

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al Título de:
Magíster en Ciencias Ambientales

**VALIDACIÓN DE UN BIOENSAYO DE LABORATORIO PARA LA
DETERMINACIÓN DE EFECTOS DE DISRUPCIÓN ENDÓCRINA
A NIVEL REPRODUCTIVO EN *Cyprinus carpio* EXPUESTOS A
SEDIMENTOS DEL RÍO URUGUAY**

Presentada por: Lic. Noelia Rivas
Orientadora: Dra. Gabriela Eguren

Montevideo, Uruguay
Abril 2008

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que colaboraron en el desarrollo de este trabajo:

- A Gaby por su apoyo permanente

- A Adrina Delfraro, Ana Silva y en particular a Nibia Berois y su grupo, por la cooperación en cada una de las etapas del procesamiento de muestras

- Al Tribunal evaluador: Kelly Munkittrick, Néstor Mazzeo y Ricardo Barra, cuyos comentarios y sugerencias hicieron crecer el trabajo. Especialmente a Kelly por su cooperación en el muestreo, diseño experimental y todos lo contribuido para esta investigación

- Al proyecto INIA SA07 por financiar parte del trabajo

- A Clau, Franco, Leo, Naty, Nico, Sole y Vero por su ayuda en varias etapas del trabajo

- Al conjunto de docentes y estudiantes de la Maestría en Ciencias Ambientales y compañeros de la UNCIEP por ser tan pacientes conmigo en estas últimas instancias.

- Y finalmente y especialmente a mi familia y amigos por estar conmigo siempre en cada uno de mis logros profesionales y personales

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Disrupción endocrina	5
1.2 Regulación del desarrollo gonadal en peces	8
2. INVESTIGACIÓN PROPUESTA	11
2.1 Caracterización de la Cuenca del río Uruguay	11
2.2 Enfoque metodológico	12
2.3 Fundamentación	13
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Sectores del río Uruguay evaluados	17
6.2 Diseño Experimental	19
6.3 Factor de condición e Índices somáticos (IGS e IHS)	20
6.4 Cortes histológicos	21
6.5 Determinación de vitelogenina plasmática	21
6.6 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	24
7.1 Factor de Condición e Índices somáticos (IGS e IHS)	24
7.2 Cortes histológicos	29
7.3 Niveles de vitelogenina plasmática	32
8 DISCUSIÓN	34
9 CONCLUSIONES	39
10 PERSPECTIVAS	40
11 BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1:	Respuestas biológicas frente a exposición a compuestos químicos	7
Figura 2:	Esquema de la síntesis de vitelogenina	9
Figura 3:	Sectores del río Uruguay evaluados en el ensayo	18
Figura 4:	Extracción de sedimentos	18
Figura 5:	Diseño experimental	20
Figura 6:	Sembrado en placa ELISA	22
Figura 7:	Relación Peso-Largo	24
Figura 8:	Comparación del factor de condición entre tratamientos	25
Figura 9:	Variación del peso total en función de los tratamientos	25
Figura 10:	Comparación del Índice Gonadosomático entre tratamientos	26
Figura 11:	Variación del peso de la gónada en función de los tratamientos	27
Figura 12:	Comparación del Índice Hepatosomático entre tratamientos	27
Figura 13:	Variación del peso del hígado en función de los tratamientos	28
Figura 14:	Fotografías de histología de gónadas por tratamiento	30
Figura 15:	Fotografías de histología de gónadas con intersexo	31
Figura 16:	Curva estándar de vitelogenina de <i>Cyprinus carpio</i>	32
Figura 17:	Comparación de los niveles de VTG entre tratamientos	33
Figura 18:	Variación de los niveles de VTG en función de los tratamientos	33

TABLAS

Tabla 1:	Resumen de estrategias de diferenciación gonadal en teleósteos	10
Tabla 2:	Análisis estadístico	22
Tabla 3:	Distribución porcentual de sexos por tratamiento	29

RESUMEN

La cuenca del río Uruguay es una de las de mayor relevancia en nuestro país, dado que alberga importantes centros urbanos, suministra agua potable y sustenta actividades productivas, como ser forestación, agricultura, industria, pesquería, ganadería y turismo. Asociado a dichos usos de la cuenca, el río Uruguay recibe la descarga, directa o indirecta, de compuestos xenobióticos, los cuales en función de sus propiedades físico-químicas se distribuyen en los sedimentos, biota, agua y material particulado. En particular, los sedimentos constituyen uno de los principales reservorios de una gran diversidad de compuestos químicos y existen evidencias de la capacidad de varios de estos compuestos de interferir con el sistema endocrino y provocar efectos a nivel reproductivo en peces. En tal sentido, en el presente estudio se analizó el potencial de los sedimentos del río Uruguay de interferir en la regulación del ciclo reproductivo de *Cyprinus carpio.*, mediante la determinación de una batería de biomarcadores: índices gonado y hepatosomático, factor de condición, histología de gónadas y niveles de vitelogenina plasmática. Para ello, se obtuvieron individuos juveniles de un centro de cultivo (N=60) los cuales fueron aclimatados durante 15 días en acuarios de vidrio de 30 litros en agua declorada, la cual fue recambiada cada 48 horas. Posteriormente los organismos fueron expuestos durante 30 días, a sedimentos (proporción 1:10 sedimento:agua) extraídos en diferentes sectores del río. Dichos sectores fueron seleccionados en función de las principales actividades de la zona (industrial, urbanización y agrícola). De la batería de biomarcadores evaluada, los efectos sobre IGS, IHS y K, siguen un patrón claro en relación a la actividad realizada en la zona de estudio: zonas industriales presentan elevados K aunque estadísticamente no significativos y un IHS en aumento; mientras que los sitios agrícolas presentan elevados IGS. Así mismo, las actividades industriales provocan la aparición de testis-ova. Los efectos en la componente bioquímico-molecular (niveles de vitelogenina plasmática) fueron superiores en todos los tratamientos respecto al control pero no mostraron un patrón con relación a las actividades antrópicas. De los resultados obtenidos se desprende que, actualmente, el río Uruguay se encuentra recibiendo la descarga de compuestos con capacidad de provocar efectos de disrupción endócrina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Disrupción endocrina

El sistema endócrino es el principal regulador de importantes procesos metabólicos tales como nutrición, desarrollo y reproducción, entre otros. Es el responsable del mantenimiento de los mecanismos homeostáticos, mediante acciones de regulación positiva y negativa que permiten mantener los niveles hormonales en equilibrio (IPCS, 2002).

Las hormonas son producidas y secretadas al torrente sanguíneo, por las glándulas endocrinas (hipotálamo, pituitaria, gónadas, etc.), en pequeñas concentraciones. Posteriormente se unen a receptores específicos de las células blanco de tejidos u órganos (hígado, órganos reproductivos, sistema nervioso, etc.) desencadenando una cascada de señales que dará lugar a las funciones correspondientes.

Dentro de éstas, las hormonas esteroidales, como por ejemplo las hormonas sexuales, son lipofílicas y se sintetizan a partir del colesterol. Poseen la capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células blanco y mediante la unión a receptores citoplasmáticos actúan a nivel del ADN, activando genes o modulando su transcripción (Stryer, 1995; EPA, 1997).

Existe un conjunto de compuestos de diferente naturaleza química y origen presentes en el ambiente que son capaces de interferir con el sistema endocrino. Estos compuestos reciben el nombre de disruptores endocrinos. El término disruptor endocrino define, por tanto, a un compuesto o conjunto de compuestos químicos exógenos (naturales o sintéticos) que alteran el normal funcionamiento del sistema endocrino a través de alteraciones en el equilibrio hormonal, causando efectos en los organismos expuestos e inclusive sobre su prole (IPCS, 2002; Argemini, 2005; Pombo *et al.*, 2005).

Estos compuestos se caracterizan, en general, por ser lipofílicos (no solubles en agua), persistentes en el ambiente (vidas medias largas) y bioacumulables. Actualmente se conocen una gran cantidad de compuestos que son potencialmente generadores de estos efectos y como se mencionó anteriormente pueden ser de origen natural o artificial (Argemini, 2005; Pombo *et al.*, 2005). Los primeros son liberados o producidos por vegetales como por ejemplo fitoestrógenos, fitosteroles y ácidos resínicos. Mientras que

los artificiales son utilizados o son productos no intencionales de diversas actividades antrópicas, por ejemplo: productos fitosanitarios (DDT, dieldrín, endosulfan, lindano, atrazina, etc.), alquilfenoles (tensoactivos neutros de detergentes), bifenilos policlorados (PCBs) (presentes en aceites de transformadores), estrógenos artificiales (productos liberados por la orina de mujeres que los consumen como tratamientos anticonceptivos), dioxinas y furanos, entre otros (Bachmann, 2002; EAUK, 2005).

Si bien el espectro de compuestos capaces de producir disrupción endocrina es muy amplio, los efectos sobre el sistema endocrino se resumen a través de los siguientes mecanismos (Simpson *et al.*, 1994; Hu y Aizawa, 2003; Lintelmann *et al.*, 2003; Argemi *et al.*, 2005):

- a) Agonismo: unión y posterior activación de los receptores estrogénicos celulares produciendo una cascada de señales similar a la desencadenada por un estrógeno natural,
- b) Antagonismo:
 - I. Inhibición competitiva:
 - i. unión al receptor sin activación,
 - ii. interferencia en la síntesis natural de hormonas,
 - II. Inhibición no competitiva: unión al receptor pero no al mismo sitio activo y disminuyen la intensidad de la respuesta

Debido al importante rol del sistema endocrino, cualquiera de éstas alteraciones generará inevitablemente perjuicios sobre la salud de los organismos expuestos, independientemente de la magnitud del efecto (Argemini *et al.*, 2005; Pombo *et al.*, 2005).

A diferencia de otros compuestos, los disruptores endocrinos no poseen claras relaciones causa-efecto y se ha observado que la exposición a un determinado compuesto puede inducir más de una respuesta. Además, dado que la exposición a estos compuestos altera el funcionamiento hormonal, las respuestas desencadenadas dependerá de la concentración endógena de hormonas, la cual varía con el estado fisiológico, edad y sexo del organismo (Argemini *et al.*, 2005; Pombo *et al.*, 2005).

Diversos enfoques han sido empleados para evidenciar efectos derivados de la exposición a compuestos químicos, sin embargo aquellos basados en el uso de biomarcadores son los más ampliamente utilizados. Estos han sido definidos como “variaciones xenobioticamente inducidas en los componentes celulares o bioquímicos, procesos, estructuras o funciones que son cuantificables en un sistema biológico” (Fossi, 1994).

El primer nivel de acción de un compuesto o mezcla de compuestos químicos, ocurre en la componente bioquímico-molecular, desencadenando respuestas que tienden a mantener el funcionamiento del organismo dentro de los niveles homeostáticos. Si las concentraciones de exposición son elevadas o se mantienen durante períodos de tiempo prolongado, las respuestas pueden no ser suficientes para contrarrestar el efecto. En tal caso, el organismo desencadena en primera instancia mecanismos de compensación y luego de reparación (Shugart *et al.*, 1992) (Figura 1).

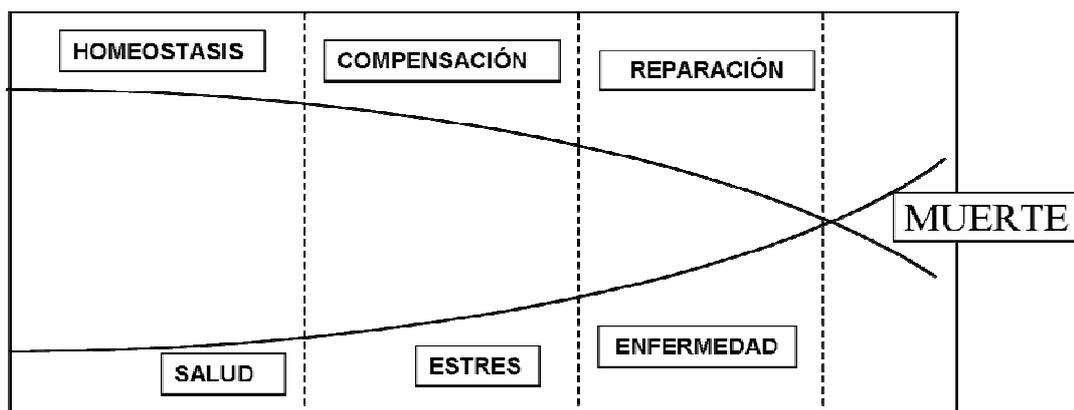


Figura 1: Respuestas biológicas frente a la exposición a compuestos o mezclas de compuestos químicos. Extraído de Shugart *et al.*, 1992.

1.2. Regulación del desarrollo gonadal en peces

El desarrollo gonadal en peces es regulado por una cascada de señales endocrinas que se realizan entre el cerebro (hipotálamo), la glándula pituitaria y las gónadas (eje pituitario gonadal). En el hipotálamo de los peces teleósteos se sintetizan las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH). Estas conjuntamente con las hormonas sexuales actúan sobre la glándula pituitaria activando la síntesis de las gonadotrofinas (GtHI y GtHII). Las GtHI y II son transportadas vía sanguínea a las gónadas, donde se unen a receptores desencadenando una serie de señales intracelulares para la síntesis de estrógeno (E_2). En peces se han identificado dos receptores para gonadotrofinas, el GtHRI que se une a ambas gonadotrofinas y el GtHRII que se une solo a la GtHII. .

La GtHI es producida previo a la madurez y promueve el crecimiento y diferenciación de los gametos, así como también la síntesis de esteroides. La GtHII es producida posteriormente y está relacionada con la liberación de gametos.

Los esteroides juegan un rol autorregulador en el proceso de desarrollo gonadal ya sea regulando la síntesis de otras hormonas o proteínas, como la de sus propios receptores celulares en función de las concentraciones circulantes en sangre (Devlin *et al.*, 2002; IPCS, 2002; Argemini *et al.*, 2005).

En lo que refiere a la síntesis de esteroides, el primer paso es el clivaje enzimático del colesterol dando lugar a la producción de pregnenolona. Esta luego de una serie de transformaciones genera la producción de la hormona testosterona (andrógeno), la cual a nivel del ovario es transformada en estradiol mediante la acción de la enzima CYP19 Aromatasa (Cheshenko *et al.*, 2008). Posteriormente el estradiol es movilizado por el torrente sanguíneo y a nivel del hígado desencadena la síntesis de la proteína vitelogenina, la que vía plasmática retorna a la gónada para la formación del vitelo huevo (Figura 2).

El estradiol posee una fuerte capacidad de inducción de la síntesis de vitelogenina, razón por la que se han detectado concentraciones variables de esta proteína en testículos tratados con estrógenos (Stryer, 1995, Devlin *et al.*, 2002; IPCS, 2002; Argemini *et al.*, 2005; Cheshenko *et al.*, 2008).

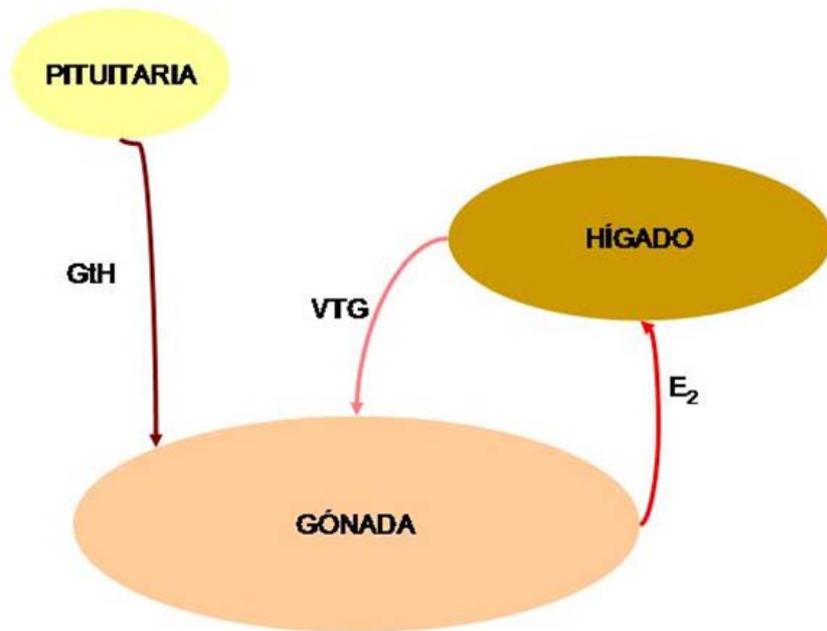


Figura 2: Esquema de la síntesis de vitelogenina.

Los peces teleósteos presentan una amplia variedad de estrategias de diferenciación gonadal (Devlin *et al.*, 2002). En la Tabla 1 se resumen las principales estrategias con sus características y especies representativas.

Cabe destacar que estas características refieren a individuos en condiciones “normales” ya que determinadas condiciones ambientales extremas o no, pueden causar tanto reversiones como intersexo en especies gonocoristas, lo que se denomina hermafroditismo anormal (Devlin *et al.*, 2002).

Tabla 1: Resumen de las estrategias de diferenciación gonadal en peces teleósteos. Modificado de Devlin , 2002

Estrategia	Características	Sub categoría	Características	Especies representativas
Gonocoristas	Individuos machos o hembras durante toda su vida reproductiva	Primarios diferenciados	Parten de una gónada indiferenciada	<i>Oncorhynchus kistuch</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>
		Primarios no diferenciados	Parten inicialmente de tejido ovárico	<i>Danio rerio</i> <i>Barbus tetrazona</i>
		Secundarios	Período de intersexo antes de la diferenciación	<i>Cheimerius nufar</i> <i>Epinephelus striatus</i> <i>Gramma loreto</i>
Hermafroditas	Individuos poseen ambos gametos, funcionales simultáneos o no, durante su vida reproductiva	Simultáneos	Producen gametos masculinos y femeninos al mismo tiempo	<i>Serranus sp.</i> <i>Rivulus marmoratus</i>
		Secuenciales	Produce primariamente un tipo de gameto y puede revertirlo en algún momento del ciclo	<i>Sparus aurata</i> <i>Amphiprion sp.</i>

2. INVESTIGACIÓN PROPUESTA

2.1. Caracterización de la Cuenca del río Uruguay

El río Uruguay constituye uno de los recursos hídricos más relevantes de nuestro país como fuente para la generación de energía, para consumo humano, uso agrícola e industrial, así como para el sustento de actividades pesqueras y turísticas. Además, recibe la descarga, directa o indirecta, de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos empleados o generados en las actividades antrópicas desarrolladas en su área de drenaje (CARU, 1993).

La zona litoral oeste de Uruguay concentra el 30 % de la producción de vacunos, el 74% de la producción de soja, casi el 80% de la producción citrícola, el 13% de la horticultura y casi el 90% de la forestación (con énfasis en *Eucaliptus sp*) del total del país (DIEA, 2005). Por otra parte, cabe resaltar que las prácticas de manejo de éstos sistemas de producción se basan en el uso intensivo de fertilizantes así como de productos para la sanidad animal y vegetal, por lo cual constituyen una potencial fuente de compuestos químicos.

En tal sentido, Uruguay importa anualmente 6 millones de kilos de herbicidas, 860 mil kilos de funguicidas y 800 mil kilos de insecticidas. Varios de ellos presentan alta persistencia en el medio, resistencia a la degradación y son lipofílicos (endosulfan, azinfos metil, diazinon, paraquat, atrazina, etc.) (DGSA, 2006). Dentro de la amplia gama de compuestos empleados, éstos últimos, aquellos que son los que representan un mayor riesgo tanto para la salud humana como para la biota acuática (Olea *et al.*, 2002; Palacio *et al.*, 2002; Barra *et al.*, 2005).

Por otra parte, la cuenca del río Uruguay alberga importantes áreas urbanas, las cuales cuentan con una baja cobertura de saneamiento. Estos residuos líquidos, conjuntamente con los generados por las industrias ubicadas en la cuenca (azucarera, cervecera, láctea, citrícola, frigorífica, curtiembre, etc.) son vertidos al río Uruguay, con escaso o nulo tratamiento previo (DINAMA, 2006).

Estudios realizados por la CARU, en el marco del Programa de Control de la Contaminación, señalan la presencia de productos fitosanitarios clorados (Aldrín,

Dieldrín, HCH, HCB, DDT y derivados, entre otros) y PCB en peces del río Uruguay. Si bien los valores hallados se encuentran muy por debajo de los niveles máximos permisibles para consumo humano, su presencia indica la entrada de estos contaminantes al ambiente y su acumulación en los tejidos de los peces (CARU, 1992). Estos compuestos también fueron detectados en agua, existiendo una buena correlación entre las concentraciones registradas y la carga de sólidos totales suspendidos. Finalmente destacan que, la adsorción de estos compuestos en sedimentos y en particular en aquellos con alto contenido de materia orgánica, hace que los mismos actúen como trampa de contaminantes, pudiendo ser reincorporados a la columna de agua por resuspensión (CARU, 1993).

2.2. Enfoque metodológico

El presente estudio se desarrolló bajo el enfoque ecosistémico integral (Parra, 1988). El mismo se basa en la cuenca hidrográfica como unidad espacial de análisis, dado que ésta integra los procesos de transporte y distribución de contaminantes, y es el más adecuado para cuencas de uso múltiple como la del Río Uruguay (Eguren, 1997).

El mismo se implementó aplicando una combinación de actividades de campo y laboratorio, a los efectos de evaluar el potencial de los sedimentos del río Uruguay de interferir con el normal funcionamiento del sistema endocrino y de generar efectos a nivel reproductivo en peces.

Los sedimentos han sido seleccionados como matriz de exposición dado que éstos actúan como trampa de contaminantes, que varios compuestos catalogados como disruptores endocrinos presentan alta afinidad por ellos y que los mismos han sido identificados en estudios anteriores como una de las principales fuentes de contaminantes estrogénicos persistentes (Peck *et al.*, 2004). Por otra parte, cabe resaltar que varios productos fitosanitarios reconocidos como disruptores endocrinos han sido detectados en agua y peces en el río Uruguay (CARU, 1992; 1993).

Para el estudio fue seleccionada una batería de biomarcadores, la cual comprendió señales de alarma temprana (concentración de vitelogenina plasmática) y tardía (factor de condición, índices hepato y gonadosomático y cortes histológicos de gónadas). Dicha

batería fue evaluada en condiciones de laboratorio, exponiendo individuos juveniles de *Cyprinus carpio* a sedimentos procedentes de diferentes sectores del río Uruguay.

2.3. Fundamentación

La presencia de vitelogenina, proteína estrógeno-inducible, en plasma indica una concentración interna elevada de compuestos estrogénicos, tanto de origen endógeno como exógeno (xenoestrógenos) (Heppell, 1995). Es por esta razón que, la presencia de concentraciones detectables de vitelogenina en plasma de machos o de individuos inmaduros ha sido propuesta como biomarcador de exposición a compuestos xenoestrogénicos (Heppell, 1995; Folmar *et al.*, 1996; Bachmann, 2002; IPCS, 2002; Vega-López *et al.*, 2005).

En tal sentido, varios estudios han demostrado la interferencia de diversos compuestos o mezcla de estos sobre el funcionamiento del sistema endocrino. Tal es el caso, donde ejemplares machos de *Cyprinus carpio* capturados en el canal del efluente de una planta de tratamiento de residuos domésticos, presentaban niveles de vitelogenina plasmática significativamente elevados (Folmar *et al.*, 1996). Así mismo, numerosos autores han detectados similares efectos con otras especies ícticas expuestas a otras fuentes de emisión, como por ejemplo efluentes de plantas de celulosa y papel (Jobling *et al.*, 1993; EPA, 1997; Colborn y Thayer, 2000; Guillette, *et al.* 2000; Munkittrick *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 2000; Devlin *et al.*, 2002; Sole *et al.*, 2002; Lavado *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2003; Carballo *et al.*, 2004; Diniz *et al.*, 2005; Orrego *et al.*, 2005; García-Reyero *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2006). Dichos efectos pueden conducir a alteraciones en la estructura de las tramas tróficas, provocando cambios en los flujos de transferencia de materia y energía desde y hacia el ecosistema acuático. Pueden además provocar una reducción del stock o una pérdida en la calidad de especies comercialmente explotables, por la acumulación de xenobióticos en tejidos (bioacumulación y/o biomagnificación) (Pombo y Castro, 2005; Rivas, 2005).

En cuanto a los biomarcadores a nivel de órganos (índice gonadosomático - IGS y hepatosomático - IHS), éstos reflejan la dinámica de la utilización de la energía por parte de los organismos y cambios en ellos denotan una alteración del balance energético. En el caso del IGS, los cambios en éste índice se relacionan directamente con el sexo, edad y estadio reproductivo (Smith, 2004). Por tanto, una aceleración de la

maduración de las células gonadales por exposición a xenoestrógenos, se verá reflejada en un incremento del IGS y viceversa. Mientras que los cambios en el IHS, están vinculados a alteraciones en las principales funciones que cumple el hígado como la síntesis y degradación de hormonas y, la detoxificación de xenobióticos. En tal sentido, la exposición a xenobióticos puede provocar un incremento del tamaño del hígado (Eguren, 1997).

Si bien a través de los cambios en los índices somáticos es posible evidenciar la existencia de efectos, no es posible dilucidar el o los mecanismos por los cuales se generó dicho cambio. En tal sentido, mediante el análisis de cortes histológicos de gónadas es posible determinar si el aumento en el tamaño es debido, por ejemplo, a una aceleración en la maduración de las células reproductivas inducida por la exposición a xenoestrógenos.

Finalmente, el factor de condición refleja el grado de adaptabilidad del organismo al medio, en términos de un adecuado balance energético entre las necesidades fisiológicas y el incremento de la biomasa corporal. Por tanto, la exposición a estresores naturales o artificiales provocará cambios en el almacenamiento y transferencia de lípidos y proteínas tendientes a contrarrestar el efecto del estresor en desmedro del aumento del peso corporal (González *et al.*, 2002).

En relación a la especie seleccionada, *Cyprinus carpio* “carpa común” (Linnaeus, 1758), es un pez teleósteo perteneciente a la familia Cyprinidae. Especie originaria de Asia con una gran capacidad de adaptación a diferentes medios, ha sido ampliamente introducida a nivel mundial. En nuestro país, la introducción fue realizada con fines comerciales en la década del 60 proveniente de Brasil (DINARA, 2006). Presenta amplios rangos de tolerancias de temperatura (12 - 32°C) y acidez (pH 5 – 10), resiste bajos niveles de oxígeno disuelto (1-2 mg/l) y elevada turbidez. Posee hábitos alimenticios omnívoros, principalmente bentófagos (Smith, 2004).

Sobre sus características reproductivas, esta especie alcanza su madurez sexual entre los 18 meses y dos años de vida, dependiendo principalmente de la temperatura del agua. Según la clasificación de Balon (1975,1984) su estrategia reproductiva es la de “especie no cuidadora”. Es decir, desovan en sustrato abierto (principalmente asociado a plantas

acuáticas) y no realizan ningún cuidado parental de los huevos (DINARA, 2006; Smith, 2004; Vazzoler, 1996). Si bien esta especie no posee dimorfismo sexual aparente durante la mayor parte de su ciclo vital, en la época de reproducción las hembras presentan una distensión y alargamiento del abdomen a diferencia de los machos que presentan un cambio de coloración (oscurecimiento) y se pueden observar tubérculos en la cabeza y en las aletas pectorales (Smith, 2004). La diferenciación gonadal de esta especie se encuentra dentro de la categoría de gonocorista diferenciado, comenzando a los 50 días post-nacimiento (Gimeno *et al.*, 1998; Bongers *et al.*, 1999).

La OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) y la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) consideran a *Cyprinus carpio* como buena especie bioindicadora para la evaluación de los efectos de disrupción endocrina y ya ha sido usada en varios estudios (Folmar *et al.*, 1996; Gimeno *et al.*, 1998a; Gimeno *et al.*, 1998b; Schwaiger *et al.*, 2000; Sole *et al.*, 2002; Lavado *et al.*, 2003; Carballo *et al.*, 2004; Diniz *et al.*, 2005). Esto último permite la comparación de los resultados obtenidos con aquellos generados en otros estudios.

Finalmente, cabe resaltar que es cultivada en nuestro país por el Departamento de Acuicultura de la DINARA (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos), lo que facilita la obtención de individuos pertenecientes a la misma cohorte, libres de malformaciones o parásitos externos y con tallas homogéneas, requisitos necesarios para la realización de ensayos de laboratorio.

3. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes mencionados, la hipótesis bajo la cual fue desarrollado el estudio fue la siguiente:

H: Los sedimentos del río Uruguay provocan efectos en el sistema endocrino en peces expuestos a ellos, mayormente a nivel reproductivo, debido a la descarga de compuestos químicos producto de las actividades antrópicas desarrolladas en su cuenca.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la mezcla de compuestos químicos presentes en sedimentos del Río Uruguay genera cambios significativos en parámetros morfométricos y reproductivos en juveniles de *Cyprinus carpio*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar los efectos de la exposición crónica a sedimentos sobre los biomarcadores seleccionados (niveles de vitelogenina plasmática, cortes histológicos, índices somáticos y factor de condición) en juveniles de *C. carpio*.
- b) Establecer las posibles relaciones de causalidad entre actividades antrópicas, compuestos químicos descargados y efectos en peces.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sectores del río Uruguay evaluados

Los sedimentos para la realización del ensayo fueron extraídos del río Uruguay, en sectores representativos de las diversas actividades antrópicas desarrolladas en la cuenca (Figura 3):

- a) Paysandú: desembocadura del Arroyo Sacra. En este arroyo son vertidos los efluentes domiciliarios e industriales de la ciudad de Paysandú (S. 32°19' W 58°06')
- b) Nuevo Berlín: ubicado al Norte de la ciudad de Fray Bentos. Esta zona presenta un importante uso agrícola, especialmente monocultivos de soja y forestales. Por otra parte, según estudios hidráulicos, realizados en virtud de la instalación de una planta de celulosa en la ciudad de Fray Bentos, ésta zona no estaría influenciada por la pluma del efluente. Por tanto, podría ser considerado como punto de pre impacto en futuros monitoreos (S 32°59' W 58°04').
- c) Las Cañas: ubicado al Sur de la ciudad de Fray Bentos, es una importante área turística de la zona y principal balneario del departamento de Río Negro. Por otra parte, cabe resaltar que frente al balneario se encuentra uno de los canales más antiguos del río, Canal del Indio, donde fueron colectados los sedimentos (S 33°15' W 58°16').
- d) Juan Lacaze: ubicado en el Río de la Plata interior (Departamento de Colonia). Este sector fue considerado como control positivo, dado que recibe la descarga del efluente de una planta de celulosa (S 34°26' W 57°27').

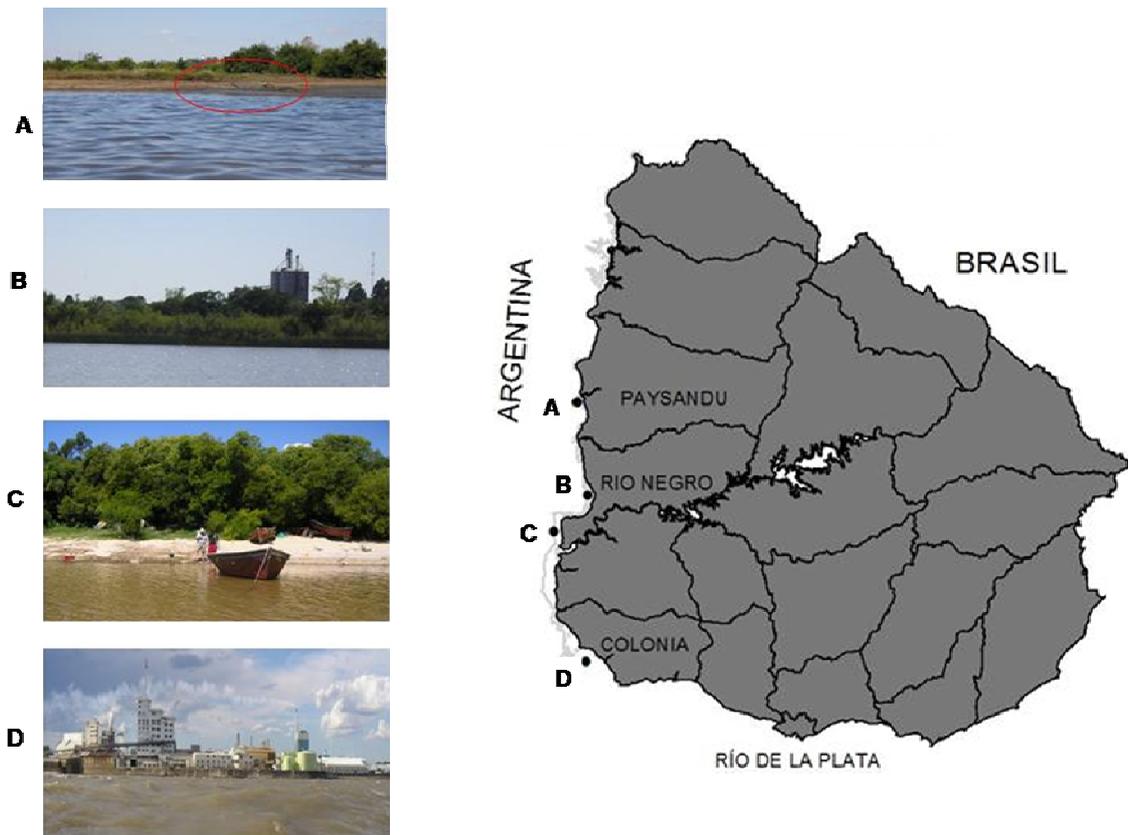


Figura 3: Sectores del río Uruguay evaluados en el ensayo.

Las muestras de sedimento fueron obtenidas mediante una draga Eckman, transportadas al laboratorio a 4°C. Posteriormente se determinó mediante calcinación la proporción de carbono orgánico de cada muestra. Cabe resaltar que de trabajos realizados anteriormente se conoce que en los sitios muestreados los sedimentos presentan textura arenosa (Botnia, 2004; Cotec, 2005; DINAMA, 2007). Finalmente fueron almacenados a -20°C hasta la realización del ensayo de toxicidad (Figura 4).



Figura 4: Extracción de sedimentos.

6.2. Diseño Experimental

Individuos inmaduros (3 meses) de *Cyprinus carpio* fueron obtenidos en la Estación Experimental de Villa Constitución (Depto. de Salto) de la DINARA. Los mismos fueron transportados en bolsas plásticas, a las cuales se les inyectó oxígeno y colocados en conservadoras con hielo.

Una vez recepcionados en el laboratorio se registró peso total (g), longitud total y estándar (cm) de la totalidad de los individuos. Posteriormente fueron aclimatados durante 15 días en acuarios con agua dechlorada, la que fue renovada cada dos días. La densidad de individuos en cada acuario fue de 1cm/l (pez/agua). Durante el período de aclimatación así como también durante el ensayo, fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial (Marplatense S.A) y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 +/- 1°C) y porcentaje de oxígeno disuelto (89 +/- 1%).

Cuarenta y ocho horas previo al inicio del ensayo, los sedimentos colectados fueron colocados en peceras de 30 litros en una relación 1:10 (sedimento/agua), a los efectos de permitir la decantación de los mismos. Cada uno de los tratamientos (sectores del río) fue analizado por triplicado (total 12 peceras) y además se incluyeron tres peceras con agua dechlorada y sin sedimentos (control negativo). En cada una de las peceras fueron colocados 4 individuos sorteados al azar, los cuales fueron pesados y medidos al inicio del ensayo. La ubicación espacial de los tratamientos y de los controles fue establecida al azar (Figura 5), mediante el uso de una tabla de números aleatorios. El tipo de ensayo realizado fue semi-estático, con recambio de agua cada siete días y un tiempo de exposición de 30 días.

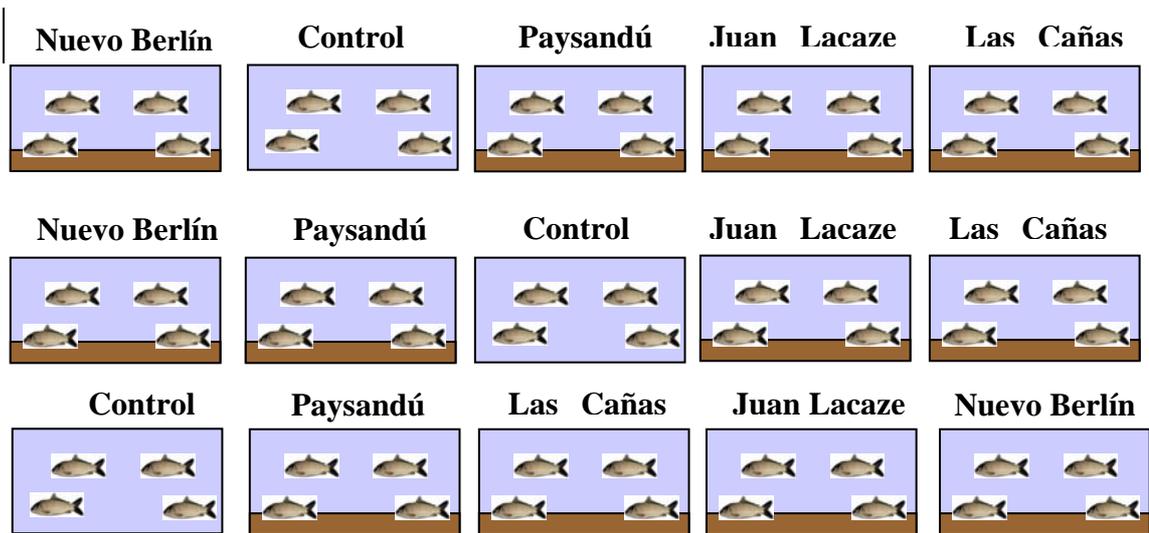


Figura 5: Diseño experimental

6.3. Factor de condición e Índices somáticos (IGS e IHS)

Los índices somáticos fueron calculados en función de los siguientes parámetros morfométricos: peso corporal (g), peso del hígado (g) y peso de la gónada (g). Para el factor de condición e índice gonadosomático fueron evaluados todos los individuos; mientras que para el índice hepatosomático se realizó un sorteo de entre 4 y 7 individuos por tratamiento.

Para el caso del factor de condición, en primera instancia se analizó la relación peso-largo (curva log-log) a partir de la cual se obtuvo la pendiente. Dicho valor fue la potencia (p) utilizada para el cálculo de dicho factor en la ecuación Ec.1.

$$K = (\text{peso}/\text{largo estándar}^p) \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Las fórmulas para el cálculo de los índices fueron:

$$\text{Índice Gonadosomático IGS} = (\text{peso de la gónada}/ \text{peso del organismo}) \times 100 \text{ (Ec. 2)}$$

$$\text{Índice Hepatosomático IHS} = (\text{peso del hígado}/ \text{peso del organismo}) \times 100 \text{ (Ec. 3)}$$

6.4. Cortes histológicos

Para la realización de cortes histológicos, fueron sorteados al azar 4 individuos de cada tratamiento y de los controles. Los mismos fueron sacrificados por dislocamiento cervical y se les extrajo la gónada. Esta fue pesada y preservada en formol al 10% en buffer fosfato pH 7.4 (fijación). Luego el tejido fue deshidratado, mediante el pasaje por alcohol 70°, 96°, 100° y cloroformo, e incluido en parafina. Los cortes fueron realizados utilizando un micrótopo Reichert-Jung a 5 µm. Finalmente fueron re-hidratados y teñidos con hematoxilina y eosina de Harris y analizados en un microscopio óptico Olympus Vanox con oculares 10x, 20x y 40x (Berois, 2004; Smith, 2004; Aimale *et al.*, 2006).

6.5. Determinación de vitelogenina plasmática

Una vez finalizado el tiempo de exposición se extrajo, mediante punción caudal, una muestra de sangre utilizando jeringas heparinizadas (solución de heparina de 20 unidades/ml). Con la sangre fue realizada una muestra compuesta por pecera (4 individuos), colocada en tubos eppendorf y preservada a 4°C hasta la extracción del plasma (NIWR, 2001; EMERGE, 2002; Biosense Laboratorios, 2004).

La separación del plasma se realizó por centrifugación (Universal 32R, Hettich zentrifugen) a 1500 rpm durante 10 minutos y fue preservado en tubo eppendorf a -20°C hasta la determinación de vitelogenina (NIWR, 2001; EMERGE, 2002; Biosense Laboratorios, 2004).

La determinación de niveles de vitelogenina se realizó mediante la técnica de inmunoensayo de unión enzimática ELISA (por sus siglas en inglés), utilizando kits específicos para vitelogenina de carpa (Biosense Laboratorios, prod N° V01003402).

Las muestras de los tratamientos (3 pool por tratamiento) fueron sembradas en 3 diluciones (1:50, 1:5000 y 1:500000), mientras que los controles fueron sembrados con una única dilución 1:20 (figura 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SR	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
B	SR	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
C	1.1	1.1	2	3.3	4.1	4.1	5.2	5.2	6.3	7	8.2	8.2
D	1.2	1.2	3.1	3.1	4.2	4.2	5.3	6.1	6.1	7	8.3	9.1
E	1.3	2	3.2	3.2	4.3	5.1	5.1	6.2	6.2	8.1	8.1	9.2
F	9.3	10.1	10.1	11.2	11.2	12.3	13.1	13.1	14	15.3		
G	9.1	10.2	10.2	11.3	12.1	12.1	13.2	13.2	15.1	15.1		
H	9.2	10.3	11.1	11.1	12.2	12.2	13.3	14	15.2	15.2		

Figura 6. Sembrado en placa ELISA.

SR: posillo sin reacción de unión específica (control negativo de reacción)

S1 - S11: estándares 1-11 (0.24 - 250 ng/ml Vtg)

.1 corresponden a réplicas de dilución 1:50

.2 corresponden a réplicas de dilución 1:5000

.3 corresponden a única siembra de dilución 1:500000

La lectura de la placa de ELISA fue realizada en un espectrofotómetro (Biorad 680 Microplate Reader) a 492 nm. Las concentraciones de vitelogenina fueron calculadas a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración y expresadas en $\mu\text{g/ml}$. (Biosense Laboratorios, 2005).

6.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados por diferentes métodos estadísticos, en función de las propiedades de los parámetros determinados o calculados (índices o porcentajes) (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis estadístico

Factor de condición	ANCOVA	Peso/largo
Tamaño gonadal		Gónada/peso
Tamaño del hígado		Hígado/peso
Vitelogenina	ANOVA	

En primer lugar se realizó el test de Grubbs para la determinación de valores extremos.

En dicho test se calcula el parámetro Z con la siguiente fórmula (GraphPad Software):

$$Z = \frac{|\text{mean} - \text{value}|}{SD}$$

Luego de obtenido el valor se compara con una tabla de valores críticos de Z realizada en función del número de muestras. Los valores que pueden ser descartados son aquellos en los que el valor de Z calculado sea mayor al tabulado lo cual indica un alejamiento del valor de la media de la serie de datos.

Para cada variable fue probada la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa STATISTICA 6.0 y en el caso de análisis no paramétricos se realizó el test de Kruskal-Wallis en dicho programa en combinación con el Bioestat 5.0 para la realización del test Post Hoc Student-Newman-Keuls. Los análisis Post Hoc de los test paramétricos fueron realizados utilizando Tuckey o HSD unequal n, según el número de datos de cada análisis.

7. RESULTADOS

En primer instancia cabe señalar que, durante el período de aclimatación y en el transcurso del ensayo no se registró mortalidad. Por otra parte, el peso y largo estándar de los individuos al inicio del ensayo fue de 9.0 ± 3.2 g y 7.2 ± 0.9 cm, mientras que al finalizar se observa una reducción en sus valores medios resultando en 7.5 ± 2.9 g y 6.8 ± 0.9 cm, respectivamente.

7.1. Factor de Condición e Índices somáticos (IGS e IHS)

A partir del peso total (g) y largo estándar (cm) inicial de los individuos empleados en el ensayo (n=60), se obtuvo el coeficiente alométrico para el cálculo del factor de condición (Figura 7).

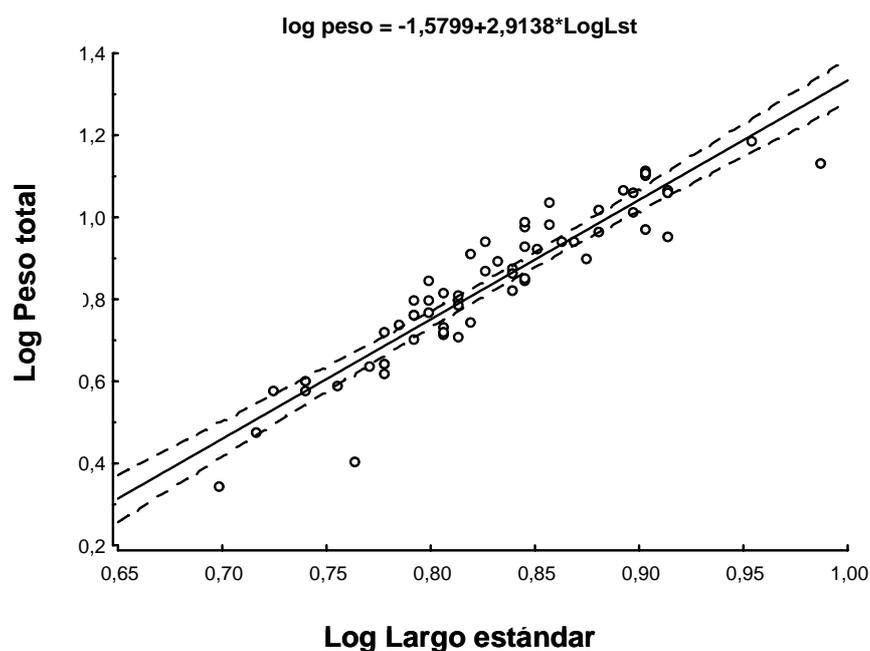


Figura 7: Relación Log Peso total vs. Log Largo estándar. $r^2 = 0.8654$

En la Figura 8 se presentan los resultados del factor de condición, en cada uno de los tratamientos y en el control.

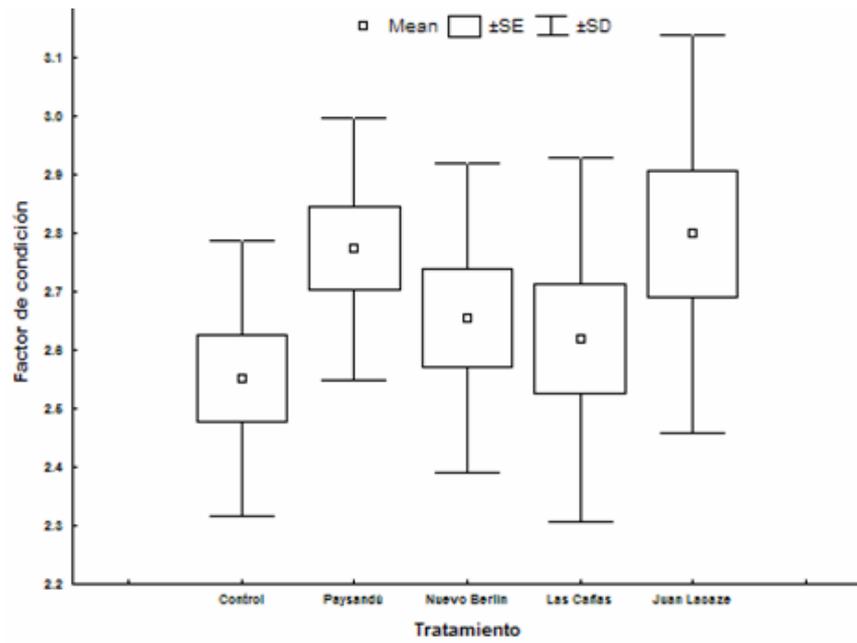


Figura 8: Comparación del factor de condición entre tratamientos y grupo control. n = 12 (n° de individuos) en todos los tratamientos incluido el control

El análisis del efecto de los tratamientos sobre el peso total (considerando el largo estándar como co-variable -ANCOVA), no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el grupo control; así como entre los tratamientos (Figura 9).

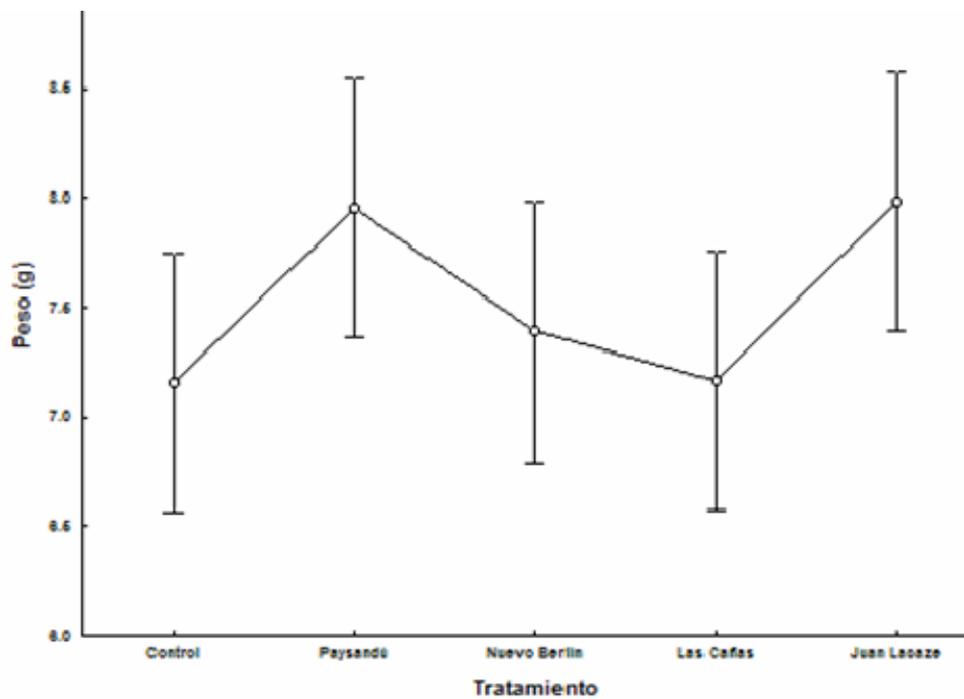


Figura 9: Variación del peso en función de los tratamientos (ANCOVA Covariable: largo estándar). Barras verticales: intervalo de confianza de 95%.

En cuanto a los índices somáticos, dado que el peso corporal no presentó diferencias significativas, el efecto del sitio se evaluó mediante un análisis de varianza del peso de la gónada ($p=0.521$, ANOVA) o del hígado ($p=0.805$, ANOVA), según el índice.

Como se observa en la figura 10, los valores máximos para el índice gonadosomático fueron obtenidos en Nuevo Berlín (media 1.11 y desvío estándar 0.97) y Las Cañas (media 0.862 y desvío estándar 0.580).

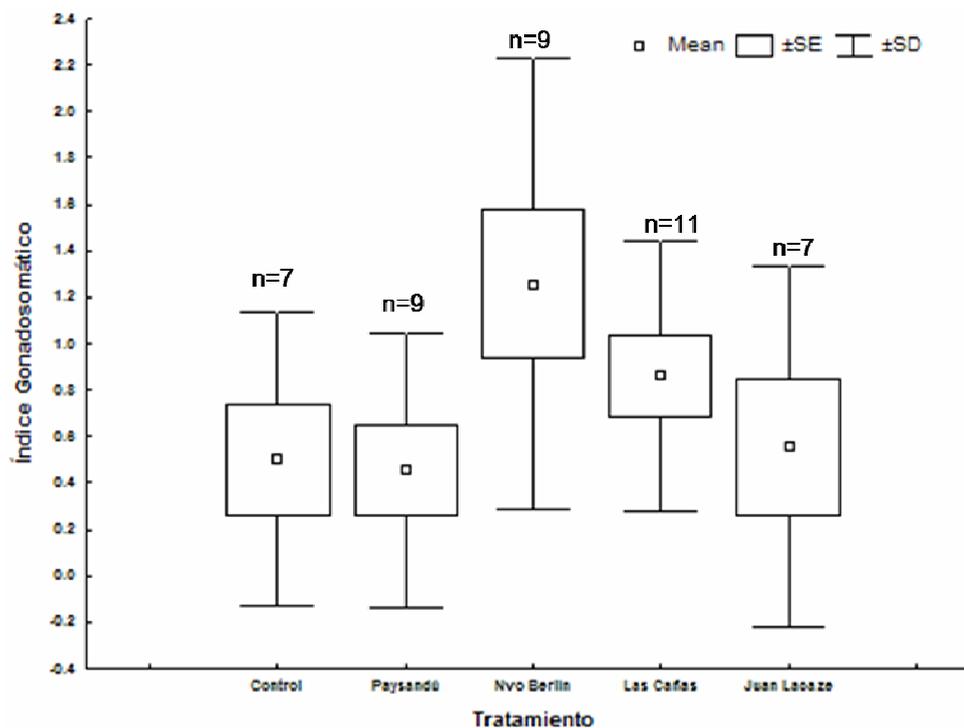
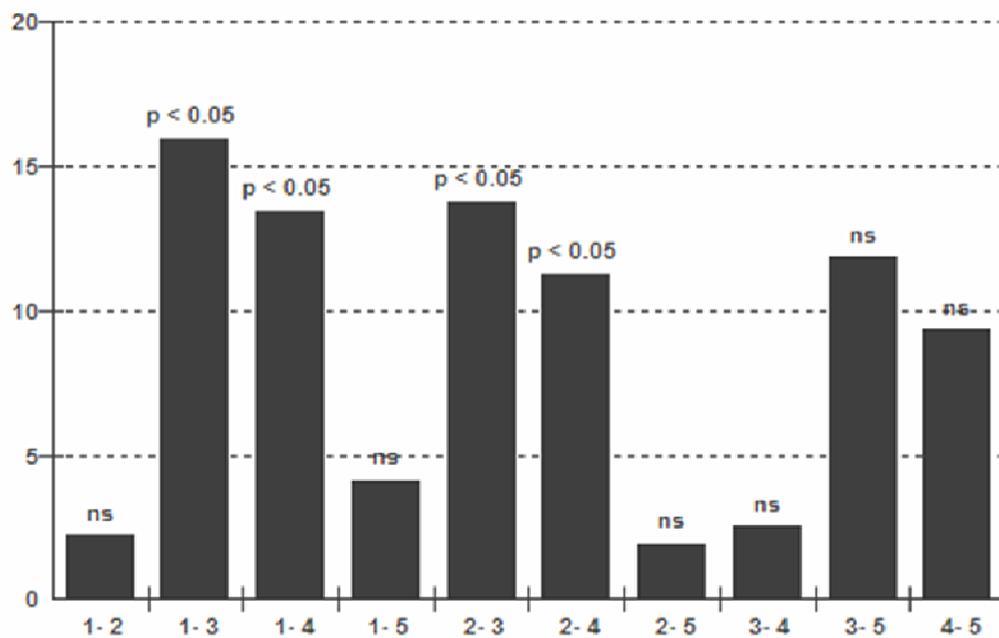


Figura 10: Comparación del índice gonadosomático entre los tratamientos y control.

Además, los resultados del análisis de la variación del peso de la gónada (test Post Hoc Student-Newman-Keuls) mostraron que ambos tratamientos presentan diferencias significativas con el control ($p=0.01$ y 0.02 respectivamente); así como también con Paysandú ($p=0.02$ y 0.04 respectivamente) (Figura 11).

Kruskal-Wallis - Diferencias entre las medias



1- Control, 2- Paysandú, 3- Nuevo Berlín, 4- Las Cañas, 5- Juan Lacaze

Figura 11: Diferencias significativas del peso de la gónada entre los tratamientos (Análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis $p=0.02$). ns= no significativo

En relación al índice hepatosomático, como se observa en la figura 12, los valores máximos del índice fueron registrados en Juan Lacaze (media 2.49 y desvío estándar 0.43).

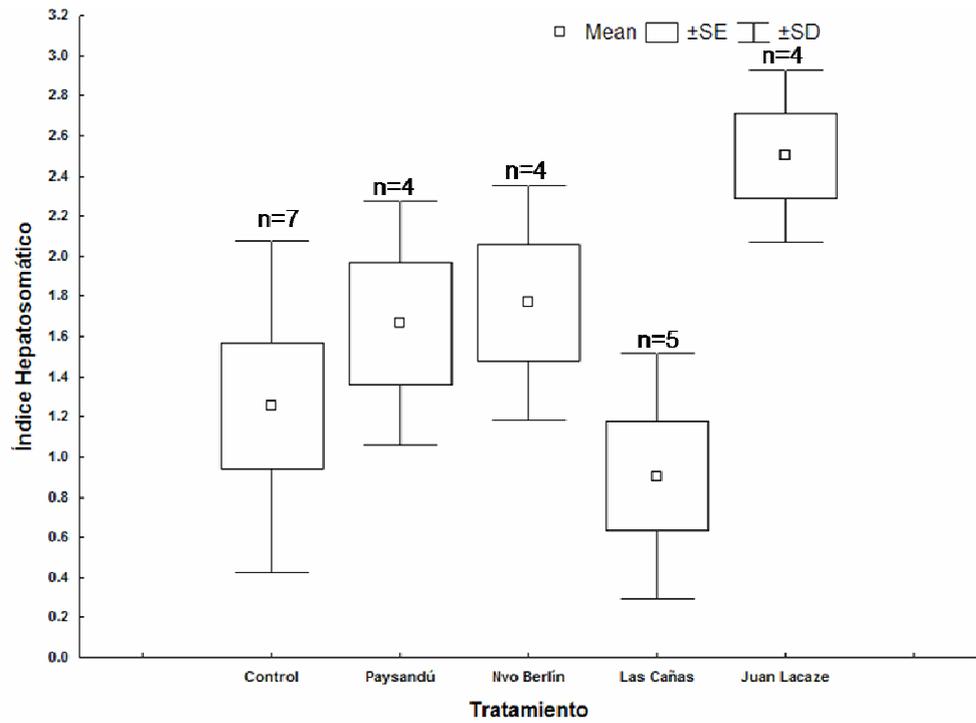


Figura 12: Comparación del índice hepatosomático entre los tratamientos y control

Este tratamiento presentó diferencias significativas con el sitio control y con Las Cañas (test Post Hoc HSD n desigual, $p=0,04$ y 0.02 respectivamente) (Figura 13).

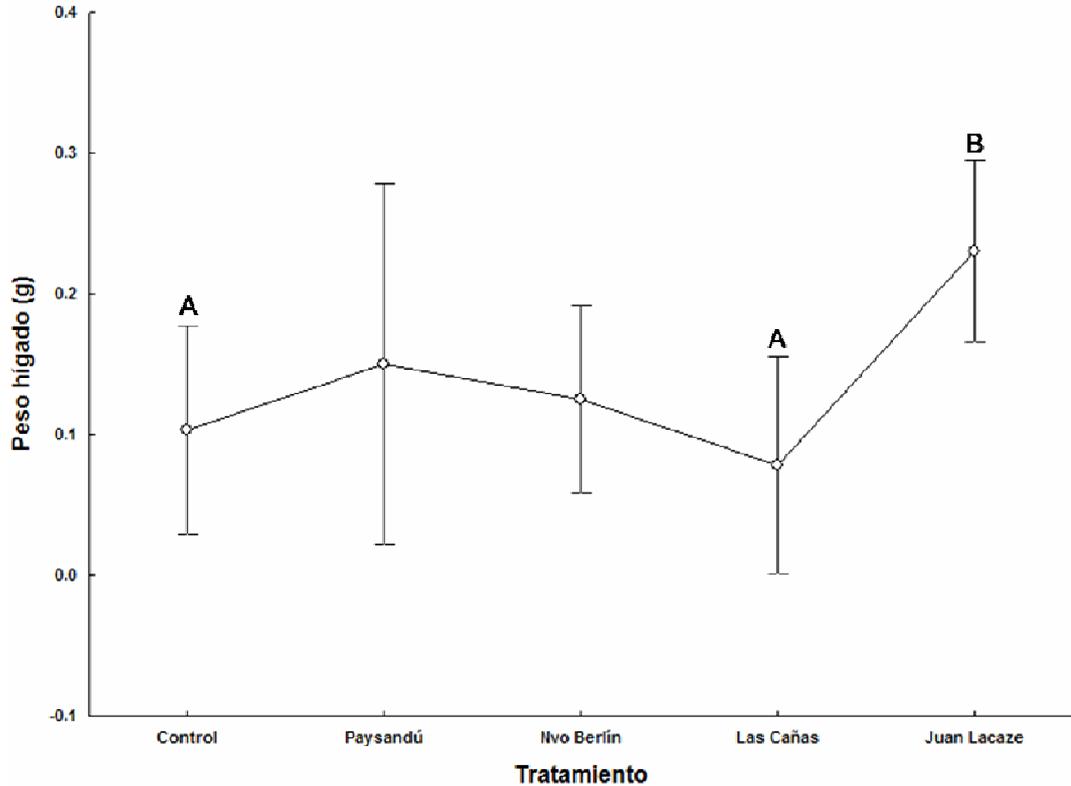


Figura 13: Variación del peso del hígado en función de los tratamientos (ANOVA). Barras verticales: intervalo de confianza de 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas

7.2. Cortes histológicos

En relación a la determinación del sexo, en la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos. Cabe recordar que esta especie es gonocorista diferenciada (50 días post eclosión) y que al comienzo del ensayo los individuos tenían 3 meses, por lo que los individuos ya estaban diferenciados.

Tabla 3. Distribución porcentual de sexos por tratamiento

Tratamiento	Machos	Hembras
Control	33%	67%
Paysandú	67%	33%
Nuevo Berlín	25%	75%
Las Cañas	25%	75%
Juan Lacaze	100%	-

En la figura 14 se observan cortes histológicos de tejido gonadal de machos y hembras de cada tratamiento. Mientras que en la siguiente (Figura 15) se observa la presencia de oocitos en tejido testicular (testis-ova) en los sitios de Paysandú y Juan Lacaze, lo que es ampliamente remarcable.

Como se observan en la figura 14, el grado de desarrollo en todos los tratamientos lo oocitos, según la clasificación realizada por Smith, 2004, se encuentran en la misma etapa, pre vitelogénica en el estadio peri-nucleolar. No fueron observadas diferencias significativas en relación al tamaño de los oocitos (rango grupo control: 59-114 μm ; rango Paysandú: 79-113 μm ; rango Nuevo Berlín: 66-109 μm ; rango Las Cañas: 74-116 μm); ni en la cantidad de los mismos dentro del campo visualizado. En cuanto al desarrollo testicular, este en general no tiene una diferenciación clara y es posible solamente observar un retardo en la madurez, con respecto al control, en la mayoría de los tratamientos. Este retardo se observa por una disminución en el número de acúmulos de espermatoцитos primarios (EI), dentro de la extensión del corte realizado.

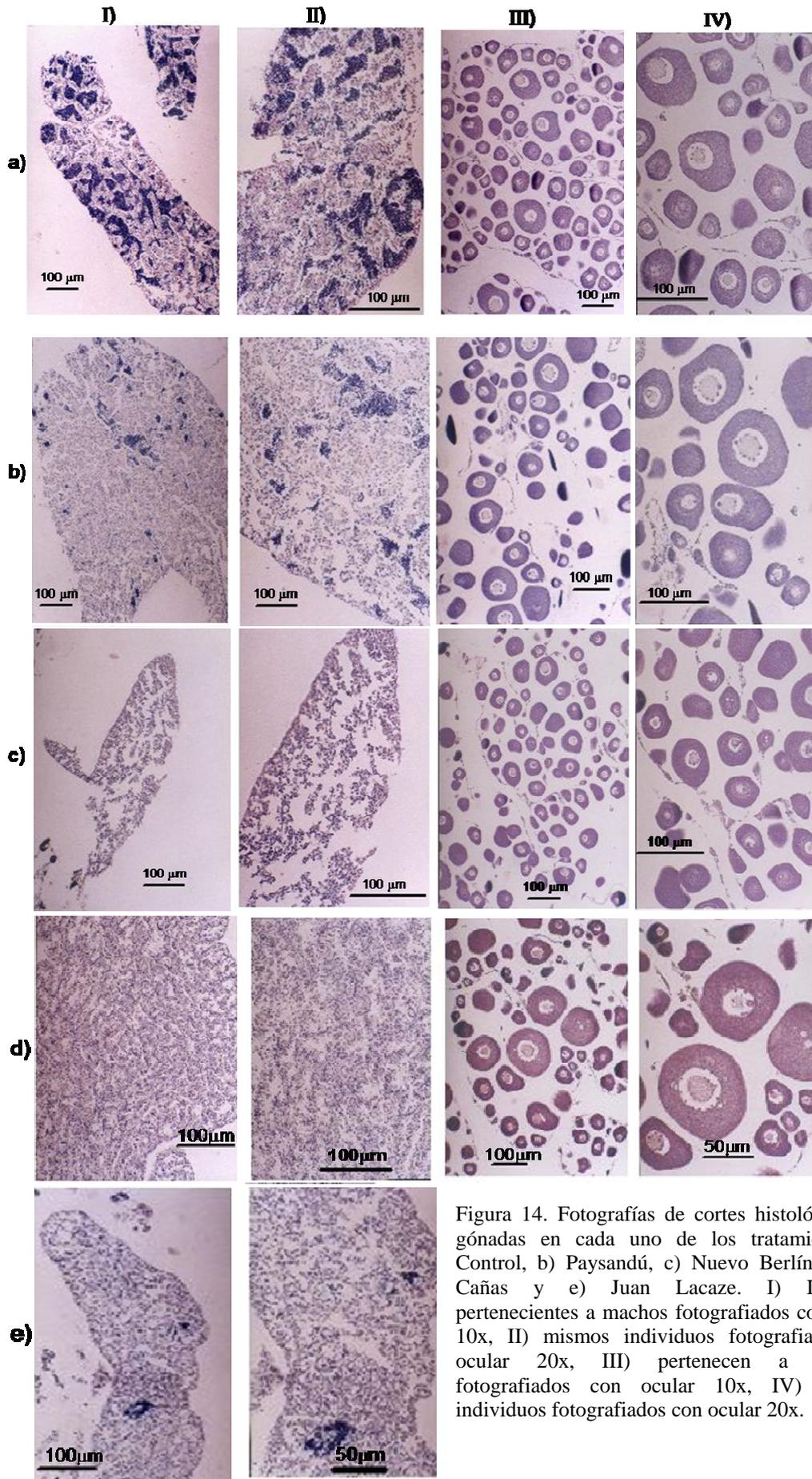


Figura 14. Fotografías de cortes histológicos de gónadas en cada uno de los tratamientos a) Control, b) Paysandú, c) Nuevo Berlín, d) Las Cañas y e) Juan Lacaze. I) Imágenes pertenecientes a machos fotografiados con ocular 10x, II) mismos individuos fotografiados con ocular 20x, III) pertenecen a hembras fotografiados con ocular 10x, IV) mismos individuos fotografiados con ocular 20x.

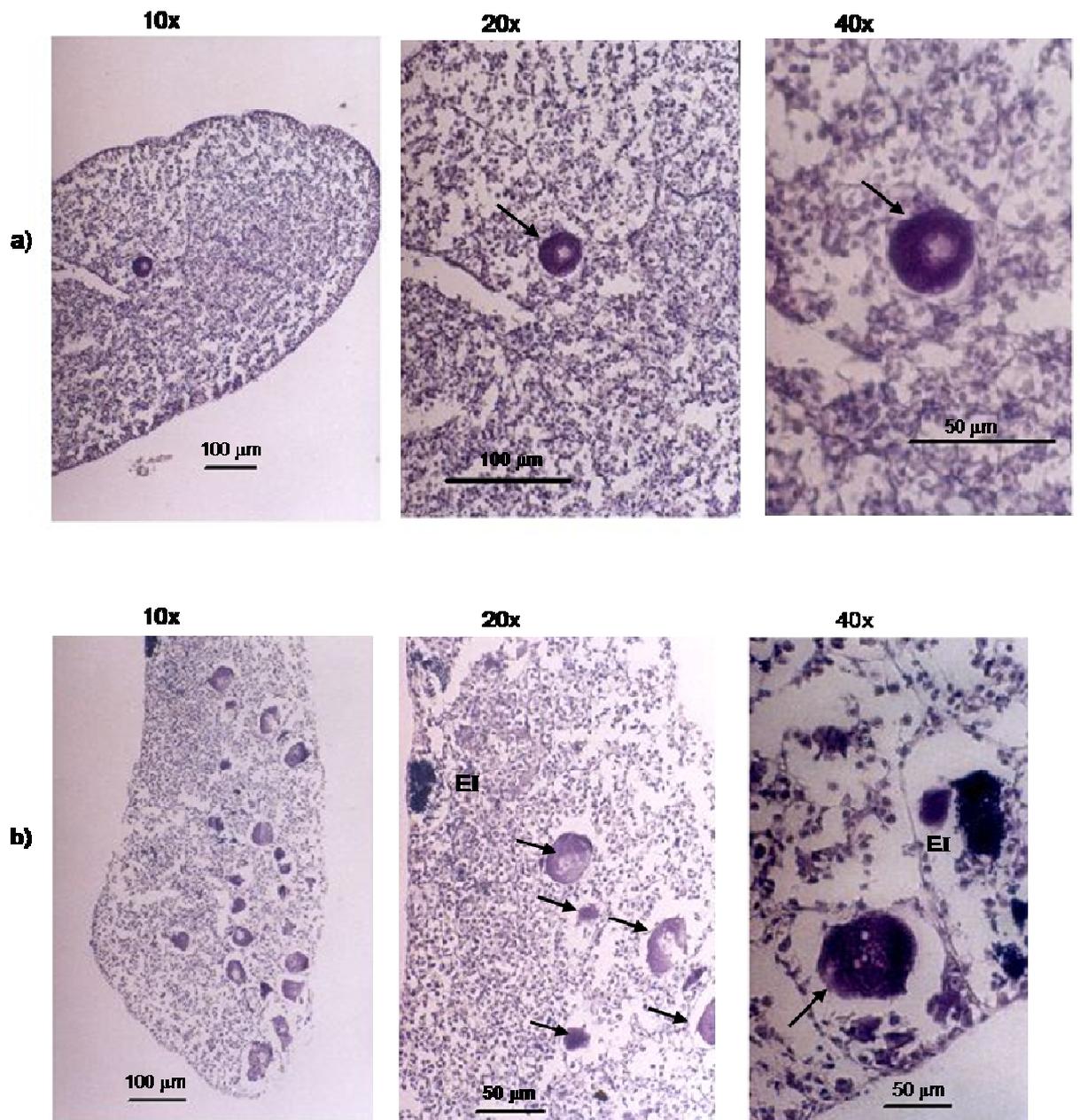


Figura 15. Fotografías de cortes histológicos de individuos con intersexo a) Paysandú y b) Juan Lacaze. EI= núcleos de espermatoцитos I. Las flechas, en las fotografías de oculares 20x y 40x, muestran la ubicación de los oocitos dentro del tejido testicular.

7.3. Niveles de vitelogenina plasmática

En la figura 16 se presenta la curva estándar de vitelogenina, a partir de la cual se obtuvo la ecuación para el cálculo de las concentraciones de dicha proteína para cada tratamiento.

Log Abs vs Log Concentración

$$y = 0,7989x - 1,3539$$
$$R^2 = 0,9872$$

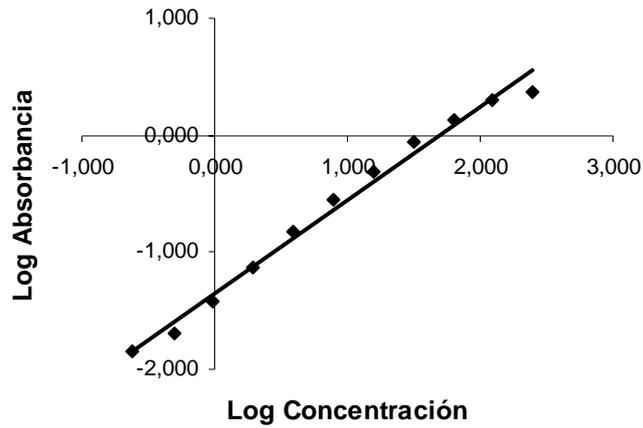


Figura 16. Curva estándar de vitelogenina de *Cyprinus carpio*. Concentraciones 0,24 a 250 ng/ml

Como se observa en la figura 17, los niveles de vitelogenina plasmática muestran un incremento a lo largo del gradiente latitudinal (Paysandú a Juan Lacaze), acompañado de una reducción en la dispersión de los valores.

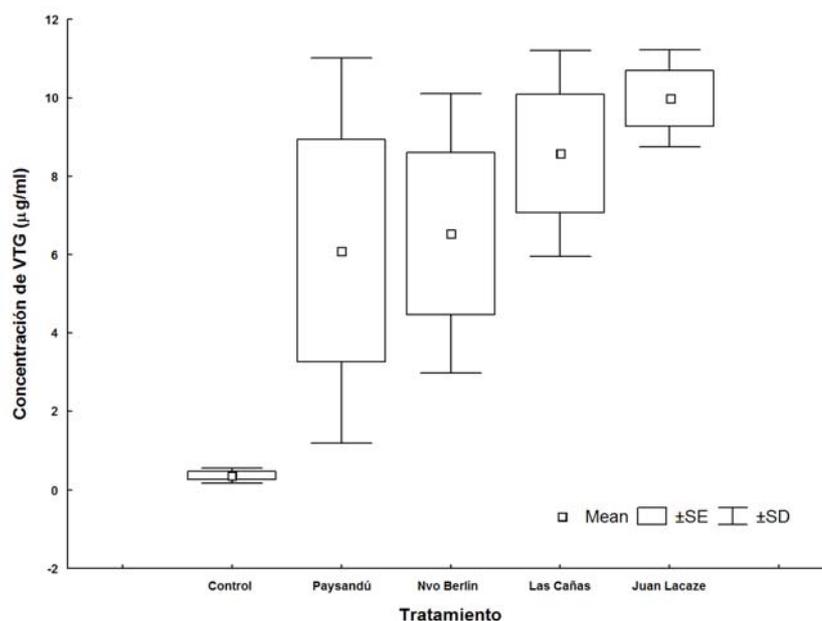


Figura 17: Comparación de los niveles de vitelogenina plasmática entre los tratamientos y control (n=3 para cada tratamiento).

Si bien se observa una clara tendencia al aumento del valor medio de la concentración de vitelogenina (media control= 0.360 y media Juan Lacaze= 9.989), sólo muestran diferencias significativas los tratamientos de Juan Lacaze y Las Cañas con el Control (test Post Hoc Tuckey HSD, $p= 0.02$ y 0.04 respectivamente) (Figura 18). Esto podría estar asociado a la amplitud del rango de valores registrados, así como al bajo número de réplicas por tratamiento.

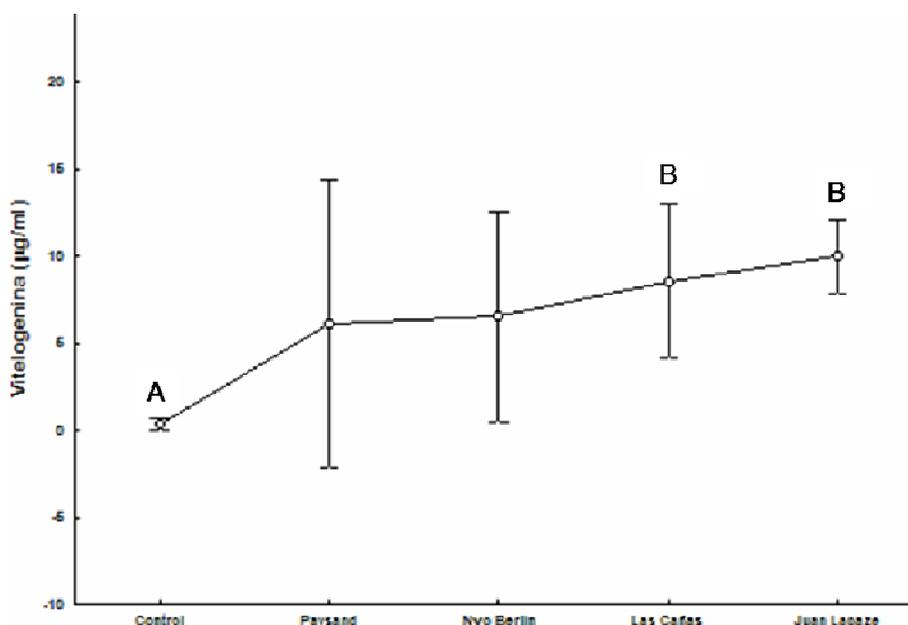


Figura 18: Variación de los niveles de vitelogenina plasmática entre tratamientos (ANOVA). Barras verticales: intervalo de confianza de 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas

8. DISCUSIÓN

Durante todo el período del ensayo no se produjeron muertes de individuos en ninguno de los tratamientos evaluados, lo cual valida el ensayo en referencia al registro de mortalidad.

Antes de pasar a la discusión de los resultados obtenidos es importante destacar cuales son las características de los sedimentos empleados. De todos los sitios muestreados, los sedimentos tienen textura arenosa con contenidos variables de materia orgánica (Paysandú: 1.2-2.3%; Nuevo Berlín: 3.1-3.6%; Las Cañas: 1.4-2.4%; Juan Lacaze: 0.9-1.7%) y de otros compuestos analizados en trabajos anteriores (incluidos compuestos como PCBs, PAHs, etc.) (Botnia, 2004; Cotec, 2005; DINAMA, 2007). En relación a la materia orgánica hay que destacar que no solo hay diferencias en cantidad sino en la diferencia de fuentes de la cual proviene ya que los aportes que recibe en cada caso son muy diferentes entre sí.

El factor de condición mostró valores superiores en la totalidad de los tratamientos respecto al grupo control, sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Orrego et al., 2005 quien realizara una exposición en condiciones controladas de laboratorio de hembras de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) a sedimentos provenientes de áreas de descarga de plantas de celulosa.

El incremento corporal observado en los tratamientos podría deberse a un aporte de nutrientes desde los sedimentos hacia la columna de agua (Figura 9). En tal sentido, estudios realizados por Sandström (1996), indican que peces colectados aguas abajo del vertido de efluentes domiciliarios o industriales poseen una mayor disponibilidad de nutrientes que aquellos procedentes de áreas control, lo que se refleja en un mayor crecimiento corporal general. Esto concuerda con los resultados obtenidos en Juan Lacaze y Paysandú (máximos valores del factor de condición), dado que dichos sectores del río Uruguay reciben la descarga de efluentes domésticos y/o industriales, con escaso o nulo tratamiento. En relación a esto, la CARU en su informe de 1993 ya expresa que en el caso de los nutrientes, existe un marcado aumento de fosfatos en el entorno de la ciudad de Paysandú con respecto a los restantes sitios muestreados en la campaña 1989-1990. En lo que refiere a Juan Lacaze, sumado al aporte del efluente de la planta de

celulosa de su costa, esta misma comisión en su jornada sobre recursos acuáticos realizada en el año 1999 plantea la gran acumulación de sedimentos en el tramo final del río Uruguay y al comienzo del Río de la Plata con alto contenido en materia orgánica.

A diferencia del factor de condición, el IGS no solo mostró los valores menores en los grupos control, sino también en el tratamiento Paysandú. Además, se observó un claro efecto de los tratamientos sobre el peso gonadal, registrándose un aumento significativo en los tratamientos Nuevo Berlín y Las Cañas (Figura 11). Los resultados de este índice en anteriores trabajos muestran en general una disminución del mismo frente a la exposición a compuestos xenoestrogénicos de diferentes fuentes de emisión (Bachmann, 2002; Hassanin *et al*, 2002). Sin embargo en el trabajo realizado por Orrego *et al* (2005) donde evalúa este índice en individuos expuestos a sedimentos provenientes de áreas de descarga de efluentes de plantas de celulosa, se observa un aumento del mismo. En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas del IGS en el tratamiento de Juan Lacaze (tratamiento de exposición a efluentes de este tipo de industria), presumiblemente por un mayor destino energético al aumento en masa corporal. Los valores significativamente mayores en las gónadas de los individuos en los tratamientos Nuevo Berlín y Las Cañas pueden deberse a compuestos provenientes de la producción intensiva de soja desarrollada en la zona. Burow *et al*. (2004) mostraron que las isoflavonas (fitoestrógenos), compuestos producidos en este tipo de cultivos como mecanismo de defensa contra la herbivoría y potenciales patógenos o liberados al suelo para facilitar la simbiosis con bacterias *Rhizobium sp.* (quimitaxis), tienen la capacidad de unirse a receptores estrogénicos y generar efectos a nivel reproductivo, y si bien en otros estudios esto repercute negativamente en el índice, en el presente trabajo el efecto es inverso. No hay datos de éstos compuestos en sedimentos, pero si se conoce la presencia de otros compuestos conocidos como disruptores endocrinos (PCBs, PAHs, fenoles, etc.) en sedimentos analizados en la ciudad de Fray Bentos (DINAMA, 2006).

El IHS, a diferencia del factor de condición y del IGS, registró los valores menores en Las Cañas (Figura 13). Por otra parte, se observó un efecto de los tratamientos sobre el peso del hígado, registrándose un aumento significativo en el tratamiento de Juan Lacaze. Este incremento, de acuerdo con anteriores estudios, podría asociarse a la descarga de un efluente de una planta de celulosa ubicada cercana al sitio de muestreo. Dicha planta, al momento de la toma de muestras, utilizaba cloro elemental como agente de blanqueo, lo que genera efluentes con alta carga de compuestos capaces de

producir este tipo de efectos por inducción de sistemas enzimáticos vinculados a la detoxificación (Boer y Brinkman, 1994; De Matteis, 1994; Karels *et al.*, 2000; Karels *et al.*, 2001). Según informes remitidos por la propia empresa el efluente libera diariamente en promedio: 8.3pg/l de dioxinas totales, 191.4 pg/l de furanos totales, 21.2 mg/l de AOX, entre otros compuestos con diferentes grados de toxicidad (Cotec, 2005), que dadas su características de solubilidad se adsorben a los sedimentos y por tanto en el ensayo realizado los individuos expuestos a estos sedimentos estuvieron expuestos a tales compuestos.

Numerosos estudios han señalado que la exposición a este tipo de efluentes provoca la inducción del sistema de mono-oxigenasas de función mixta (MFO), las cuales cumplen funciones de detoxificación y que la mayor actividad de estas enzimas ocurre a nivel hepático (Munkittrick *et al.*, 1992; Boer y Brinkman, 1994; De Matteis, 1994; Fossi *et al.*, 1995; Munkittrick *et al.*, 2000). Esta inducción ha sido observada en organismos expuestos a diversos tipos de efluentes de plantas de celulosa ya sea que utilicen o no cloro elemental (Martel *et al.*, 1996, Williams *et al.*, 1996, Coakley *et al.*, 2001). Esta mayor actividad de detoxificación puede conducir a un incremento de componentes de la maquinaria de síntesis proteica (por ejemplo retículo endoplasmático) (Karels *et al.*, 2000) y a una disminución de las reservas energéticas del tejido hepático (acúmulos de lípidos), generando cambios en el tamaño del hígado (Eguren, 1997). Estos procesos actúan en direcciones opuestas, es decir la proliferación del retículo endoplasmático conduce a un aumento del tamaño de los hepatocitos; mientras que el consumo de los acúmulos de lípidos reduce el tamaño citoplasmático de las células hepáticas. Esto último podría estar explicando, la disminución del hígado en Las Cañas respecto al control y los restantes tratamientos. Sin embargo, el trabajo realizado por Orrego *et al.* (2005) mostró un leve descenso del índice, aunque sin con relevancia estadística, explicando este resultado y el de los restantes biomarcadores utilizados en el mismo, por un marcado efecto de efluentes de plantas de celulosa a nivel, únicamente, del sistema reproductivo.

En relación a los cortes histológicos de gónada, el resultado más relevante es la presencia de testis-ova (oocitos en tejido testicular) en un ejemplar, de los 4 analizados, de los tratamientos de Paysandú y Juan Lacaze. Esta presencia concuerda con trabajos anteriores donde se constató la aparición de estos efectos en individuos de *Cyprinus carpio* expuestos a compuestos estrogénicos provenientes tanto de vertidos

domiciliarios (Paysandú) como de efluentes de industrias (Juan Lacaze) (Gimeno, *et al.*, 1998a; Kiparissi *et al.*, 2003). En el caso de Paysandú se observa, en la dimensión del corte realizado, la presencia de un oocito funcional (peri-nucleolar) dentro del tejido testicular. Mientras que en el caso de Juan Lacaze el número testis-ova es mayor (Figura 15). Debe recordarse que esta especie es gonocorista diferenciada (50 días post eclosión) y que el ensayo se realizó con individuos de 3 meses con lo cual ya se encontraban completamente diferenciados al momento del inicio del mismo.

Otro aspecto a señalar, en función de los cortes histológicos, es que la relación de sexos en los tratamientos y grupos control varió sustancialmente (Tabla 3). Esto podría explicar las diferencias encontradas en el IGS, ya que los tratamientos que mostraron un tamaño gonadal significativamente mayor (Nuevo Berlín y Las Cañas) presentaron un alto porcentaje de hembras (75%) y tal como lo expresa Sandström, 1996 los efectos en los índices para el caso de machos resultan significativamente menores que en hembras.

A diferencias de otros trabajos realizados en similares condiciones, no se observaron diferencias en el estadio del desarrollo de los oocitos (Bachmann *et al.*, 2002; Kiparissi *et al.*, 2003; Örn, 2006). Observándose todos en la misma etapa de desarrollo correspondiente a la pre vitelogénica en el estadio peri-nucleolar, no encontrándose diferencias en relación al tamaño de oocitos dentro del campo visualizado. Por lo cual podría tratarse solamente de un crecimiento trofoplásmico pero no protoplásmico, esto podría comprobarse aumentando el tiempo de exposición para observar si existen cambios en los estadios en los individuos con mayor número de células.

Los resultados obtenidos en los niveles de vitelogenina plasmática indican un marcado efecto de los tratamientos, observándose un incremento de las concentraciones a lo largo del gradiente longitudinal (Paysandú a Juan Lacaze). Sin embargo sólo se observaron diferencias significativas en los tratamientos de Las Cañas y Juan Lacaze. En el primero de ellos, el aumento puede deberse al aporte de fitoestrógenos desde áreas agrícolas circundantes. Mientras que en el caso de Juan Lacaze, donde se encuentran los valores medios mayores, puede asociarse a la descarga de la planta de celulosa. En tal sentido, varios trabajos a nivel mundial han documentado el incremento de vitelogenina plasmática en individuos juveniles expuestos a efluentes de plantas de celulosa, (Karels *et al.*, 2000; Karels *et al.*, 2001; Orrego *et al.*, 2005).

Al analizar conjuntamente los biomarcadores evaluados en cada tratamiento, se observa que los sedimentos procedentes de Paysandú aumenta la disponibilidad de nutrientes favoreciendo el incremento de la biomasa corporal general y que los mismos contienen compuestos capaces de generar cambios a nivel reproductivo, los que se reflejaron a nivel celular con la aparición de testi-ova. Sin embargo, no han generado efectos a nivel de órganos blanco (IGS) ni tampoco a nivel bioquímico-molecular (concentración de vitelogenina plasmática). La no modificación en el tamaño gonadal, combinado con el incremento en el uso y almacenaje de energía, así como la presencia de testis-ova, y puede ser interpretado como una disrupción metabólica o una disrupción endócrina (Van der Kraak et al., 1992).

En el caso de Nuevo Berlín, fue el tratamiento que mostró menores efectos en los biomarcadores evaluados, registrándose diferencias significativas respecto al control solamente en el peso gonadal (a nivel de órgano).

Los sedimentos de Las Cañas, generaron cambios significativos a nivel de órganos blanco (aumento del IGS y disminución del IHS) así como también a nivel bioquímico-molecular (aumento de vitelogenina plasmática). Esto estaría indicando que los sedimentos de Las Cañas presentan compuestos capaces de generar disrupción endocrina en diferentes niveles de organización jerárquica.

Finalmente, los sedimentos de Juan Lacaze fueron los que generaron mayores cambios en los biomarcadores estudiados, confirmándose de esta forma su inclusión en el bioensayo como un control positivo. Cabe destacar que, si bien los resultados denotan una exposición a compuestos que generan disrupción endocrina (presencia de testis-ova, aumento del IHS y de los niveles de vitelogenina plasmática), no se detectaron efectos a nivel de órgano (gónadas). En tal sentido, dada la variedad de factores y mecanismos que interactúan en la regulación de procesos a diferentes niveles de organización jerárquica, los efectos a nivel de molecular no siempre se corresponden con las respuestas observadas niveles superiores y viceversa (Mc Master *et al.*, 1991; Munkittrick *et al.*, 1992).

9. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos para los diferentes biomarcadores analizados se comprueba la hipótesis planteada. Las actividades desarrolladas en el área de estudio (actividades agrícolas, industriales y urbanización) liberan compuestos que, adsorbidos a los sedimentos, generan efectos de disrupción endócrina a nivel del sistema reproductivo en los peces expuestos en condiciones de laboratorio.

Se observaron efectos en todos los sitios evaluados en diferentes magnitudes y a diferentes escalas dentro de los niveles organizacionales en comparación con los grupos control, y son resumidos en el siguiente cuadro:

Tratamiento Biomarcador	Paysandú (Industrial-Urbano)	Nuevo Berlín (Agrícola)	Las Cañas (Agrícola)	Juan Lacaze (Industrial)
Niveles Vtg plasmática	17 veces mayor estadísticamente no significativo	18 veces mayor estadísticamente no significativo	23 veces mayor estadísticamente significativo	28 veces mayor estadísticamente significativo
K	19% estadísticamente no significativo	12% estadísticamente no significativo	+0.5% estadísticamente no significativo	+9.5% estadísticamente no significativo
IGS	-9% estadísticamente no significativo	+151% estadísticamente significativo	+72% estadísticamente significativo	+11% estadísticamente no significativo
IHS	+33% estadísticamente no significativo	+41% estadísticamente no significativo	-28% estadísticamente no significativo	+100% estadísticamente significativo
Histología (gónadas)	Testis-ova (1/3 peces)	No testis-ova (4 peces)	No testis-ova (4 peces)	Testis-ova (1/4 peces)

Los efectos sobre IGS, IHS y K, siguen un patrón claro en relación a la actividad realizada en la zona de estudio: zonas industriales presentan elevados K aunque estadísticamente no significativos y un IHS en aumento; mientras que los sitios agrícolas presentan elevados IGS.

Las actividades industriales provocan la aparición de testis-ova (Paysandú y Juan Lacaze).

Las actividades agrícolas e industriales tienen un efecto estrogénico significativo respecto a los grupos control (aumento de vitelogenina en Las Cañas y Juan Lacaze).

Los efectos en la componente bioquímico-molecular, niveles de vitelogenina plasmática, fueron superiores en todos los tratamientos respecto al control pero no mostraron un patrón con relación a las actividades antrópicas.

El bioensayo desarrollado es adecuado para evaluar efectos de disrupción endócrina por exposición a sedimentos, validándose su aplicación como herramientas de monitoreo.

10. PERSPECTIVAS

Dado que la especie empleada en el ensayo, *Cyprinus carpio*: presenta una amplia distribución, es utilizada a nivel mundial para evaluar disrupción endocrina y otros efectos tóxicos, cuenta con información relativa a los requerimientos para su mantenimiento en condiciones de laboratorio y que nuestro país cuenta con un centro de cultivo (facilitando la obtención de las cantidades requeridas para ensayos de toxicidad); hacen viable la incorporación de este tipo de ensayos como herramienta de control.

Por otra parte, al tratarse de una especie introducida sumado a los problemas asociados a la extrapolación de resultados de laboratorio a condiciones naturales, es relevante desarrollar estudios similares con especies nativas. Esto permitiría dimensionar los impactos sobre los ecosistemas receptores de compuestos capaces de generar disrupción endocrina. En particular, si la respuesta a ser evaluada es los cambios en los niveles de vitelogenina es necesario generar estándares específicos.

En el caso de ensayos con ejemplares juveniles de *C. carpio*, considerando los elevados niveles de vitelogenina encontrados, no es necesario realizar pool del plasma. Esto permite un mayor número de réplicas por tratamiento y por tanto una mayor relevancia estadística.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aimale, M.A. y Gatti, J. 2006. Introducción a las técnicas histológicas. Cátedra de Anatomía-Histología. Universidad Nacional del Sur. Argentina. 14 p. URL: <http://anatomohistologia.uns.edu.ar>

Argemi, F.; Cianni, N. y Porta, A. 2005. Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. Acta Bioquím. Clin. Lationam. 39(3): 291 – 300.

Bachmann Christiansen, L. 2002. Feminisation of fish. The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Environmental Project No. 729. Danish Environmental Protection Agency

Barra, R.; Colombo, J.C.; Eguren, G.; Gamboa, N.; Jardim, W.F. y Mendoza, G. 2005. Persistent organic pollutants (POPs) in Eastern and Western South American Countries. Rev. Environmental Contaminants Toxicology 185: 1-33.

Berois, N.; Bolatto, C.; Brauer, M.M.; Barros, C. 2004. Gametogenesis, histological gonadal cycle and *in vivo* fertilization in the whitemouth croaker (*Micropogonias furneri*, Desmarest, 1823). Journal of Applied Ichthyology 20:169-175.

Biosense Laboratories AS. 2004. Preparation of plasma samples from fish – using syringes for blood sampling. URL: <http://www.biosense.com> (mayo/06).

Biosense Laboratories. 2005. Carp vitellogenin ELISA kit. Product manual. Prod. N° V01003402
URL: <http://www.biosense.com> (mayo/06).

Boer, J. y Brinkman, U. 1994. The use of fish as biomonitors for the determination of contamination of the aquatic environment by persistent organochlorine compounds. Analytical Chemistry, Vol. 13, N° 9, pp. 397-404.

Botnia S.A. 2004. Informe Ambiental Resumen. Exp 2004/14001/1/01177. 109pp

Burow, M.E.; Fox, J.E.; Jones, P.E.; McLachlan, J.A. y Starcevic, M. 2004. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. Environmental Health Perspectives 112: 672-677.

Carballo, M.; Aguayo, S.; de la Torre, A y Muñoz, M. J. 2004. Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. Science of The Total Environment. 341 (1): 71-79.

CARU. Comisión Administradora del Río Uruguay. 1992. Segundo seminario sobre el río Uruguay y sus recursos pesqueros. Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay. Serie Técnico-Científica, 1(1): 83 pp.

CARU. Comisión Administradora del Río Uruguay. 1993. Informe de avance Programa de Calidad de las Aguas y Control de la Contaminación del Río Uruguay – Etapa I 1987 -1990. Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay. Serie Técnico-Científica, 2(1), 88 pp.

CARU. Comisión Administradora del Río Uruguay. 1999. Primeras jornadas sobre conservación de la fauna íctica en el Río Uruguay. Publicaciones de la Comisión Administradora del Río Uruguay. Libro de resúmenes. 52 pp.

Cheshenko, K.; Pakdel, F.; Segner, H.; Kan, O. y Eggen, R.I.L. 2008. Interferencie of endocrine disruption chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155:31-62.

Coakley, J; PV Hodson; A van Heiningen & T Cross. 2001. MFO induction in fish by filtrates from chlorine dioxide bleaching of wood pulp. *Wat. Res .* 35:921-928.

Colborn T, Thayer K. 2000. Aquatic ecosystems: harbingers of endocrine disruption. *Ecolog Applic* 10(4):949-957.

Cotec Ltda. 2005.Fanapel S.A. Proyecto: Construcción de emisario subacuático. Informe Ambiental Resumen. 36pp

De Matteis, F. 1994. The role of cytochrome P-450 in drug metabolism and toxicity. En: *Contaminants in the environment a multidisciplinary assesment of risk to man and other organisms*. De. A. Renzoni, N. Mattei, L. Lari & M.C. Fossi. CRC Press, Inc. Lewis Publishers. 81-92 pp.

Devlin, R.H. y Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.

Diniz, M.S.; Peres, I. y Pihan, J.C. 2005. Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. *Science of the Total Environment*. 349 (1-3): 129-139.

Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). 2005. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Anuario 2005. URL: <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Anuario2005/capitulo2/Cuadro10.htm> (octubre/06).

Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA). 2006. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Industrias con trámite SADI. URL: <http://www.dinama.gub.uy/tsadi>

Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA). 2007. Calidad del agua del río Uruguay. Resultados de las tres primeras campañas. 20pp

Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA). 2006. Carpa Común. URL: <http://dinara.gub.uy> (octubre/06).

Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA). 2006. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Importación de productos fitosanitarios 2006. URL: <http://chasque.apc.org/dgsa> (octubre/06).

Eguren, G. 1997. Evaluación del efecto derivado de la descarga de compuestos organoclorados al río Biobío usando biomarcadores en peces. Tesis doctoral. Universidad de Concepción (Chile). EULA-Chile. 84pp.

EPA/630/R-96/012. Febrero 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. 120p.

EAUK (Environment Agency United King). 2005. Oestrogenic Endocrine Disruption in fish - developing biological effect measurement tools and generating hazard data. URL: <http://www.environment-agency.gov.uk> (julio/06).

European mountain lake ecosystems: Regionalisation, diagnostic and socioeconomic evaluation – EMERGE. Fish Ecotoxicology. Workpackage 5. 7p. URL: [http:// www.mountain-lakes.org/emerge/methods/29.pdf](http://www.mountain-lakes.org/emerge/methods/29.pdf) (junio/06).

Folmar, L.C.; Denslow, N.D.; Rao, V.; Chow, M.; Crain, D.A.; Enblom, J.; Marcino, M.; Guillette, L.J. 1996. Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Environmental Health Perspectives* 104:1096-1101.

Fossi, M.C. 1994. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102 (12): 49-54.

Fossi, M.; S. Focardi; C. Leonzio; J. Gavilán; R. Barra y O. Parra. 1995. Use of biomarkers to evaluate effects of xenobiotic compounds in the Biobio basin (Central Chile). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 55: 36-42.

García-Reyero, N.; Barber, D.S.; Gross, T.S.; Johnson, K.G.; Sepúlveda, M.S.; Szabo, N.J.; Denslow, N.D. 2006. Dietary exposure of largemouth bass to OCPs changes expression of genes important for reproduction. In press. *Aquatic Toxicology*, 12p.

Gimeno S.; Komen H.; Gerritsen A.G.M.; Bowmer T. 1998a. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic Toxicology*. 43(2): 77-92.

Gimeno S.; Komen H.; Jobling S.; Sumpter J.; Bowmer T. 1998b. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*. 43 (2):93-109.

González P.; Oyarzún, C. 2002. Variabilidad de índices biológicos en *Pinguipes chilensis* Valenciennes 1833 (Perciformes, Pinguipedidae): ¿Están realmente correlacionados? *Gayana* 66(2): 249-253.

GraphPad Software. 2002. Grubb's test for detecting outliers. URL: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm>

Guillette, L.J., Jr, 2000. Contaminant induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Horm. IGF Res.* 10 (Suppl. B), S45 /S50.

Hassanin, A.; Kuwahara, S.; Nurhidayat, S.; Tsukamoto, Y.; Ogawa, K.; Hiramatsu, K.; Sasaki, F. 2002. Gonadosomatic index and testis morphology of Common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *J. Vet. Med. Sci.* 64(10): 921-926

Heppell, S. A.; Denslow, N. D.; Folmar, L. C.; Sullivan, C. V. 1995. Universal Assay of Vitellogenin as a Biomarker for Environmental Estrogens. *Environmental Health Perspectives* 103 (7): 9-15.

IPCS. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. 2002. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. 133p. URL: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (Noviembre/2006).

Jobling, S.; Sumpter, J.P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. 27 (3-4): 361-372.

Karels, A.; Oikari, A. 2000. Effects of pulp and paper mill effluents on the reproductive and physiological status of perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) during the spawning period. *Ann. Zool. Fennici*. 37:65-77.

Karels, A.; Markkula, E.; Oikari, A. Reproductive, biochemical, physiological, y population responses in perch (*Perca fluviatilis* L.) y roach (*Rutilus rutilus* L.) downstream of two elemental chlorine-free pulp y paper mills. 2001. *Environmental Toxicology y Chemistry*. 20(7):1517-1527.

Kiparissi, Y.; Balch, G.C.; Metcalfe, T.L.; Metcalfe, C.D. 2003. Effects of the isoflavones genistein y equol on the gonadal development of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*. 111(9): 1158-1163.

Lahdelma, I., Oikari, A. 2005. Resin acids y retene in sediments adjacent to pulp y paper Industries. *Journal of soils y sediments*. 5(2): 74-81

Lavado, R.; Thibaut, R.; Raldúa, D.; Martín, R.; Porte, C. 2003. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196 (2): 247-257.

Liao, T.; Jin, S.; Yang, F.; Hui, Y.; Xu, Y. 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay for rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vitellogenin and comparison of vitellogenin responses in rare minnow and zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment* 364: 284-294.

Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A. 2003. Endocrine disruptors in the environment. *Pure Applied and Chemistry* 75(5): 631-681

Martel, P.H., Kovacs, T.G., and Voss, R.H. 1996. Effluents from Canadian pulp and paper mills: A recent investigation of their potential to induce mixed function oxygenase activity in fish. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, (eds). St. Lucie Press , Del Ray Beach , FL , USA . pp 401-412.

McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., Portt, C.B., Munkittrick, K.R., Sibley, P.K., Smith, I.R., and Dixon, D.G. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker population (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 21: 199-218.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., y Dixon, D.G. 1992. Changes in maturity, plasma sex steroids levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, y the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1560-1569.

Munkittrick, K.R.; McMaster, M.E.; Van Der Kraak, G.; Portt, C.; Gibbons, W.N.; Farwell, A.; Gray, M. 2000. Development of methods for effects-driven cumulative effects assessment using fish populations: Moose River project. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). ISBN 1-880611-41-4. 210pp.

NIWR-Norwegian Institute for Water Research -. 2001. Sampling Procedure. Sampling of fish material for analysis of contaminants and biomarkers. BECPELAG. 3p. URL: www.iis.niva.no/PELAGIC/web/participants_only/Sampling%20procedure%20fish.pdf (mayo/06).

Olea, Nicolás. 2002. Agricultura y Salud - Pesticidas, Plaguicidas, Fitosanitarios, Agroquímicos URL: <http://www.ecoport.net> (mayo/06).

Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004. OECD Environment Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 47. Detailed Review Paper on

- Fish Screening Assays for the Detection of Endocrine Active Substances. ENV/JM/MONO(2004)18. URL: <http://www.oecd.org> (mayo/06).
- Örn, S. 2006. The Zebrafish as a model organism for evaluation of endocrine disrupters. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. 39pp.
- Orrego, R.; Moraga-Cid, G.; González, M.; Barra, R.; Valenzuela, A.; Burgos, A.; Gavilán, J.F. 2005. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(8):1935-1943.
- Palacio, J. A. ; Henao, B.; Vélez J.H.; González, J.; Parra, C.M. 2002. Acute toxicity and bioaccumulation of pesticide Diazinon in red tilapia (*Oreochromis niloticus x Mossambicus albina*). *Environmental Toxicology*. 17: 334-340.
- Parra, O., 1998. El río Biobío, el recurso natural base del desarrollo de la región. Cuadernos del Biobío N°5, Municipalidad de Concepción, 83pp.
- Peck, M.; Gibson, R. W.; Kortenkamp, A.; Hill, E.M. 2004. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (4): 945-952.
- Peña, C.E.; Carter, D.E.; Ayala-Fierro, F. 2001. Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Southwest Hazardous Waste Program. College of Pharmacy. University of Arizona. URL: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/> (mayo/07).
- Pombo, M.; Castro, L. 2005. Disruptores endocrinos. URL:<http://www.seep.es/privado/download.asp?url=congresos/C2005/Conferencias/Conferencia-Manuel%20Pombo.pdf> (abril/06).
- Porte, C.; Janer, G.; Lavado, R.; Martin-Skilton, R.; Thibaut, R. 2005. Disruptores en el medio acuático: efectos sobre vertebrados e invertebrados. VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS. URL: <http://tox.umh.es/aetox/anuncios/2005/condeact.pdf> (mayo/06).
- Porter, C. M.; Janz D. M. 2003. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54 (2): 199-206.
- Rivas, A.; Granada, A.; Jiménez, M.; Olea, F.; Olea, N. 2005. Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente* 7p. URL:<http://www.revistaecosistemas.net>
- Sandstöm, O. 1996. In situ assessments of the impact of pulp mill effluent on life-history variables in fish. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ (eds.). St. Lucie Press, Delray Beach, FL , USA , pp 449-457.
- Schwaiger J.; Spieser O.H.; Bauer C.; Ferling H.; Mallow U.; Kalbfus W.; Negele R.D. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*. 51 (1): 69-78.
- Shugart, L.; McCarthy, J.; Halbrook, R. 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: An overview, *Risk Analysis* 12 (3): 353-360.
- Sole M.; Barcelo D.; Porte C. 2002. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology*. 60(3): 233-248.

Smith B.B. 2004. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spawning dynamics and early growth in the lower River Murray, South Australia. CRC for Freshwater Ecology. School of Earth and Environmental Sciences. The University of Adelaide. 167 p.

Strayer L. Bioquímica. Cuarta Edición (1995). Tomo II. Ed. Reverté S.A.

Sultan, C.; Balaguer, P.; Terouanne, B.; Georget, V.; Paris, F.; Jeandel, C.; Lumbroso, S.; Nicolas, J.C. 2001. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 178 (1-2): 99-105.

Sumpter, J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters*. 82-83: 737-742.

Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., and Chang, J.P. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115:224-233.

Vazzoler, A., 1986. *Biologia da reprodução de peixes teleosteos: teoria e prática. (Reproductive biology of teleost fishes: theory and practice.)* Maringá, EDUEM Ed.

Vega-López, A.; Martínez-Tabche, L.; Domínguez-López, M.L.; García-Latorre, E.; Ramón-Gallegos, E.; García-Gasca, A. 2005. Vitellogenin induction in the endangered goodied fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 142(C): 356-364.

Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambre C., Tarazona J.V., Bryt I. & Vethaak A.D. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 71-133.

Williams, T.G., Carey, J.H., Burnison, B.K., Dixon, D.G., and Lee, H.-B. 1996. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mixed function oxygenase responses caused by unbleached and bleached pulp mill effluents: A laboratory-based study. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ (eds). St. Lucie Press, Del Ray Beach, FL, USA. pp 379-389.