compuestos estrogénicos

En este anexo, se presentan resultados complementarios al Capítulo N°3 “Exposición de juveniles a un compuesto estrogénico” y Capítulo N°4 “Exposición de machos adultos a un compuesto estrogénico”. Se consideró como hipótesis que *los compuestos estrogénicos tienen la capacidad de afectar los parámetros de condición general, los caracteres sexuales secundarios, la histología gonadal y la proporción de sexos en poblaciones de C. decemmaculatus que habitan en ambientes naturales, tal como lo hacen en condiciones de laboratorio.*

Para poner a prueba esta hipótesis, se planteó como objetivo principal evaluar los parámetros de condición general, los caracteres sexuales secundarios, la histología gonadal y la proporción de sexos en poblaciones de *C. decemmaculatus* que habitan en un ambiente impactado por compuestos estrogénicos. Así como también, se consideró de manera complementaria, la identificación de las especies ictícolas que habitan en la zona litoral de ambientes impactados por compuestos estrogénicos y conocer su abundancia relativa.

Se llevaron a cabo dos muestreos de carácter exploratorio en la zona litoral del Arroyo Girado, afluente de la Laguna de Chascomús, Provincia de Buenos Aires (Figura 85). Este sitio se encuentra impactado por la descarga de efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús, donde Valdés *et al.* (2015) reportaron 43 ng EE₂/L y 369 ng E₂/L en aguas receptoras y 65 ng EE₂/L y 631 ng E₂/L en los efluentes cloacales respectivamente. Ambos muestreos se realizaron en el sitio ubicado en la zona de mezcla entre las aguas del Arroyo Girado y los efluentes cloacales en diciembre de 2014 y de 2016 (Figura 85C).



Figura 85. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de *C. decemmaculatus* sobre el Arroyo Girado (Chascomús, Argentina). A: Mapa del este de la Provincia de Buenos Aires, donde se marca la ubicación de la Ciudad de Chascomús. Barra = 10 km. B: Vista aérea de la Ciudad y de la Laguna de Chascomús y del Arroyo Girado. Barra = 1 km. C: Zona de muestreo en la salida de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús sobre el Arroyo Girado, donde se observa que aguas arriba se encuentra la laguna. ● Ubicación del sitio de muestreo: Aguas receptoras de efluentes cloacales. Barra = 0,5 km. Adaptado de imágenes tomadas de Google Earth®.

Los resultados obtenidos en el primer muestreo se muestran en la Figura 86. En este muestreo exploratorio realizado en diciembre de 2014, se encontró que la especie más abundante de la comunidad de peces en este sitio fue *C. decemmaculatus* (86%), seguida por *Jenynsia multidentata* (10%) y luego por *Corydora paleatus* (4%) ($n = 69$, Figura 86A).

Respecto a *Cnesterodon decemmaculatus*, se encontró que la proporción de sexos fenotípicos fue de 47% hembras, 33% machos y 20% ejemplares sexualmente indiferenciados, de acuerdo a los criterios establecidos en el Capítulo N°1 ($n = 51$, Figura 86B). En ninguno de los machos evaluados se encontraron alteraciones en la histología gonadal ni en los caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, se observó la pigmentación en la zona perianal hallada en las exposiciones de juveniles de *C. decemmaculatus* en condiciones de laboratorio, en el 35% de los ejemplares muestreados ($n = 51$, Figura 86C).

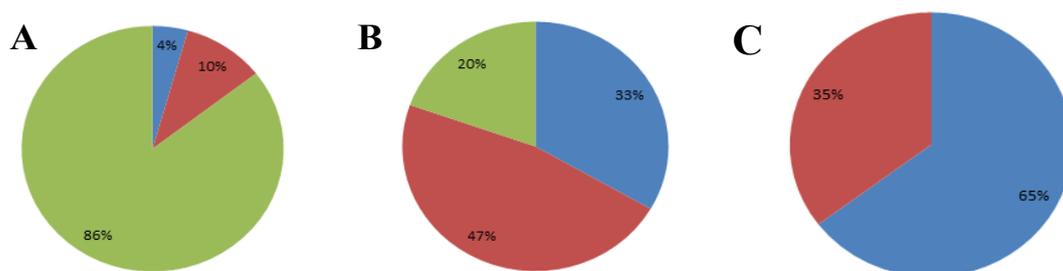


Figura 86. Primer muestreo exploratorio de peces en la zona litoral del Arroyo Girado, ubicado en la descarga de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús. A: Abundancia relativa de la comunidad de peces muestreados, donde ● *C. decemmaculatus*, ● *Jenynsia multidentata* y ● *Corydora paleatus*. B: Proporción de fenotipos sexuales de *C. decemmaculatus*, donde ● individuos sexualmente indiferenciados, ● machos y ● hembras. C: Porcentaje de ejemplares de *C. decemmaculatus* que presentaban pigmentación en la zona perianal, donde ● sin pigmentación y ● con pigmentación. Todos los ejemplares que presentaron pigmentación en la zona perianal tenían características fenotípicas de hembras o de ejemplares sexualmente indiferenciados.

En ninguno de los machos evaluados se encontraron alteraciones en la histología gonadal ni alteración de los caracteres sexuales secundarios. Recientemente, Zambrano *et al.* (2018) tampoco encontraron alteraciones de la histología gonadal han muestreado machos

adultos de *C. decemmaculatus* en sitios del Río Suquía (Córdoba, Argentina) donde se sabe que hay presencia de compuestos estrogénicos Valdés *et al.* (2014).

La relevancia de estos muestreos exploratorios estuvo principalmente asociada al hallazgo en condiciones naturales de la pigmentación en la zona perianal descrita en las exposiciones de juveniles de *C. decemmaculatus* en condiciones de laboratorio (Capítulo N°3).

En el segundo muestreo exploratorio realizado en diciembre de 2016, se halló una diferencia marcada en la proporción de sexos fenotípicos (Figura 87A) con una mayor cantidad de machos (71,9%, $n = 64$). Sin embargo, aún así, se registró un 25,8% de ejemplares con pigmentación en la zona perianal asociados a los fenotipos hembra y sexualmente indiferenciado. Ningún macho fenotípico presentó esta alteración (Figura 87B).

El análisis de machos fenotípicos discriminado según los estadios de morfogénesis del gonopodio, mostró que el 9,3% se encontraban en el Estadio 2, el 46,5% en estadio 3 y el 44,2% en estadio 4. En todos los machos evaluados en este muestreo, tampoco se encontraron alteraciones en la histología gonadal ni en los caracteres sexuales secundarios. En los testículos de dichos individuos se observaron todos los estadios de la espermatogénesis.

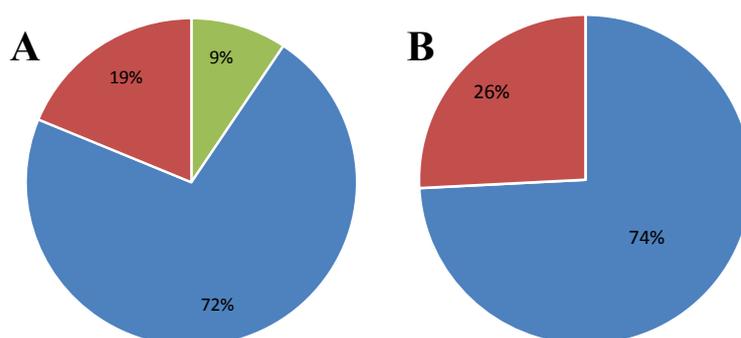


Figura 87. Segundo muestreo exploratorio de *C. decemmaculatus* en la zona litoral del Arroyo Girado, ubicado en la descarga de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús. A: Proporción de sexos fenotípicos, donde ● individuos sexualmente indiferenciados, ● machos y ● hembras. B: Pigmentación en la zona perianal, donde ● sin pigmentación y ● con pigmentación. Todos los ejemplares que presentaron pigmentación en la zona perianal tenían características fenotípicas de hembras o ejemplares sexualmente indiferenciados.

El problema más crítico de un sistema de prueba *in vivo* es su capacidad para predecir los efectos adversos sobre el sistema endocrino en las poblaciones silvestres (Baumann *et al.*, 2013). Los sistemas de prueba *in vivo* permiten detectar potenciales biomarcadores que tienen una aplicación directa en el estudio de EDCs en la fauna silvestre. Entre los biomarcadores más utilizados para detectar si hubo exposición o efecto adverso inducidos por EDCs, se encuentran los niveles de vitelogenina, histología gonadal y la expresión de genes vinculados a la activación o inhibición de enzimas esteroidogénicas o receptores de esteroides sexuales (Kime *et al.*, 1999; Rodgers-Gray *et al.*, 2001; Cheshenko *et al.*, 2008; García-Reyero *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando se comparan los efectos encontrados en estudios llevados a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio con aquellos registrados en animales colectados del ambiente, surgen varias dificultades. Entre ellas, se puede mencionar que las exposiciones en el laboratorio generalmente se realizan con un solo compuesto de prueba, mientras que en el ambiente los animales se encuentran expuestos a una mezcla compleja de compuestos. Esta mezcla compleja puede generar sinergismo o antagonismo entre los compuestos cuando ambos se encuentran dentro del organismo expuesto (Klaassen, 2001). Además, se debe tener cuidado al extrapolar efectos entre animales de laboratorio y animales silvestres, ya que pueden presentar diferencias de susceptibilidad (Tyler *et al.*, 1998). Como se mencionó anteriormente, existe mucha evidencia sobre los efectos adversos inducidos por los EDCs en peces que habitan en ambientes naturales (Jobling *et al.*, 1998; Jobling *et al.*, 2006).

Recientemente, Vidal *et al.* (2018) han publicado que algunas hembras de *C. decemmaculatus* que habitaban en ambientes naturales de Uruguay, presentaban indicios de elongación de los radios tercero, cuarto y quinto de la aleta anal. Estos autores mencionaron que estas características morfológicas, similares al gonopodio de los machos, son evidencias de masculinización. Sin embargo, no pudieron determinar químicamente que compuesto o mezcla de los mismos, causó este efecto.

Por ello, se toman relevancia los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el laboratorio y confirmados en el ambiente, respecto de la pigmentación en la zona perianal en *C. decemmaculatus*. En cuanto a los muestreos exploratorios realizados en un ambiente impactado por compuestos estrogénicos, se registró un 35% en el primer muestreo y un 26% en el segundo. De acuerdo a Valdés *et al.* (2015), las concentraciones medidas en estas aguas receptoras (Arroyo Girado) fueron de 43 y 369 ng/L de EE₂ y E₂ y en los efluentes cloacales de 187 y 170 ng/L de EE₂ y E₂, respectivamente. Esta

evidencia permitiría postularlo como un potencial biomarcador de exposición a compuestos estrogénicos.

Índice de tablas

Tabla 1. Principales compuestos estrogénicos	9
Tabla 2. Concentraciones (ng/L) de compuestos estrogénicos en muestras de agua para consumo humano, cuerpos de agua superficiales y efluentes cloacales de la Argentina.	15
Tabla 3. Parámetros del modelo de crecimiento de Von Bertalanffy, estimados a través de la Ecuación 1.....	40
Tabla 4. Coeficientes del modelo de crecimiento de la relación largo-peso estimados a través de la Ecuación 2	45
Tabla 5. Criterios que permiten determinar el fenotipo sexual de <i>C. decemmaculatus</i> .	48
Tabla 6. Estadística descriptiva de los parámetros morfológicos medidos e índices determinados para cada sexo fenotípico y estadio de morfogénesis del gonopodio, en el caso de los machos.	71
Tabla 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros morfológicos en machos ($n = 203$).	72
Tabla 8. Coeficientes de correlación de Spearman entre parámetros morfológicos en hembras ($n = 82$).	72
Tabla 9. Media (\pm desviación estándar) de las concentraciones de EE ₂ medidas en el agua de cada tratamiento ($n = 3$).	120
Tabla 10. Media (\pm desviación estándar) de las concentraciones de EE ₂ medidas en el medio de cada tratamiento del Experimento N°2.	152
Tabla 11. Valores promedios (\pm desviación estándar) de mortalidad, tamaño, condición y parámetros e índices de la morfología del gonopodio en machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a las diferentes concentraciones de EE ₂ en los Experimentos N°1 y N°2.	153
Tabla 12. Valores de NOEC y LOEC estimados en machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a EE ₂	167
Tabla 13. Estadística descriptiva de las concentraciones de compuestos estrogénicos publicadas en distintas matrices ambientales de Argentina.	178

Índice de figuras

Figura 1. Producción de sustancias peligrosas para el ambiente (en millones de toneladas) entre 2004 y 2016 en Europa. Las diferentes clases de químicos están clasificados de acuerdo con su efecto en el ambiente desde el más peligroso (crónico severo) al menos peligroso (agudo significativo). Adaptado de las estadísticas publicadas por Eurostat (2018).	2
Figura 2. Estructura molecular de los estrógenos naturales: a) estrona (E ₁), b) 17β-estradiol (E ₂), y c) estriol (E ₃).	7
Figura 3. Diagrama de las vías de ingreso de compuestos estrogénicos al suministro de agua de bebida. Modificado de Wise <i>et al.</i> (2011).	13
Figura 4: Relaciones filogenéticas de la familia Poeciliidae con énfasis en la subfamilia Poeciliinae (Ghedotti, 2000).	20
Figura 5. Durante la copulación, el gonopodio se mueve hacia adelante y transfiere los cúmulos de espermatozoides, las espermatozeugmatas, directamente al poro urogenital femenino. Tomado de Ogino et al. (2004).	26
Figura 6. Extremo distal del gonopodio de un macho adulto de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> . En la izquierda de la figura se indican los números de los radios, donde a = ramificación anterior y p = ramificación posterior. Barra=1 mm (Adaptado de Ghedotti, 2000).	29
Figura 7. Vista del sistema de cría de <i>C. decemmaculatus</i> bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2°C) y fotoperiodo (16L:8O).	31
Figura 8. Vista del acuario de <i>C. decemmaculatus</i> en piletas de 350 L. de capacidad dentro de un invernadero (IMYZA, INTA).	32
Figura 9. Parámetros morfológicos medidos en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> . A: macho (LE promedio = 16,95 ± 3,21 mm; n = 203). B: hembra (LE promedio = 24,10 ± 3,25 mm; n = 82). LE: largo estándar, R4: longitud del cuarto radio de la aleta anal, R6: longitud del sexto radio de la aleta anal.	35
Figura 10. Diagrama de dispersión del largo estándar en función de la edad. A: La línea ajusta el modelo de crecimiento de Von Bertalanffy (n = 289; R ² = 0,712). Líneas punteadas indican los límites inferior y superior del intervalo de confianza 95%. B: ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.	41

Figura 11. Media del largo estándar (LE) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.....	42
Figura 12. Media del peso corporal (W) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.	43
Figura 13. Diagrama de dispersión del peso corporal (W) en función del largo estándar (LE) ($n = 292$). A: ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. B: Curva de regresión no lineal entre W y LE. C: Curva de regresión lineal entre los logaritmos neperianos de W y LE. B-C: Líneas punteadas indican los límites inferior y superior del intervalo de confianza 95%.	44
Figura 14. Media del índice de condición corporal (Factor K) para cada sexo. Las barras muestran la desviación estándar con respecto a la media. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre grupos.	45
Figura 15. Relación entre la longitud del radio 4 de la aleta anal (R4) y el peso corporal (W). A: Diagrama de dispersión discriminado por sexos: ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. B: Modelo de crecimiento en hembras ($R^2 = 0,965$; $n = 162$). C: Modelo de crecimiento en machos ($R^2 = 0,836$; $n = 243$).....	47
Figura 16. Diagramas de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del índice de elongación (IE). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: IG = 21% e IE = 1,25. De esta figura se puede establecer el siguiente criterio: IG > 21% e IE > 1,25 son machos.....	49
Figura 17. Diagrama de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del peso corporal (W). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: IG = 23% y 27,2%; Peso = 85 mg. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) IG < 23% y W > 85 mg son hembras; 2) IG > 27,2% son machos, independientemente del peso corporal.	50
Figura 18. Diagrama de dispersión del índice de elongación (IE) en función del peso corporal (W). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: IE = 1,15 y 1,36; W = 85 mg. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) W > 85 mg y IE < 1,15 son hembras; 2) IE > 1,36 son machos, independientemente del peso corporal.	50
Figura 19. Diagrama de dispersión de la longitud del radio 4 de la aleta anal en función del índice de elongación (IE). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦	

hembras. Líneas de corte: $R4 = 4,6$ mm; $IE = 1,36$. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) $R4 > 4,6$ mm e $IE < 1,36$ son hembras; 2) $IE > 1,36$ son machos, independientemente de la longitud del radio 4 de la aleta anal.....	51
Figura 20. Diagrama de dispersión de la longitud del radio 6 de la aleta anal en función del índice de elongación (IE). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: $R6 = 3,8$ mm; $IE = 1,36$. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) $R6 > 3,8$ mm e $IE < 1,36$ son hembras; 2) $IE > 1,36$ son machos, independientemente de la longitud del radio 6 de la aleta anal.....	52
Figura 21. Diagrama de dispersión del índice gonopodial (IG) en función del largo estándar (LE). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras. Líneas de corte: $IG = 24\%$ y 28% ; $LE = 18$ mm. De esta figura se pueden establecer los siguientes criterios: 1) $IG < 24\%$ y $LE > 18$ mm son hembras; 2) $IG > 28\%$ son machos, independientemente de la talla.	53
Figura 22. Diagrama de dispersión donde se observa la longitud del radio 4 de la aleta anal en función de la talla (A) y la edad (B). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.	54
Figura 23. Diagrama de dispersión donde se observa la longitud del radio 6 de la aleta anal en función de la talla (A) y la edad (B). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.	54
Figura 24. Diagrama de dispersión donde se observa el índice gonopodial en función de la talla (A) y la edad (B). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.....	55
Figura 25. Diagrama de dispersión donde se observa el índice de elongación en función de la talla (A) y la edad (B). ♦ individuos sexualmente indiferenciados, ♦ machos y ♦ hembras.....	56
Figura 26. Aleta anal representativa de ejemplares sexualmente indiferenciados que corresponde al Estadio 1 de machos fenotípicos. A: Fotografía de un ejemplar sexualmente indiferenciado. B: Coloración de las estructuras cartilaginosas se observan coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).	57
Figura 27. Distribución de frecuencias de las tallas de ejemplares sexualmente indiferenciados, considerados como Estadio 1 de la morfogénesis del gonopodio ($n =$	

175). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.	58
Figura 28. Gonopodio representativo de machos fenotípicos en Estadio 2. A-B: Fotografías de machos donde se observa la aparición del primordio gonopodial (A) y la consecuente elongación de los radios tercero, cuarto y quinto (B). C: Coloración de las estructuras cartilagosas se observan coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal. PG = primordio gonopodial (Barra = 1 mm)...	59
Figura 29: Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 2 ($n = 60$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.	60
Figura 30. Machos representativos de Estadio 3. A: Fotografía de un macho con el gonopodio elongado. B: Coloración <i>in toto</i> del gonopodio. Las estructuras cartilagosas se encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).	61
Figura 31. Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 3 ($n = 24$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.	62
Figura 32. Machos representativos de Estadio 4. A: Fotografía de un macho con el gonopodio completamente maduro. B-C: Coloración <i>in toto</i> del gonopodio. Las estructuras cartilagosas se encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal. Se muestra una vista completa (B) y el extremo distal (C) del gonopodio. S = sierras; G = gancho; C = cirros. Barra = 1 mm.	63
Figura 33. Distribución de frecuencias de las tallas de machos en el Estadio 4 ($n = 203$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en frecuencias observadas) y — representa a las frecuencias normalizadas.	64
Figura 34. Distribución de frecuencias de las tallas de machos fenotípicos ($n = 203$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.	65
Figura 35. Aleta anal representativa de hembras adultas. A: Fotografía de la aleta anal de una hembra. B: Coloración <i>in toto</i> de una hembra. Las estructuras cartilagosas se	

encuentran coloreadas en azul (Alcian-blue) y las óseas en rojo (Alizarine-red). Las flechas indican cada uno de los radios (R) y su respectiva numeración que aumenta en sentido ventral-dorsal (Barra = 1 mm).	66
Figura 36. Distribución de frecuencias de las tallas de hembras fenotípicas ($n = 82$). ■ representa a las frecuencias relativas (basadas en valores observados) y — representa a las frecuencias normalizadas.	67
Figura 37. Diagramas de dispersión de Índice de Desarrollo del Gonopodio en función de la talla (A), la edad (B) y el peso corporal (C). Los distintos sexos fenotípicos y estadios de desarrollo del gonopodio se encuentran representados por: ● ejemplares sexualmente indiferenciados o Estadio 1 del macho, ▲ Estadio 2 del macho, ■ Estadio 3 del macho, ▼ Estadio 4 del macho y ● hembras. Las líneas de corte horizontales marcan la separación entre los distintos estadios en valores de IDG iguales a 0,19; 0,37 y 0,57... 68	68
Figura 38. Diagrama de cajas (box plot) del Índice de Desarrollo del Gonopodio en función del Estadio y sexo fenotípico. Las cajas contienen la variabilidad del 50% de los valores centrales, la línea horizontal que se encuentra dentro de cada caja representa a la media y las barras indican los valores máximos y mínimos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).	69
Figura 39. Esquema del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG).	80
Figura 40. Estadio 1 del desarrollo testicular de <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; T: tabique; Sg: cisto de espermatogonias; S: células somáticas testiculares (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).	90
Figura 41. Estadio 2 del desarrollo del testículo en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; T: tabique; Sg: cisto de espermatogonias; S: células somáticas testiculares; De: ductos espermáticos (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).	91
Figura 42. Estadio 3 del desarrollo testicular en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; V: vasos sanguíneos; Sg: cisto de espermatogonias; Sc: cisto de espermatocitos; St: cisto de espermátidas; De: ductos espermáticos (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).	92
Figura 43. Estadio 4 del desarrollo testicular en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Sc: cisto de espermatocitos; St: cisto de espermátidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ductos eferentes (Aumento = 40x; barra = 50 μ m).	93
Figura 44. Estadio 5 del desarrollo testicular en <i>C. decemmaculatus</i> . St: cisto de espermátidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ductos eferentes; S: células somáticas (parénquima) testiculares; I: intestino (Aumento = 40x; barra = 50 μ m).	94

Figura 45. Estadio 1 del desarrollo del ovario en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; S: células somáticas ováricas (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).	95
Figura 46. Estadio 2 del desarrollo ovárico en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; S: células somáticas ováricas. Las flechas indican la ubicación de un grupo de células somáticas con crecimiento centrípeto en la región dorso lateral del ovario (Aumento = 400x; barra = 50 μ m).	96
Figura 47. Estadio 3 del desarrollo del ovario en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).97	
Figura 48. Estadio 4 del desarrollo del ovario en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; Eo: estroma ovárico (Aumento = 200x; barra = 50 μ m).	98
Figura 49. Estadio 5 del desarrollo del ovario en <i>C. decemmaculatus</i> . M: mesenterio; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Ov: oocito vitelogénico; Co: cavidad ovárica; Eo: estroma ovárico; V: vaso sanguíneo (Aumento = 100x; barra = 50 μ m).	99
Figura 50. Relación entre la talla, el peso y la edad en individuos sexados por histología gonadal (A-C-E) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D-F). A-B: largo estándar (LE) en función del peso corporal (W). C-D: largo estándar en función de la edad. E-F: peso corporal en función de la edad. ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	100
Figura 51. Longitud del radio 4 de la aleta anal (R4) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	101
Figura 52. Longitud del radio 6 de la aleta anal (R6) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	102
Figura 53. Índice gonopodial (IG) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	103
Figura 54. Índice de elongación (IE) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los	

caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	104
Figura 55. Índice de condición (Factor <i>K</i>) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras.	105
Figura 56. Índice de desarrollo del gonopodio (IDG) en función del largo estándar (A-B) y de la edad (C-D) en individuos sexados por histología gonadal (A-C) y en individuos sexados por los caracteres fenotípicos propios de la especie (B-D). ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Las líneas de corte horizontales marcan la separación entre los distintos estadios en valores de IDG iguales a 0,19; 0,37 y 0,57.	106
Figura 57. Porcentaje de mortalidad observada en función del logaritmo de la concentración de EE ₂ luego de 94 días de exposición.	120
Figura 58. Largo estándar (LE) y peso corporal (W) en función de la concentración de EE ₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. *** $p < 0,001$	122
Figura 59. Índice de condición (Factor <i>K</i>) en función de la concentración de EE ₂ para cada fenotipo sexual: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	123
Figura 60. Longitud del radio 4 (R4) y 6 (R6) de la aleta anal en función de la concentración de EE ₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	124
Figura 61. Índice gonopodial (IG) e índice de elongación (IE) en función de la concentración de EE ₂ para cada sexo fenotípico: ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos y ■ hembras. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, respecto del tratamiento control. ** $p < 0,01$	126
Figura 62. Proporción de sexos fenotípicos en función de la concentración de EE ₂ . ■ ejemplares sexualmente indiferenciados, ■ machos. ■ hembras y ■ fenotipo atípico.	127
Figura 63. Número total de machos en cada estadio de desarrollo en función de la concentración de EE ₂ . ● Estadio 2; ● Estadio 3; ● Estadio 4.	127

Figura 64. Proporción de sexos gonadales en función de la concentración de EE ₂ al finalizar los 94 días de exposición de ejemplares en estadios tempranos de desarrollo.	128
Figura 65. Histología gonadal normal (sin alteraciones) en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> del tratamiento control. A: testículo de los fenotipos machos o sexualmente indiferenciados. B: ovario de los fenotipos hembras o sexualmente indiferenciados. Sg: cisto con espermatogonias; T: tabique; S: células somáticas; V: vaso sanguíneo; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio (Aumento = 40x; Barra = 50 μm).....	130
Figura 66. Histología gonadal de individuos del fenotipo sexualmente indiferenciado de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a 100 ng/L de EE ₂ , donde se observa un ovario alterado. G: gonias; Op: oocito primario; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio (Aumento = 40x; Barra = 50 μm).	131
Figura 67. Histología gonadal de individuos del fenotipo hembra de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a EE ₂ . A: ovario alterado con hiperplasia de la cavidad ovárica en una hembra expuesta a 100 ng/L (Aumento = 10x). B: ovario alterado con tejido necrótico en una hembra expuesta a 30 ng/L (Aumento = 20x). V: vaso sanguíneo; Oo: oogonia; Op: oocito primario; Ov: oocito en vitelogénesis lipídica; Co: cavidad ovárica; M: mesenterio; N: tejido necrótico; Eo: estroma ovárico; I: intestino (Barra = 50 μm).	132
Figura 68. Histología gonadal de individuos categorizados con un fenotipo atípico expuestos a 100 ng/L de EE ₂ . Fenotipo atípico: características morfológicas que no se ajustaron a los criterios establecidos en el Capítulo N°1 para fenotipos normales. Se observan gónadas alteradas e indiferenciables (sin las características típicas del ovario ni del testículo). G: gonias; d: ducto; M: mesenterio; P: células del parénquima gonadal (Aumento = 20x; Barra = 50 μm).....	133
Figura 69. Histología gonadal de individuos categorizados con un fenotipo macho de <i>C. decemmaculatus</i> en Estadio 2, expuestos a 100 ng/L o 300 ng/L de EE ₂ . A: individuo con gónada gónadas alteradas e indiferenciables, pero con presencia de algunos cistos de espermatogonias. B: individuo con un ovario formado y se observan oocitos en distintos estadios de la oogénesis. G: gonias; V: vaso sanguíneo; d: ducto; M: mesenterio; P: células del parénquima gonadal; I: intestino; Co: cavidad ovárica; Op: oocito primario (Aumento = 20x; Barra = 50 μm).....	134
Figura 70. Pigmentación en la región perianal de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a EE ₂ . A: característica normal; B: pigmentación de individuos expuestos a EE ₂	135

Figura 71. Porcentaje de individuos con pigmentación de la región perianal en función de la concentración de EE ₂ al finalizar los 94 días de exposición.	136
Figura 72. α -MSH actúa vía cAMP acoplado al receptor MC1 (MC1R) para activar tirosinasa y estimular la melanogénesis. Tomado de Thody (1999).	141
Figura 73. Curvas de calibración área-concentración utilizadas para describir el fraccionamiento de una solución estándar de EE ₂ . A: molécula desprotonada m/z 295,25 para ión precursor del EE ₂ ; B-C: los iones producto fueron m/z 267,17 y m/z 262,25. El ión m/z 267,17 fue usado para cuantificación de EE ₂ en muestras de agua.	151
Figura 74. Aleta anal representativa de un macho adulto control de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> coloreado <i>in toto</i> . Las estructuras óseas y cartilaginosas fueron coloreadas con Alizarin Red y Alcian Blue, respectivamente. La numeración de los radios de la aleta (R) aumenta en sentido ventral-dorsal. A: anterior; P: posterior; V: ventral; D: dorsal; S: sierras; G: ganchos; C: cirros (Barra = 1 mm).	154
Figura 75. Histología testicular de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> normal, observada en el grupo control y grupo expuestos a 20 ng/L de EE ₂ en semana 16. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; Sc: cisto de espermatocitos; Sg: cisto de espermatogonias; St: cisto de espermatidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ducto eferente; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 μ m).	156
Figura 76. Histología testicular de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> en fase de alteración temprana, observada en ejemplares expuestos a 100 ng/L de EE ₂ en semana 8 y 16 o 200 ng/L en semana 8. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; H: hígado; Sz: espermatozeugmata; DE: ducto eferente; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 μ m).	157
Figura 77. Histología testicular de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> en fase de alteración intermedia, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L EE ₂ en semana 12 y 16. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; Cg: cisto de gonias; St: cisto de	

espermátidas; Sz: espermatozeugmata; DE: ducto eferente; Ci: células intersticiales (Barra = 50 µm).....	158
Figura 78. Histología testicular de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> en fase de alteración avanzada, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L de EE ₂ sólo en semana 16. El recuadro punteado en el panel A (Aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor resolución en B (Aumento = 200x). Las puntas de flechas muestran la ubicación de los oocitos primarios y secundarios. Los asteriscos (*) indican la zona con secreción eosinófila y PAS-positiva. T: testículo; I: intestino; M: músculo; H: hígado; Cg: cisto con gonias; St: cisto de espermátidas; Sz: espermatozeugmata; Ce: células epiteliales del ducto eferente (Barra = 50 µm).....	159
Figura 79. Porcentaje de intersexos de <i>C. decemmaculatus</i> en función de la concentración de EE ₂ expuestos a durante 8 o 16 semanas (Experimento N°2).....	160
Figura 80. Cambios histológicos cuantitativos observados en las gónadas de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a EE ₂ durante 16 semanas (Experimento N°2): (A) porcentaje de cortes histológicos con presencia de oocitos en peces con <i>testis-ova</i> ; (B) número de oocitos por pez con <i>testis-ova</i> . Los valores presentados son la mediana del parámetro. Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (prueba de la mediana, $p < 0,05$) son indicadas con letras diferentes.	161
Figura 81. Histología hepática normal en machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> , observada en los ejemplares del grupo control y en aquellos expuestos a 20 ng/L de EE ₂ durante 8 y hasta 16 semanas. Estos cortes histológicos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). H: hígado; I: intestino; T: testículo; Hep: hepatocito (Barra = 50 µm).....	163
Figura 82. Histología hepática de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> con alteración leve, observada en ejemplares expuestos a 100 ng/L de EE ₂ durante 16 semanas o 200 ng/L durante 8 semanas. Los cortes histológicos de los paneles A y B fueron coloreados con hematoxilina-eosina, mientras que los cortes del panel C, fueron coloreados con PAS. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Las puntas de flechas indican la ubicación de células en necrosis. H: hígado; I: intestino; VL: macrovesículas lipídicas (Barra = 50 µm).	164
Figura 83. Histología hepática de machos adultos de <i>C. decemmaculatus</i> con alteración avanzada, observada en ejemplares expuestos a 200 ng/L de EE ₂ durante 16 semanas.	

Estos cortes histológicos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El recuadro punteado en el panel A (aumento = 40x), representa el área mostrada con mayor detalle en B (aumento = 200x). Las puntas de flechas indican la ubicación de células en necrosis. H: hígado; I: intestino; T: testículo; VL: macrovesículas lipídicas; ME: material eosinófilo (Barra = 50 μ m)..... 165

Figura 84. Daño hepático en machos adultos de *C. decemmaculatus* luego de 16 semanas de exposición a EE₂. Se muestran valores promedios (\pm error estándar) del I_{org} (del inglés, *organ index*). Los asteriscos (***) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con EE₂ y el control ($p < 0,001$)..... 166

Figura 85. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de *C. decemmaculatus* sobre el Arroyo Girado (Chascomús, Argentina). A: Mapa del este de la Provincia de Buenos Aires, donde se marca la ubicación de la Ciudad de Chascomús. Barra = 10 km. B: Vista aérea de la Ciudad y de la Laguna de Chascomús y del Arroyo Girado. Barra = 1 km. C: Zona de muestreo en la salida de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús sobre el Arroyo Girado, donde se observa que aguas arriba se encuentra la laguna. ● Ubicación del sitio de muestreo: Aguas receptoras de efluentes cloacales. Barra = 0,5 km. Adaptado de imágenes tomadas de Google Earth®..... 224

Figura 86. Primer muestreo exploratorio de peces en la zona litoral del Arroyo Girado, ubicado en la descarga de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús. A: Abundancia relativa de la comunidad de peces muestreados, donde ● *C. decemmaculatus*, ● *Jenynsia multidentata* y ● *Corydora paleatus*. B: Proporción de fenotipos sexuales de *C. decemmaculatus*, donde ● individuos sexualmente indiferenciados, ● machos y ● hembras. C: Porcentaje de ejemplares de *C. decemmaculatus* que presentaban pigmentación en la zona perianal, donde ● sin pigmentación y ● con pigmentación. Todos los ejemplares que presentaron pigmentación en la zona perianal tenían características fenotípicas de hembras o de ejemplares sexualmente indiferenciados..... 225

Figura 87. Segundo muestreo exploratorio de *C. decemmaculatus* en la zona litoral del Arroyo Girado, ubicado en la descarga de los efluentes cloacales de la Ciudad de Chascomús. A: Proporción de sexos fenotípicos, donde ● individuos sexualmente indiferenciados, ● machos y ● hembras. B: Pigmentación en la zona perianal, donde ● sin pigmentación y ● con pigmentación. Todos los ejemplares que presentaron pigmentación en la zona perianal tenían características fenotípicas de hembras o ejemplares sexualmente indiferenciados. 226

