



# **UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**DEPARTAMENTOS DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS y**

**FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE**

**Alteraciones en el ovario de pez cebra (*Danio rerio*)  
tratados con dioxinas**

**Noelia Patrignani de la Fuente**

**2014**

TITULO: *Alteraciones en el ovario de pez cebra (Danio Rerio) tratados con dioxinas*

AUTOR: *Noelia Patrigniani de la Fuente*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



# **Alteraciones en el ovario de pez cebra (*Danio rerio*) tratados con dioxinas**

Trabajo presentado por la Licenciada en Medicina y Cirugía  
**Noelia Patrignani de la Fuente**

Para optar al grado de Doctor por la universidad de  
Córdoba

**Dpto. ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS**

**Dpto. FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE**

**Córdoba, Mayo 2014.**



Departamento de Farmacología, Toxicología, y  
Medicina Legal y Forense  
Universidad de Córdoba

**M<sup>a</sup>. ROSARIO MOYANO SALVAGO, CATREDATICA DEL  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y  
MEDICINA LEGAL Y FORENSE DE LA FACULTAD DE  
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**INFORMA:** Que **D<sup>a</sup> Noelia Patrignani de la Fuente**, Licenciada en Medicina y Cirugía,  
ha

Realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo

Titulado “**Alteraciones en el ovario de pez cebra (*Danio rerio*) tratados con dioxinas**” que considero

Reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al

Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

De lo que informo en Córdoba, a 5 Mayo de 2014



**Departamento de Anatomía y Anatomía**

**Patológica comparadas.**

**Universidad de Córdoba**

**ALFONSO BLANCO RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DEL  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA  
COMPARADAS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**INFORMA:** Que **D<sup>a</sup> Noelia Patrignani de la Fuente**, Licenciada en Medicina y Cirugía,  
ha

Realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo

Titulado “**Alteraciones en el ovario de pez cebra (*Danio rerio*) tratados con dioxinas**” que considero

Reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al

Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

De lo que informo en Córdoba, a 5 Mayo de 2014



Departamento de Farmacología, Toxicología

Y Medicina legal y forense

Queremos destacar que el presente trabajo ha cumplido con creces su planteamiento, desarrollo y tras el desarrollo de sus resultados y discusión. Ha llegado a unas conclusiones lógicas que cubren los objetivos planteados al iniciarse el trabajo.

La parte experimental ha sido realizada en el animalario de la Universidad de Córdoba, bajo mi dirección

Y consideramos que en este trabajo concurren todas las condiciones para que se pueda presentarse para la obtención del Doctorado por la Universidad de Córdoba.

Córdoba 6 de Mayo de 2014.

A handwritten signature in blue ink that reads "R. Moyano". The signature is written in a cursive style.

Fdo, Rosario Moyano Salvago



Departamento de Anatomía y Anatomía

Patológica Comparadas

El trabajo realizado por la doctoranda, sea realizado como un modelo de investigación multidisciplinar. Sobre el planteamiento de que la exposición a la dioxina provoca alteraciones en el desarrollo folicular en las hembras, lo que da lugar a un aumento en el porcentaje de folículos atrésicos, se tomo un modelo que recogía el estudio de los ovarios del zebrafish.

Todos los capítulos han sido correctamente desarrollados, por lo que de un planteamiento inicial, se obtuvieron unas claras conclusiones.

En trabajo se ha realizado bajo mi dirección, Y considero que es apto para ser presentado y defendido para la obtención del doctorado por la universidad de Córdoba

Córdoba 6 de Mayo de 2014.

Fdo, Alfonso Blanco Rodríguez

Institut za oceanografiju i ribarstvo  
Šetalište I. Meštrovića 63,  
P.P. 500  
21000 SPLIT, HRVATSKA  
tel: +385 21 408000, fax: +385 21 358650  
e-mail: office@izor.hr, web: www.izor.hr



Institute of oceanography and  
fisheries  
Šetalište I. Meštrovića 63,  
P.O.Box 500  
21000 SPLIT, CROATIA  
tel: +385 21 408000, fax: +385 21 358650  
e-mail: office@izor.hr, web: www.izor.hr

**Ana Molina**

Dpt. Pharmacology, Toxicology, and Legal and Forensic Medicine  
University of Córdoba,  
Spain

#### To Whom It May Concern:

Hereby, we confirm that ms entitled "Structural and ultrastructural evaluation of zebrafish ovaries after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)" by authors Noelia PATRIGNANI, Ana MOLINA, Alfonso BLANCO, María AYALA, Rosario MOYANO was submitted to the international scientific journal "Acta Adriatica", issued by the Institute of Oceanography and Fisheries, Split, Republic of Croatia and is scheduled for publication in the next Volume 55(1) June 2014.

Yours sincerely,

In Split, 15 April 2014

Acta Adriatica  
Anita Marušić, prof.  
*Anita Marušić*  
Technical Editor



**a Paco y Juan de Dios**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a los Dr Alfonso Blanco Rodríguez y D<sup>a</sup> Rosario Moyano Salvago, directores de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma.

Un agradecimiento especial a mi familia y amigos por la comprensión, paciencia y ánimo recibidos.

# **INDICE**

**1 INTRODUCCIÓN 1**

**2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 6**

**3 MATERIAL Y MÉTODOS 105**

**4 RESULTADOS 129**

**5 DISCUSION 161**

**6 CONCLUSIONES 176**

**7 RESUMEN 179**

**8 BIBLIOGRAFIA 181**

# **INTRODUCCIÓN**

El propósito de este proyecto de Tesis Doctoral es estudiar la capacidad de concentración de la dioxina en el parénquima del ovario, considerando su posible interferencia tanto en los folículos ováricos. Con ello abordamos las consecuencias que se derivan de la exposición de los disruptores endocrinos tanto desde el punto de vista de la función endocrina del ovario, como desde su implicación en ovogenesis.

Con el presente proyecto de investigación se pretende alcanzar claros beneficios a través de profundizar en el conocimiento de la Patología medioambiental, y en concretos de las intoxicaciones agudas y crónicas producidas por la ingestión de disruptores endocrinos como es la dioxina, que esta teniendo cada vez mayor importancia en los Patología Humana y Veterinaria. Dentro de este capítulo general se destaca las siguientes contribuciones:

## INTRODUCCIÓN

- Contribución al conocimiento de los mecanismos patogénicos de las intoxicaciones debidas al uso de los disruptors endocrinos. Este punto resulta de especial interés en los casos de intoxicaciones alimentarias.
- Contribución al conocimiento del papel de la dioxina a dosis subclínicas (exposición medioambiental por medio de residuos alimentarios) sobre el ovario, valorando la posible participación de estas sustancia en las alteraciones de la reproducción de origen medioambiental.
- Contribución al conocimiento de la acción del cadmio sobre el ovario, y poder determinar los riesgos de producirse desde procesos degenerativos y necroticos hasta neoplasias del ovario

Beneficios en el avance general del conocimiento:

- Contribución al conocimiento de la interacción de las diferentes dosis de la dioxina, intoxicaciones agudas y crónicas, en el ovario, con proyección a comprender la implicación de los mecanismos patogénicos de los disruptores endocrinos, en el ovario.
- Contribución al conocimiento en la patología reproductora, de las exposiciones por la dioxina, y como se producen una reducción de las hembras por depósitos directos de los disruptores endocrinos en los óvulos.

No menos preocupantes, aunque menos documentados, resultan los riesgos de la ingestión de esta sustancia a dosis subclínicas, que pasarían desapercibidos por no llegar a exteriorizar una sintomatología evidente. Cabe recordar la preocupación que existe a cerca de la implicación de posibles

## INTRODUCCIÓN

factores alimenticios-ambientales que subyacen tras el deterioro de determinados sistemas orgánicos, especialmente en el campo reproductivo.

Este trabajo de Proyecto surgió como un planteamiento interdisciplinar, entre los Departamentos de Toxicología y de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, siendo sus principales protagonistas los disruptores endocrino, pero cuya incidencia en la salud humana ha sobrepasado con creces sus posibles efectos secundarios. El avance de las ciencias aplicadas, en las últimas décadas, viene persiguiendo de una manera denodada la incesante búsqueda de mejoras en las tecnologías de las producciones animales, que lleven a unos beneficios en la obtención de animales de abasto para el consumo humano, ante el riesgo de agotamiento de los recursos alimentarios naturales. El abuso en la utilización de estos compuestos motiva trastornos que son ostensibles en el aparato endocrino, el potencial de toxicidad de algunos de ellos, y el riesgo consiguiente que supondría para el consumo de carne de animales tratados, ha dado lugar a que se establezca una legislación sobre su empleo.

El acumulo progresivo de sustancias químicas que se han vertido al medio externo, como los disruptores endocrinos y concretamente las dioxinas, tienen el potencial de alterar sistemas orgánicos y concretamente los aparatos reproductores, mediante alguno de estos tres mecanismos: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles.

En el caso de las dioxinas, está suficientemente documentado que muestran una preferencia por afectar el testículo. El signo más espectacular y preocupante de que los disruptores endocrinos pueden haberse cobrado ya un precio importante se encuentra en los informes que indican que la cantidad y movilidad de los espermatozoides de los varones ha caído en picado en el último medio siglo. El estudio inicial, realizado por un equipo danés encabezado por el doctor Niels Skakkebaek y publicado en el *British Medical Journal* en septiembre de 1992, descubrió que la cantidad media de espermatozoides masculinos había descendido un 45 por ciento, desde un promedio de 113 millones por mililitro de semen en 1940 a sólo 66 millones por mililitro en 1990. Al mismo tiempo, el volumen del semen eyaculado había descendido un 25 por ciento, por lo que el descenso real de los espermatozoides equivalía a un 50 por ciento.

Pero la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación en aves, peces y tortugas; graves deformidades de nacimiento en aves, peces y tortugas; anomalías metabólicas en aves, peces y mamíferos; anomalías de comportamiento en aves;

## INTRODUCCIÓN

demasculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos; defeminización y masculinización de peces y aves hembras; y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos. Junto a la experiencia del DES y los estudios con animales sugieren también una vinculación entre las sustancias químicas disruptoras endocrinas (dioxinas) y varios problemas de reproducción en las mujeres, especialmente abortos, embarazos ectópicos y endometriosis.

Si bien no existe información de la actuación de las dioxinas, sobre el ovario como ocurre con el testículo. Utilizando otros disruptores endocrinos en peces como las dioxinas, el ovario se ha visto afectado en todas las fases de maduración de sus folículos. Las sustancias químicas que preocupan pueden tener efectos totalmente distintos sobre el embrión, el feto o el organismo perinatal que sobre el adulto. Nos planteamos que la posible afectación del ovario con el uso de la dioxina, se pueda producir en fases precoces de la vida de los mamíferos, por eso se puede considerar que el uso de estos disruptores tenga una importancia fundamental en las hembras el momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar su carácter y su potencial futuro, por lo que las hembras como en los machos se produzca una disminución de los componentes germinales de ambas gónadas.

La posible infertilidad en los machos, por la consumición involuntaria y su posterior almacenamiento, sea fácilmente detectable con solo la cuantificación de los espermatozoides y la calidad de los mismos. Pero en los ovarios de los mamíferos, aunque los folículos disminuyan, no es tan evidente por el gran número de folículos primordiales existentes. Por estos motivos nos hemos planteado estudiar los ovarios en peces tratados con dioxinas, para conocer las posibles alteraciones en la maduración de los folículos, y una posible disminución en el número de los mismos.

Entre las sustancias químicas de efectos disruptores sobre el sistema endocrino figuran, las dioxinas y furanos, que se generan en la producción de cloro y compuestos clorados, como el PVC o los plaguicidas organoclorados, el blanqueo con cloro de la pasta de papel y la incineración de residuos.

Una de las estructuras más estables tanto en los folículos ováricos como en su fase libre de los mamíferos, es la zona pelucida, y se debe a por una parte a la protección que recibe del enclaustramiento en el folículo ovárico, y sobre todo por las uniones íntimas entre las prolongaciones citoplasmáticas de los ovocitos y de las células foliculares de la corona radiada, en el seno de la propia zona pelucida. En cambio en peces la zona pelucida se hace más labil, debido a la falta de uniones entre los ovocitos y las células foliculares, junto al hecho de que dichos folículos no están encerrados en una gruesa membrana conectiva como ocurre en los mamíferos. Por estos motivos la zona pelucida de los folículos en peces, es muy labil frente a las alteraciones endocrinas y vasculares.

Entre las alteraciones citadas por el acumulo de disruptores endocrinos, tienen importancia las modificaciones de la sangre y concretamente las plaquetas y en los peces los trombocitos. La

## INTRODUCCIÓN

conglutinación de los mismos produce graves oclusiones vasculares, que llevan a acentuar los procesos degenerativos y necróticos.

## ***Revisión***

## ***Bibliográfica***

---

El término *dioxina* no tiene una única definición, designa tanto a un grupo de sustancias relacionadas como a componentes de dicho grupo. Todas estas sustancias tienen la misma estructura y geometría molecular básica de átomos de carbono-oxígeno y átomos de cloro ligados a los de carbono. La dioxina pertenece a una familia de sustancias químicas de propiedades y toxicidad similares. Existen 75 tipos de dioxinas o dibenzodioxinas policloradas, 135 furanos o dibenzofuranos policlorados y 209 bifenilos policlorados.

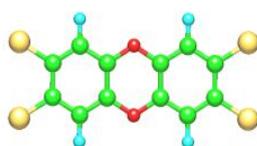
La dioxina es un compuesto orgánico incoloro e inodoro. Es un subproducto espontáneo de fenómenos y desastres naturales como la actividad volcánica y los incendios forestales, así como de la actividad del hombre (industria, incineración, blanqueado de pulpa y papel y emanaciones de gases de escape). La dioxina se encuentra en todas las áreas donde haya actividad industrial, tanto en el suelo, el agua y el aire como en los alimentos, los cuales, junto con la leche materna, constituyen la principal fuente de exposición a la misma. En general, el riesgo de contacto por inhalación y contacto dérmico es sumamente bajo.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La dioxina se acumula en el tejido graso de los animales. Todos los estudios realizados con animales han revelado que la dioxina es cancerígena. Es una sustancia muy poderosa y de efecto residual a largo plazo. La excreción de sólo la mitad de la dioxina ingerida demanda siete años. Los investigadores todavía están tratando de determinar si la dioxina está asociada en el hombre a bajo coeficiente intelectual, problemas reproductivos y deficiencias del sistema inmunológico.

Ante tal diversidad de riesgos y advertencias tan alarmantes, es tranquilizador enterarse de que la EPA ha anunciado que los niveles promedio de dioxina en la población norteamericana están disminuyendo. Sin embargo, la dioxina está tan difundida que es muy difícil evitar la exposición a la misma, por lo que no se aconseja eliminar ciertos alimentos de la dieta con ese fin. Si desea reducir la exposición a la dioxina, seleccione cortes de carne magra y productos lácteos descremados, siga una dieta variada y coma con moderación.

No existe propiamente un solo compuesto llamado dioxina, sino que más bien este término está referido a un grupo de compuestos que contienen dos anillos bencénicos clorados, que se hallan enlazados el uno al otro a través de dos puentes de hidrógeno entre las moléculas de oxígeno presentes. Este último enlace es el responsable de su denominación (di = 2, oxo = enlace de oxígeno). La dioxina que últimamente ha causado mayor interés es la llamada 2,3,7,8-p-dibenzo-dioxina tetraclorada (TCDD, por sus siglas en inglés). Esta es una molécula plana (ver la representación espacial), en la cual los dos anillos bencénicos están coloreados de gris y unidos a los 4 átomos de cloro (verde) dispuestos simétricamente, con los átomos de oxígeno en color rojo.



## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

El número de átomos de cloro puede variar, lo que resulta en la existencia de un gran grupo de dioxinas diferentes.

Las dioxinas se forman durante el calentamiento de sustancias cloradas bajo condiciones de escasez de oxígeno. La mayoría de ellas son producidas durante la combustión de materiales orgánicos en la presencia de cloro (como por ej, por la sal de mesa), donde las condiciones de oxígeno son pobres. Un par de años atrás, esto conllevó a una crisis, debido a que el ganado vacuno pastaba cerca de los hornos de combustión. Por el contrario, la dioxina no se formará en aquellos ambientes en los cuales la disponibilidad de oxígeno sea la suficiente y la temperatura de incineración la adecuada.

Adicionalmente, las dioxinas también pueden ser producidas naturalmente por los hongos blancos causantes de la podredumbre. Estos hongos crecen en la madera formando colonias de color blanco. En este caso, las dioxinas son producidas a partir de la lignina. Así mismo, también pueden formarse durante la incineración de la madera bajo condiciones de una ventilación muy pobre, como ocurre durante el incendio de una casa o en un incendio forestal.

Las dioxinas pueden además ingresar al ambiente de diversas formas. Son destruidas lentamente por la luz solar y también a través de la actividad de los mohos en el suelo. Por lo tanto, las dioxinas están presentes ampliamente en el medio ambiente.

Las dioxinas son insolubles en agua, pero muy solubles en grasas. Pueden ser encontradas en las plantas debido a que son transportadas en las cenizas, y de este modo estar presentes también en el jardín. Cuando la lo res ingiere, la dioxina puede ser adsorbida y almacenada en la grasa del animal. Posteriormente, podrá ser excretada a través de la leche. Lo mismo ocurre en los seres humanos. Las dioxinas ingresan al organismo por medio de los alimentos, siendo almacenadas en la grasa corporal donde pueden permanecer por un largo

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

tiempo. De manera similar a como ocurre en las reses, la leche materna es la vía más importante para excretar la dioxina. Es debido a ello que la leche humana contiene pequeñas cantidades de dioxina.

Casi todas las grasas de origen animal contienen pequeñas cantidades de esta sustancia. En un principio, las grasas vegetales no la contienen. Normalmente, las cantidades presentes están por debajo de la ingesta máxima admisible.

La dioxina puede estar presente solamente en cantidades relativamente altas en los alimentos cuando ocurren accidentes industriales (Seveso) o a causa del deterioro químico, tal como se dió el caso presentado en Bélgica. Debido a que es difícil destruirla, puede distribuirse en diversos productos.

La dioxina es considerada como un compuesto muy tóxico, siendo una de las sustancias más tóxicas producidas (principalmente) por el hombre. También existe otro grupo pequeño de sustancias naturales que son mucho más tóxicas.

Adicionalmente, la dioxina también puede causar otros problemas, pero el hecho de que es peligrosa para los animales utilizados en el laboratorio, no significa necesariamente que tendrá el mismo efecto en los seres humanos. A pesar de ello, estas sustancias son vistas como peligros potenciales. El problema con las dioxinas es que pueden hallarse en los alimentos en muy pequeñas cantidades, lo que podría conllevar a una exposición crónica, y por ende, podrían ser la causa de problemas a (muy) largo plazo. Teniendo como base todo ello, no es posible especificar la razón directa de la reacción causal, y por consiguiente, este tipo de sustancias son definidas como peligros potenciales. Deben tomarse las precauciones necesarias para evitar su consumo. Solamente si la dioxina está presente en forma libre en grandes cantidades (Seveso

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

1980), sus efectos directos pueden ser determinados, los cuales serán probablemente el acné asociado con el cloro y la muerte de las ovejas como resultado del daño al hígado.

En conclusión, la dioxina es una sustancia potencialmente peligrosa, pero el efecto de su consumo no puede predecirse aún. En la práctica, estos no pueden diferenciarse de aquellos causados por el cáncer.

La creciente demanda de alimentos ha provocado que muchas especies de peces con importancia económica sean intensamente explotadas, con el consecuente colapso de sus pesquerías y su tendencia a desaparecer de aquellos hábitats donde históricamente se les ha encontrado (Rutaisire y Booth 2004). Sin embargo, en algunas especies se han hecho intentos por lograr cultivar individuos con fines comerciales, obteniéndose relativo éxito. Estas poblaciones cuando son mantenidas en confinamiento o sometidas a intensa presión de explotación presentan alteraciones gonadales que pueden disminuir su desempeño reproductivo, lo que se refleja especialmente en la reducción de parámetros como la tasa de fertilidad y sobrevivencia en incubación (Leonardo y col 2006).

Una de las más serias limitantes para el cultivo comercial de una nueva especie es el conocimiento y control de la biología reproductiva y los problemas o disfunciones que en ella acontecen, ya que ésta es la base de sustentación para los futuros programas productivos (Zohar y Mylonas 2001).

El manejo de las pesquerías a menudo requiere de la valoración de parámetros de madurez sexual, desove y fecundidad, los que necesitan de la comprensión cabal de la microestructura y función gonadal (Rutaisire y Booth 2004). Dicha información está disponible sólo para una pequeña cantidad de especies comercialmente importantes y en muchos casos sólo de forma parcial (Tyler y Sumpter 1996).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Los estudios histológicos proveen de información precisa del desarrollo oocitario, pero son lentos y costosos debido a que involucran complejas técnicas de laboratorio (West 1990). Sin embargo, actualmente se ha incrementado el interés en el estudio de las alteraciones histológicas (histopatología), debido a que los cambios estructurales a nivel gonadal son el resultado de la integración de un gran número de procesos fisiológicos que interactúan entre sí (van der Oost y col 2003).

La presente revisión realiza una breve descripción de las alteraciones reproductivas de hembras de peces enfocada en el proceso de atresia folicular, basándose en disfunciones analizadas en literatura con diferentes especies de peces teleósteos.

### ESTRUCTURA GONADAL EN PECES

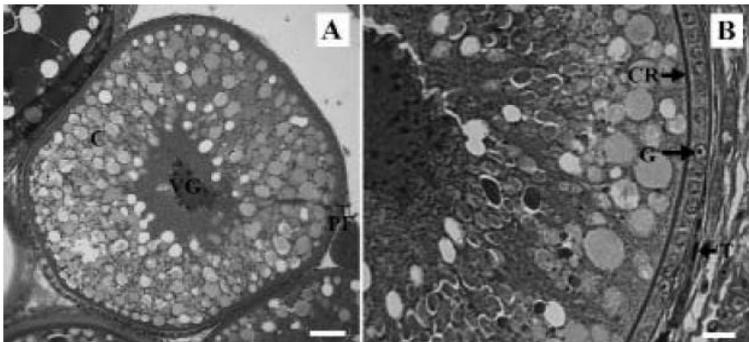
#### ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA

La microestructura del ovario de los peces teleósteos revela que éste se encuentra envuelto por una delgada túnica albugínea de tejido conectivo laxo, la cual presenta engrosamientos donde existen vasos sanguíneos que irrigan la gónada. En el interior del ovario se observan laminillas ovígeras que se desprenden de la albugínea, proyectándose hacia el lumen del órgano. El cuerpo de la laminilla está formado por tejido conectivo y escasas fibras musculares lisas, recubiertas por el epitelio germinal ovárico. El folículo ovárico se encuentra embebido dentro de un heterogéneo tejido de sostén, el que en su conjunto constituye el ovario (Nagahama 1983, Peredo y Sobarzo 1993).

Microscópicamente el folículo ovárico de los peces es relativamente simple, siendo su organización similar en todos los teleósteos. El oocito de ubicación central está rodeado por una envoltura acelular denominada corion, zona radiata (Leonardo y col 2006) o envoltura vitelina (Leino y col 2005). Esta envoltura se encuentra cubierta externamente por células foliculares, las

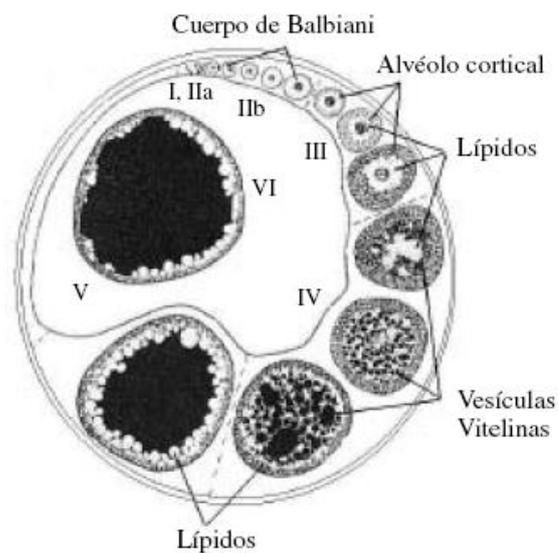
## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

cuales a medida que crece el oocito incrementan su número, distribuyéndose en una envoltura continua de una monocapa de células (llamada granulosa) y una capa externa de células tecales o envoltura folicular externa). Ambas capas celulares se encuentran separadas por la membrana basal (Takashima e Hibiya 1995). Histológicamente, la evidencia actual sugiere que la capa de células de la granulosa está compuesta por una población celular homogénea. Sin embargo, esta capa celular también contiene células micropilares, las cuales son fácilmente distinguibles de las células granulosas por sus características morfológicas, como son su forma triangular y su ubicación en el canal micropilar. Por el contrario, la capa de células tecales presenta mayor heterogeneidad, ya que está compuesta de capilares, fibroblastos, fibras de colágeno y en muchos casos de células especiales de la teca (Nagahama 1983, Takashima e Hibiya 1995, Linares-Casenave y col 2002).



## OOGÉNESIS

Se han empleado muchos criterios para caracterizar el proceso de oogénesis, entre ellos se encuentran: el tamaño, la cantidad y distribución de varias inclusiones celulares, especialmente gránulos de vitelo y morfología de los cromosomas. El proceso de oogénesis se ha dividido en cinco, seis u ocho etapas en la mayoría de los teleósteos (Ünver y Ünver Saraydin 2004). Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en una clasificación de seis estados de desarrollo oocitario, los cuales se describen a continuación



*Oogonias*: El primer paso en la ovogénesis es similar al desarrollo encontrado en la espermatogénesis, ya que las oogonias experimentan proliferación por divisiones mitóticas. Estas oogonias se presentan distribuidas de una manera no uniforme, aisladas o formando cistos (Peredo y Sobarzo 1993), con características citológicas que presentan poca variación entre las especies. En la carpita cabezona (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) las oogonias poseen un gran núcleo con algunos nucléolos de tamaño variable y en algunos casos un pequeño aro de citoplasma (Leino y col 2005).

*Cromatina nucleolar*: Esta etapa comprende desde leptoteno a paquíteno durante la profase I. Las principales características al microscopio óptico son la redistribución de los

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

cromosomas por todo el núcleo adoptando variadas figuras cromosomales, además de una redistribución de organelos citoplasmáticos. Durante esta etapa en la mayoría de las especies, una estructura citoplasmática conocida como el cuerpo vitelino de Balbiani o "núcleo vitelino" inicia su desarrollo (Nagahama 1983, Takashima e Hibiya 1995), el cual ha sido caracterizado como una estructura altamente basofílica. A través de microscopía electrónica se ha revelado que ésta no es una estructura homogénea, ya que está compuesta por diversos organelos como retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi, mitocondrias, gránulos lipídicos y cuerpos multivesiculares (Wallace y Selman 1981).

*Fase perinucleolar.* El inicio de esta fase se caracteriza por la aparición e inicio de la migración de múltiples nucléolos hacia el nucleoplasma periférico. Desde este momento el gran núcleo del oocito será llamado vesícula germinal (Nagahama 1983, Begovac y Wallace 1988, Takashima e Hibiya 1995). A pesar de que la meiosis se encuentra detenida en diploteno, el crecimiento oocitario y la diferenciación de la pared folicular continúa. Desde un punto de vista práctico, la organización básica del folículo ovárico puede ser observada mediante microscopía óptica por primera vez durante la fase perinucleolar, cuando el oocito se encuentra rodeado dentro de una capa continua de células foliculares (Takashima e Hibiya 1995) y tecales, las cuales poseen un núcleo aplanado con una capa muy delgada de citoplasma, difícil de observar. A nivel ultraestructural, tanto la capa de la granulosa y de células tecales se hacen distinguibles y rudimentos del corion pueden aparecer (Ravaglia y Maggese 2002). Además, en muchas especies el cuerpo de Balbiani es claramente definido en una posición yuxtannuclear. Posteriormente, este cuerpo sufre una desintegración gradual y migra hacia la superficie oocitaria (Takashima e Hibiya 1995).

*Alvéolo cortical (Vesícula vitelina):* Esta fase se caracteriza por la formación de vesículas vitelinas alrededor de la vesícula germinal y en algunos peces por la formación de gotas lipídicas

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

en el citoplasma, como en la carpita cabezona (*P. promelas*) (Leino y col 2005, Honji y col 2006). La formación de estas vesículas vitelinas se inicia en la periferia del ooplasma en algunas especies, pudiendo observarse sólo escasas vesículas durante una fase temprana. Sin embargo, a medida que el desarrollo progresa van llenando y distribuyéndose por todo el citoplasma contribuyendo a un incremento de tamaño por parte del oocito (Ravaglia y Maggese 2002, Leino y col 2005). Otra característica de importancia es la aparición de microvellosidades y corion (Takashima e Hibiya 1995, Honji y col 2006), la cual en el caso de la carpita cabezona es claramente visible hasta en los oocitos más pequeños de esta fase. Las células foliculares son de apariencia escamosa en la fase temprana, transformándose en cuboidales en la fase tardía (Leino y col 2005). En la mayoría de los teleósteos el inicio de la fase de alvéolo cortical precede el inicio de la fase vitelina, pero en algunas especies como el pez cebra (*Branchydanio rerio* Hamilton, 1822), estas fases pueden iniciarse conjuntamente (Nagahama 1983, Takashima e Hibiya 1995). Algunos autores separan esta etapa en tres: Vesícula de Vitelo I, Vesícula de Vitelo II, Vesícula de Vitelo III (Rutaisire y Booth 2004).

*Vitelogénesis:* En peces, antes de que la vitelogénesis se inicie, tiene lugar una serie de transformaciones nucleares, nucleolares y citoplasmáticas que hacen que el aspecto de los oocitos varíe de manera considerable (Zanuy y Carrillo 1987, Zanuy y col 2009, Mylonas y col 2010). Esta primera etapa corresponde al crecimiento primario o fase de crecimiento citoplasmático, donde se produce un incremento de los organelos citoplasmáticos, como son las mitocondrias, cuerpos multivesiculares, retículo endoplasmático y los elementos del Golgi. La segunda etapa corresponde a la vitelogénesis propiamente tal, fase donde el oocito experimenta un aumento de tamaño prolongado y sostenido. En los meses anteriores a la puesta, se produce un crecimiento drástico del ovario de la mayoría de los teleósteos (desde menos del 1% hasta un 20% o más de Índice Gonadosomático (IGS), dependiendo de la especie). Este crecimiento es debido al cúmulo de grandes reservas nutritivas o vitelo por parte de los oocitos (Zanuy y Carrillo

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

1987). Por ejemplo, en la trucha arco iris el oocito joven posee un promedio de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y al término de su desarrollo es de alrededor de 4 mm (Nagahama 1983). La síntesis de vitelo recibe el nombre de vitelogénesis, la cual ocurre fuera del oocito (vitelogénesis exógena) (Zanuy y Carrillo 1987, Le Menn y col 2000, Zanuy y col 2009, Mylonas y col 2010).

El oocito empieza a incorporar material por micropinocitosis formando gránulos de vitelo, los cuales inicialmente son más pequeños que los alvéolos corticales, encontrándose dispersos en el citoplasma periférico. Sin embargo, a medida que el oocito crece los gránulos de vitelo son de mayor tamaño y más numerosos, emigrando hacia el interior del ooplasma y desplazando a los alvéolos corticales hacia la periferia (Nagahama 1983, Leino y col 2005).

Durante esta fase se han caracterizado tres tipos distintos de material vitelino: gotas lipídicas, vesículas vitelinas y gránulos vitelinos, la secuencia de aparición de este material vitelino varía según la especie (Nagahama 1983). En estados avanzados de vitelogénesis, las inclusiones lipídicas (generalmente triglicéridos) coalescen entre sí para formar una sola o varias gotas de grasa, dependiendo de la especie (Zanuy y Carrillo 1987, Zanuy y col 2009, Mylonas y col 2010).

La arquitectura de la pared folicular aumenta su complejidad durante esta fase. A nivel estructural el corion en algunas especies como los scianidos, puede ser reconocido por la presencia de tres capas, denominadas: Z1, Z2, Z3 (Nagahama 1983). Esta última es de apariencia reticular o estriada durante gran parte de la vitelogénesis, debido al gran número de canales o poros (Leino y col 2005). No obstante, durante el final de la vitelogénesis, puede perder su apariencia debido a la compactación (Takashima e Hibiya 1995).

*Maduración:* Morfológicamente esta fase es caracterizada por el inicio o reanudación de la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal y la posterior ruptura de ésta (proceso

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

llamado "breakdown" en inglés), además se produce una clarificación del vitelo y un marcado incremento de tamaño debido a la hidratación (Nagahama 1983, Zanuy y Carrillo 1987, Takashima e Hibiya 1995, Ünver y Ünver Saraydın 2004, Honji y col 2006). Cabe señalar que en algunas especies, como los salmonídeos y la carpita cabezona (*P. promelas*), la vesícula germinal inicia su migración hacia el polo animal antes de la maduración durante las últimas etapas de la vitelogénesis, pero en otras como los scianidos la vesícula germinal permanece en el centro del oocito hasta el inicio de la maduración final (Takashima e Hibiya 1995, Leino y col 2005). En esta etapa concluye la primera división meiótica con la expulsión del primer cuerpo polar, para nuevamente volver a detenerse, esta vez en metafase de la segunda división (Takashima e Hibiya 1995), para luego ser ovulado y eventualmente desovado (o puesto).

Wallace y Selman (1980) observaron que durante la maduración final en *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus 1766), células de la granulosa experimentaron algunas alteraciones citológicas específicas, tales como un enorme aumento del aparato de Golgi con presencia de material secretorio e incremento de las cisternas glandulares de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres.

Los oocitos ya maduros son llamados huevos u ovas, los cuales durante la ovulación (con la meiosis detenida en metafase II) son expelidos en la cavidad peritoneal en especies con ovarios gimnovárico (Nagahama 1983) o en la cavidad ovárica en especies con ovario cistovárico. En muchas especies de peces marinos y de estuario se produce un marcado aumento del volumen oocitario debido al ingreso de agua dentro del oocito, proceso llamado hidratación. El reinicio y finalización de la segunda división meiótica ocurre posterior a la fecundación del oocito II.

La ovulación en los teleósteos involucra una serie de pasos preparatorios. Primero la capa folicular debe separarse del oocito, el mecanismo que comanda la interrupción en la

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

comunicación folículo-ooocito previo a la ovulación es desconocido, pero se ha sugerido la intervención de enzimas proteolíticas en la disrupción de la conexión. Se ha demostrado la presencia de algunos elementos contráctiles como microfilamentos en las células tecales, así como la presencia de fibras musculares lisas. A través de experimentos con inhibidores de estos sistemas contráctiles como Citocalasina B, se ha sugerido que este sistema de microfilamentos es necesario para la ovulación de los teleósteos (Nagahama 1983).

Posterior a la ovulación y desove, el ovario contiene folículos postovulatorios (POFs), ovas no desovadas, oocitos adultos inmaduros, oogonias y en peces con estaciones de desove continua o prolongada, oocitos en varias etapas de desarrollo (Takashima e Hibiya 1995, Ünver y Ünver Saraydin 2004).

Los folículos postovulatorios están constituidos por capas foliculares que permanecen en el ovario después de liberado el oocito. Inicialmente los POFs son una estructura definida, pero rápidamente se deterioran tornándose indetectables dentro de algunos días (Macchi y col 2003, Honji y col 2006, Ganas y col 2007).

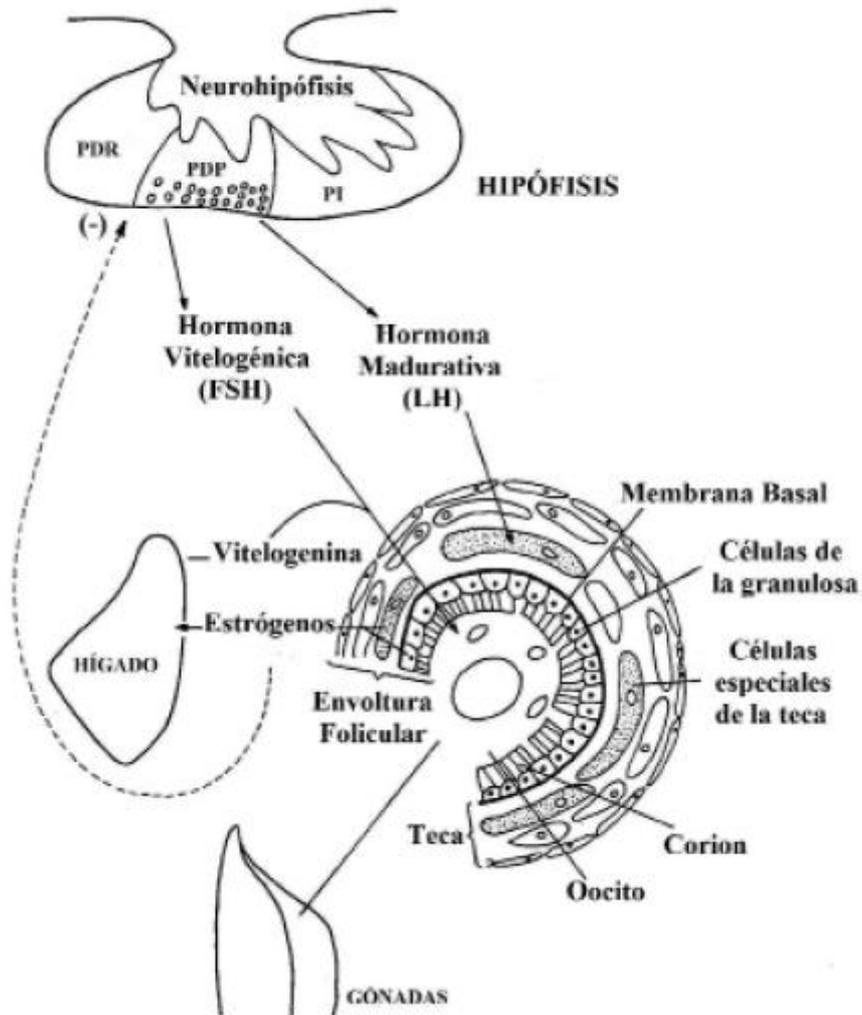
## CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN EN PECES

Similar a lo ocurrido en vertebrados superiores el desarrollo y crecimiento oocitario está gobernado por el sistema neuroendocrino, el cual estimula a los tejidos ováricos para el desarrollo folicular y la producción de esteroides (Hafez 2002). En peces, al igual que en otros vertebrados no mamíferos, la gran sensibilidad al medio ambiente ejerce un importante control sobre la reproducción, modulando a través de la integración de los sistemas sensoriales la

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

secreción de hormonas liberadoras hipotalámicas. El mecanismo de secreción de esteroides es un complejo sistema que involucra la percepción de estímulos ambientales, conexiones neuronales y órganos endocrinos, el cual de manera general está compuesto por órganos de los sentidos, glándula pineal, hipotálamo e hipófisis, esta última es la encargada de secretar hormonas estimuladoras de tejidos sintetizadores de esteroides (Nagahama 1983, Zanuy y Carrillo 1987, Zanuy y col 2009).

Las gonadotrofinas (GtHs) se han purificado en especies como el salmón, la carpa y la trucha, separándose dos fracciones denominadas GtH I (FSH) y GtH II (LH) (Zanuy y Carrillo 1987, Arantes y col 2010). La GtH I induce la captura de vitelogenina (Zanuy y Carrillo 1987, Luckenbach y col 2010) y, dependiendo de la especie, puede estimular la esteroidogénesis y liberación de AMPc, por lo cual se la denomina hormona vitelogénica. Por otra parte, la GtH II induce la maduración de los oocitos, la ovulación, además de estimular la formación de AMPc, denominándose hormona madurativa (Zanuy y Carrillo 1987, Zanuy y col 2009). Ambos tipos de GtH son liberadas desde la hipófisis y vertidas al torrente sanguíneo, donde al llegar a las gónadas, estimulan a los tejidos ováricos para realizar la síntesis esteroidogénica a nivel folicular en las células de la granulosa, células tecales, cuerpos atrésicos y folículos postovulatorios (*corpora lutea*) (Nagahama 1983, Valdebenito 2008, Mylonas y col 2010)



La síntesis de esteroides gonadales es llevada a cabo por células de la granulosa y de la teca en forma conjunta, produciendo  $17\beta$ -estradiol y esteroide inductor de la maduración ( $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona), respectivamente (Nagahama 1983).

La acción fisiológica del  $17\beta$ -estradiol es inducir la biosíntesis y secreción hepática de vitelogenina, la cual es liberada en la sangre y transportada hasta el ovario, en donde cumple un rol primordial durante la etapa de vitelogénesis. La hormona  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, es altamente efectiva en la inducción de la maduración *in vitro*. Este esteroide es sintetizado por el folículo en respuesta a la gonadotropina, encontrándose en elevadas concentraciones en el

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

plasma de hembras que experimentan maduración final oocitaria (FOM) (Nagahama 1983), pero no sólo el folículo ovárico es el único secretor de esteroides gonadales, estructuras postovulatorias también participan en su secreción. Los folículos postovulatorios recientes han sido caracterizados por un alto grado de vascularización de la capa tecal e hipertrofia de las células de la granulosa y al igual que en la granulosa de los folículos en crecimiento, existe evidencia de la actividad de enzimas involucradas en la producción de hormonas esteroidales, lo que sugiere una similitud de los folículos postovulatorios con el cuerpo lúteo de los mamíferos, ya que en éstos existe biosíntesis de esteroides (Kagawa y col 1981, Nagahama y Kagawa 1982, Nagahama 1983, Takashima e Hibiya 1995).

### ATRESIA FOLICULAR

La atresia folicular se ha caracterizado como un proceso de degeneración que pueden sufrir algunos oocitos durante su desarrollo (Nagahama 1983, 1994), el cual se incrementa en poblaciones de cultivo o silvestres sometidas a altos grados de explotación o captura, pudiendo ser generado por distintas disfunciones o alteraciones reproductivas. Por ejemplo, en la especie *Labeo victorianus* (Boulenger, 1901), los investigadores Rutaisire y Booth (2004) examinaron dos poblaciones silvestres en ríos distintos, determinándose distintos tipos de atresia para cada una de las poblaciones y una tasa de atresia mayor para la población con mayor presión de explotación.

### DISFUNCIONES REPRODUCTIVAS INVOLUCRADAS

### ASPECTOS GENERALES

Varias especies de peces exhiben disfunciones reproductivas cuando son criadas en cautiverio. Comúnmente, son fallas en hembras cerca de la maduración final del oocito (FOM), ovulación o desove (Zohar 1988, 1989<sup>a,b</sup>, Peter y col 1993). Estas disfunciones probablemente resultan de la combinación del estrés inducido por la cautividad (Sumpter y col 1994, Pankhurst y van der Kraak 1997) y la falta de un ambiente adecuado para el desove natural (Zohar 1989<sup>a,b</sup>, Yaron 1995, Battaglione y Selosse 1996, Ohta y col 1997). Los peces criados en cautividad generalmente exhiben un acelerado crecimiento y maduración. Sin embargo, este ambiente puede fallar en proveer los cambios cíclicos requeridos para completar el ciclo reproductivo (Linares-Casenave y col 2002).

Los problemas reproductivos pueden ser clasificados en tres tipos:

El primero y más severo es ejemplificado por la anguila de agua dulce (*Anguilla spp.*), la cual experimenta una falla de la vitelogénesis cuando es mantenida en cautiverio, lo que también ha sido observado en grupos de lisas (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) mantenidas exclusivamente en agua salada en las cuales la vitelogénesis se detiene en etapas muy tempranas (de Monbrison y col 1997).

En el segundo tipo, la vitelogénesis progresa normalmente, pero al principio de la temporada de desove los oocitos postvitelogénicos fallan en la maduración oocitaria final y ovulación, convirtiéndose en atrésicos (Zanuy y Carrillo 1987, Tucker 1994, Berlinsky y col 1997, Larsson y col 1997, Mylonas y col 1997<sup>a,b</sup>). Este tipo de disfunción es el problema reproductivo más común encontrado en pisciculturas (Mylonas y col 2010). Como lo observado en la especies *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) y *P. promelas*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El tercer tipo corresponde a la ausencia de desove (puesta) al final del ciclo reproductivo. En especies que exhiben este problema, el oocito experimenta una vitelogénesis, FOM y ovulación normal en respuesta a los estímulos fisiológicos y ambientales, pero los oocitos ovulados no son liberados (Zanuy y Carrillo 1987, Zohar y Mylonas 2001). Este tercer tipo es presentado en todas las especies salmonídeas mantenidas en cultivo.

### FACTORES EXTRÍNSECOS

Factores externos como la temperatura, luz, salinidad y confinamiento juegan un papel preponderante en la maduración, ovulación y puesta, debido a su profunda influencia sobre la sensibilidad folicular, ya que se requieren señales ambientales precisas para su sincronización (Ekcstein 1975, Daettlaff y Davydova 1979, Sower y col 1982, Arantes y col 2010). La temperatura afecta el desarrollo gonadal a través de la acción directa sobre la gametogénesis, la secreción de hormonas hipofisarias, la tasa de depuración hormonal, la respuesta del hígado a los estrógenos y, finalmente, sobre la respuesta de las gónadas a la estimulación (Zanuy y Carrillo 1987), lo cual ha sido demostrado en estudios de atresia folicular inducida por temperatura en el esturión blanco (*Acipenser transmontanus* Richardson, 1836), un actinopterio no teleósteo, donde hembras sometidas a medios con temperaturas mayores a las normales previo a la adquisición de competencia maduracional han detenido su desarrollo ovárico con la consecuente aparición posterior de atresia folicular (Linares-Casenave y col 2002). De manera similar, en la especie *Gillichthys mirabilis* (Cooper, 1864) la regresión gonadal es inducida en individuos sometidos a un régimen térmico elevado por un periodo prolongado. En muchas especies, además de temperaturas elevadas se requiere de fotoperíodos de días cortos. Sin embargo, en especies de los géneros *Bairdiella* y *Rhodeus* basta un fotoperíodo de días cortos para inducir la regresión gonadal (Zanuy y Carrillo 1987).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Como se mencionó anteriormente, la calidad espectral e intensidad luminosa también puede modificar la puesta. Se ha observado especies con un amplio espectro de respuesta y otras más selectivas donde longitudes de ondas cortas estimulan la maduración y ondas largas la inhiben (Lam 1983). La coincidencia existente entre niveles elevados de esteroides sexuales durante la recrudescencia gonadal y fotoperíodos decrecientes posteriores al solsticio de verano ha dado lugar a la hipótesis que en los salmonídeos los fotoperíodos decrecientes disparan la maduración gonadal (Billard y col 1978). Al contrario, en *Notemigonus crysoleucas* (Mitchill, 1814) la maduración final de los oocitos y ovulación sólo se presenta en peces expuestos a regímenes de fotoperíodos largos y temperaturas elevadas. Cabe señalar que ambos factores por separado no fueron capaces de inducir la maduración y ovulación en dicha especie (de Vlaming 1975).

En algunas especies se ha advertido que la melatonina induce la regresión o bloquea el desarrollo gonadal en peces que están en las últimas etapas de recrudescencia gonadal durante la primavera a fotoperíodos cortos. Cabe señalar que la melatonina puede tener efectos anti o pro gonadotropos según la hora del día en que es administrada. Además, se conoce la existencia de influencia lunar sobre la estación de puestas con la fase de vitelogénesis iniciada, por lo que es previsible que dicha influencia esté involucrada sólo en las etapas finales del ciclo reproductor, como son la maduración final, ovulación y puesta (Zanuy y Carrillo 1987).

En la "shemaya" (*Chalcalburnus chalcoides* Goldenstädt, 1772) se ha descrito la aparición de atresia folicular posterior al desove y ocasionalmente durante la etapa de maduración, presentándose en oocitos en cualquier etapa de desarrollo. Aparentemente, el estrés ambiental sería la principal causa de la atresia en esta especie (Ünver y Ünver Saraydin 2004).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Otros factores que pueden afectar la gametogénesis y puesta son la nutrición, el ambiente social tales como las feromonas, estímulos visuales y táctiles, corrientes de agua, oxígeno disuelto, presión barométrica, contaminación, radiación, entre otros (Zanuy y Carrillo 1987, Leino y col 2005).

### FACTORES INTRÍNSECOS

Del mismo modo, se han investigado factores internos que pueden alterar el proceso de oogénesis. Se ha observado que la presencia de la hormona madurativa en salmonídeos presenta niveles más elevados durante el periodo periovulatorio, mientras que durante la incorporación activa de vitelo los niveles de esta hormona son más bajos (Fostier y col 1982, Ng e Ilder 1983). Experimentalmente, se ha visto la imposibilidad de inducir la maduración en oocitos de la lubina (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) con ovarios en estado avanzado de vitelogénesis, a pesar de ser inyectada con hCG (gonadotropina coriónica humana), demostrándose de esta forma que las hormonas de tipo madurativas son indispensables para que la maduración y ovulación se lleve a cabo. En peces tratados con un anticuerpo contra la gonadotropina vitelogénica (FSH) se observó la detención de la vitelogénesis con posterior aparición de atresia folicular. Sin embargo, cuando se administraron anticuerpos contra la hormona madurativa no se observaron los efectos anteriores. Aparentemente, la señal que dispara irreversiblemente todo el proceso de maduración y ovulación en salmonídeos es la caída de los niveles plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol, debido a una merma en la actividad de la aromatasa de la granulosa y por consiguiente la pérdida de la retroalimentación negativa de los esteroides sobre la secreción de gonadotropina, la que alcanzaría niveles máximos (Zanuy y Carrillo 1987, Zeilinger y col 2009).

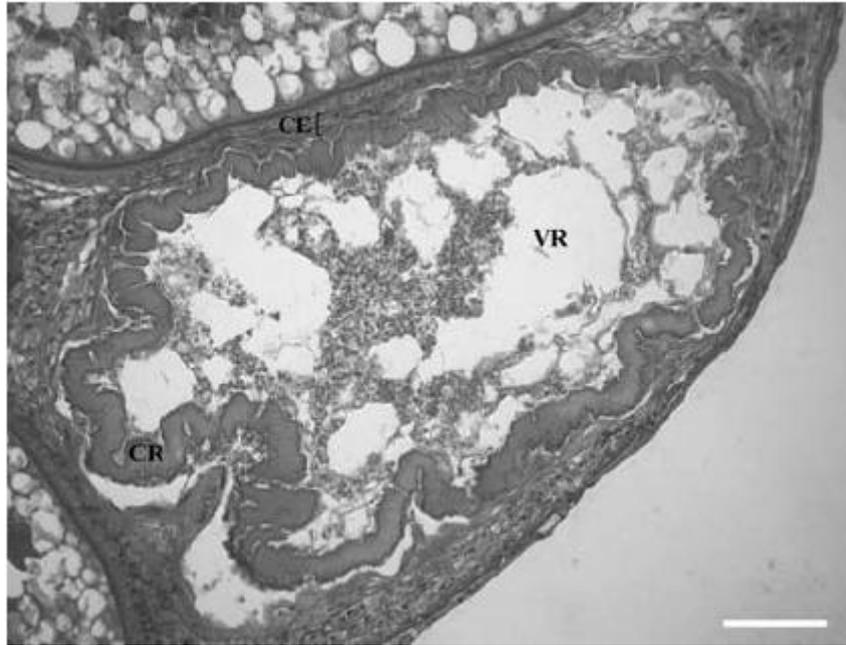
En la carpita cabezona (*P. promelas*) se estudiaron las disrupciones endocrinas y cambios gonadales inducidos por químicos. Los agonistas de receptores de estrógenos

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

provocaron un aumento en la incidencia de atresia folicular, probablemente debido a que altos niveles de vitelogenina interfieren con la maduración final. Sin embargo, agonistas más débiles como el Methoxychlor incrementaron la incidencia de atresia, pero sólo en algunas hembras. En el caso de los agonistas de receptores de andrógenos, estos incrementaron la atresia en folículos preovulatorios, muchos de los cuales adquirieron una apariencia inusual en su deposición de vitelo, la cual se vio disminuida en relación al tamaño del oocito. Los antagonistas de andrógenos como Flutamine aumentaron la incidencia de folículos en desarrollo temprano y folículos atrésicos. Observaciones similares se describieron para inhibidores del metabolismo esteroide (Leino y col 2005).

### CARACTERÍSTICAS DE LA ATRESIA FOLICULAR

Morfológicamente la atresia folicular comienza con la ruptura y vacuolización del corion (Santos y col 2008), además de la disolución de la membrana nuclear. Según el grado de desarrollo alcanzado por el oocito, su contenido de vitelo también será reabsorbido por fagocitosis desde las células de la granulosa. La atresia folicular involucra la hipertrofia de las células de la granulosa y posiblemente las células tecales (Nagahama 1983, Linares-Casenave y col 2002). Durante la atresia temprana las células de la granulosa remueven la cubierta del huevo y los contenidos oocitarios por digestión lisosomal y las células tecales son infiltradas por linfocitos (Linares-Casenave y col 2002). Esta puede presentarse en cualquier momento del desarrollo oocitario (Leonardo y col 2006, Gantias y col 2008), aunque lo más común es que aparezca en las fases de vitelogénesis y preovulatoria (Bromage y Cumaranatunga 1988). Desafortunadamente, los mecanismos que regulan la atresia folicular no están debidamente entendidos (Santos y col 2008), así como sus cambios estructurales, ultraestructurales y su correlación con cambios bioquímicos a nivel plasmático (Linares-Casenave y col 2002, Rutaisire y Booth 2004).



La atresia folicular y en algunos casos la aparición de necrosis están relacionadas con cambios patológicos debidos a afecciones sanitarias o condiciones degenerativas normales acompañados de cambios estacionales en la actividad gonadal (Takashima e Hibiya 1995). Los oocitos atrésicos (*corpora atretica* preovulatoria) son una característica muy común del ovario de los teleósteos (Ball 1960, Saidapur 1978), los cuales pueden presentarse tanto en peces de vida silvestre como en cautiverio (Leonardo y col 2006). Este proceso de degeneración se puede presentar particularmente bajo situaciones de estrés (Santos y col 2008) y condiciones ambientales adversas, especialmente en peces en cautiverio (Ball 1960, Linares-Casenave y col 2002). Como se mencionó, la presencia de ciertos contaminantes en el agua se han relacionado con la aparición de atresia folicular (Takashima e Hibiya 1995, Leino y col 2005), así como con alteraciones macroscópicas anormales en la morfología gonadal e inhibición de la oogénesis,

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

además de tumores ováricos espontáneos o químicamente inducidos, tales como cistadenomas, fibromas, adenomas y linfosarcomas (Takashima e Hibiya 1995).

Los folículos atrésicos han sido descritos como un sitio de biosíntesis de esteroides en los teleósteos debido a su apariencia glandular (Ball 1960, Hoar 1969, Browning 1973). Sin embargo, en especies como el esturión blanco (*A. transmontanus*) se ha concluido que no existe evidencia morfológica de síntesis de hormonas en éstos (Linares-Casenave y col 2002, Leonardo y col 2006). Pruebas histoquímicas han fallado en demostrar cualquier actividad enzimática esteroidogénica, así como en la detección de progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol en folículos atrésicos incubados con gonadotrofinas. Actualmente, diversos autores postulan que los folículos atrésicos están asociados sólo con degeneración y reabsorción de vitelo (Nagahama 1983).

Sin importar la razón por la cual los oocitos son reabsorbidos por el organismo, las especies en que se describe atresia folicular comparten un patrón común a nivel ultraestructural, ya que todos los elementos constitutivos del folículo ovárico son reabsorbidos (teca externa, teca interna, células foliculares, corion y oocitos). Los gránulos de vitelo, en el caso de estar presentes, pierden su individualidad, constituyendo una masa amorfa acidófila. La apariencia de los folículos atrésicos se caracteriza por la carencia de una forma definida, presentando vacuolas y pequeñas escamas u hojuelas amarillentas (Honji y col 2006).

### CLASIFICACIÓN DE LA ATRESIA FOLICULAR

Diversos autores han caracterizado y dividido el proceso de atresia folicular en distintas etapas según la especie estudiada, no existiendo unificación en su nomenclatura (Rutaisire y Booth 2004). Sin embargo, algunos investigadores han dividido la atresia folicular de los teleósteos en cuatro etapas consecutivas de acuerdo a la descripción al microscopio óptico de

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Bretschneider y Duyvene de Wit (1947) en *Rhodeus amarus* (Bloch 1782). Otros autores como Vizziano y Beroi (1990) clasifican los folículos atrésicos como hipertróficos y no hipertróficos, correspondiendo a las fases de proliferación de células foliculares y reducción del tamaño del oocito, respectivamente (Uribe y col 2006). Khoo (1975) entrega una descripción detallada de los cambios histológicos de la atresia folicular en el "goldfish" después de realizada su hipofisectomía, clasificándola en cinco etapas consecutivas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ). Para mayores detalles, se recomienda revisar el trabajo de este autor.

La atresia observada por Tricas e Hiramoto (1989) en *Chaetodon multicoloratus* (Garrett 1863) es cualitativamente similar a la descrita en otras especies, los oocitos vitelo-génicos que presentan su desarrollo detenido, muestran distintas etapas degenerativas de atresia:

*Alfa:* Caracterizada por ondulaciones del corion, disrupción nuclear, quiebre temprano de glóbulos de vitelo e hipertrofia de células de la granulosa.

*Beta:* Las células de la granulosa migran y fagocitan el vitelo. Las células de la teca no son observadas invadiendo el interior del oocito. El final de la atresia beta es caracterizada por la completa desintegración del corion.

*Gamma:* La reabsorción del contenido oocitario continúa durante esta etapa, hasta la reabsorción completa del contenido. Se presentan folículos pequeños y de aspecto irregular (posibles células luteales) de coloración amarillo-naranja con tinción HyE. Las células tecales del folículo todavía rodean el oocito remanente.

*Delta:* Es caracterizada por la presencia de componentes residuales después de la reabsorción de vitelo y citoplasma.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

*Épsilon*: Algunos autores han postulado que en esta etapa "células del cuerpo lúteo se podrían diferenciar en nuevas células oogoniales" (Khoo 1975).

En estudios del "ningu" (*L. victorianus*), los autores Rutaisire y Booth (2004) clasifican la atresia folicular en tres tipos, según las características histológicas observadas:

a) Caracterizada por la rápida fragmentación del corion y disolución del contenido citoplasmático, observándose oocitos liquefactos además de una disminución de éstos. Este tipo de atresia es más común en oocitos terciarios de ovarios desovados exitosamente.

b) Fue observada en oocitos en estado de vesícula de vitelo II, estando determinada por el quiebre de los glóbulos vitelinos en gránulos más pequeños, acompañado de degeneración vacuolar del citoplasma con un corion intacto, no se observaron signos de fagocitosis. La presencia de atresia tipo II, generalmente está relacionada con una falla o interrupción en el desove, teniendo esta una alta prevalencia en el estudio conducido por Rutaisire y Booth (2004). Sin embargo, en este tipo de atresia el ovario reabsorbió activamente los oocitos maduros para facilitar la recrudescencia gonadal.

c) Fue encontrada en baja frecuencia y sólo en oocitos previtelogénicos, caracterizándose por una degeneración de los oocitos debido a una tumefacción celular poco nítida al microscopio óptico, no se observó la invasión y fagocitosis de los folículos a diferencia de lo descrito para otras especies.

### DESCRIPCIONES DE LA ATRESIA FOLICULAR EN PECES

En el esturión blanco (*A. transmontanus*) en una primera etapa se inicia la degeneración del corion, lo que se manifiesta por la desaparición de sus estriaciones. A diferencia de otras especies se observan agregaciones de material nuclear en el citoplasma de folículos atrésicos tempranos. La corteza citoplasmática aparece desorganizada con agregaciones densas de gránulos de glicógeno y algunos glóbulos de lípidos se fusionan incrementando su tamaño. La lámina basal permanece intacta a pesar de la fagocitosis sufrida por el corion. En una etapa intermedia se produce la digestión del corion y la capa tecal aparece vascularizada e incrementada en su espesor con una lámina basal aún intacta. A medida que la etapa intermedia progresa, la lámina basal se degenera y las plaquetas de vitelo y gotas lipídicas son fagocitadas. Este cuerpo atrésico permanece encapsulado por una capa celular vascularizada. Posteriormente, en una etapa avanzada de la atresia las células fagocíticas compartimentalizan el citoplasma. Durante esta fase las plaquetas de vitelo desaparecen, aunque los lípidos e inclusiones de pigmentos permanecen por un tiempo prolongado. Los cuerpos atrésicos multicelulares formados en esta última etapa persisten en el ovario por muchos meses, exhibiendo una reducción gradual en el tamaño celular y concomitantemente una acumulación de pigmento oscuro. Las observaciones indican que la sensibilidad a la temperatura ocurriría en la oogénesis tardía, durante el periodo de síntesis de proteínas requeridas para que el oocito adquiera su competencia maduracional. Las etapas tempranas e intermedias de la atresia transcurren bastante rápido, la última etapa puede durar hasta más de cinco meses a temperaturas elevadas en esta especie (Linares-Casenave y col 2002).

Se postula que las células foliculares poseen la habilidad de adquirir características fagocitarias, lo que ha sido observado durante la fagocitosis de folículos atrésicos en algunos

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

peces. Histológicamente se ha caracterizado por áreas de tinción color marrón con HyE (Rutaisire y Booth 2004). Sin embargo, en el esturión blanco (*A. transmontanus*) las células transformadas de la granulosa sólo aparecen en la fase inicial de digestión del oocito. En este mismo estudio las células tecales aparecen involucradas en los principales cambios fibróticos del folículo, los que resultan en la formación de una densa cápsula alrededor del cuerpo atrésico sin participar en la fagocitosis. El destino del pigmento de melanina del oocito y el origen del pigmento oscuro en folículos atrésicos no está claro. Estas observaciones han sido descritas en muchos estudios de teleósteos y anfibios. Pareciera ser que estos pigmentos están asociados a fagocitosis del oocito y degeneración de células fagocíticas en cuerpos atrésicos avanzados (Linares-Casenave y col 2002).

En algunas especies como la trucha arco iris se ha observado atresia vinculada a apoptosis en folículos preovulatorios (Wood y van der Kraak 2001), pero no ha sido descrito en el esturión blanco. Cabe señalar que en las últimas etapas de atresia los cuerpos atrésicos compuestos de masas de células experimentan una reducción en su tamaño debido a una baja en el número de células, sugiriendo la apoptosis de células transformadas de la granulosa, lo que podría jugar un rol durante las últimas etapas de la atresia folicular en el esturión blanco (Linares-Casenave y col 2002).

En la sardina ibérica (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) se ha descrito la separación de los folículos atrésicos preovulatorios tardíos del epitelio, los cuales se concentran en la parte central de las laminillas ovígeras (Ganias y col 2007). Este patrón también ha sido observado en otros peces como la lisa (*M. cephalus*) por los autores McDonough y col (2005). Los folículos atrésicos tardíos permanecen en el ovario por largos periodos, extendiéndose incluso hasta la próxima temporada de desove. Esta separación del epitelio laminar constituye un mecanismo

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

para administrar el espacio disponible para los nuevos oocitos de la próxima temporada de desove (Ganias y col 2007).

A nivel histológico la atresia folicular tardía puede ser confundida con los folículos postovulatorios (POFs) de más de 24 horas (Macchi y col 2003, Ganias y col 2007). La duración de la degeneración de los folículos postovulatorios varía según la especie, desde menos de un día hasta más de una semana. Histológicamente estas pueden diferenciarse debido a que durante todas las etapas de la atresia folicular, el folículo está cercado dentro de estructuras celulares. Por el contrario, los POFs siempre conservan una abertura hacia el lumen ovárico y no son separados del epitelio de las laminillas, manteniéndose en el epitelio hasta completar su reabsorción (Ganias y col 2007).

En la carpita cabezona (*P. promelas*) el inicio de la atresia folicular está dada por el quiebre o aberturas del corion, posteriormente el núcleo y el material vitelino inician su degeneración, provocando la reabsorción del vitelo, lo que se distingue por una débil tinción del folículo. Leino y col (2005) reportaron la aparición de altos niveles de atresia folicular en tres gónadas de un total de veintisiete, la cual se presentó principalmente en folículos maduros, lo que indicaría que estas hembras "perdieron" su oportunidad para desovar. En cultivos experimentales de carpita cabezona (*P. promelas*) la incidencia de atresia es relativamente baja (Jensen y col 2001, Leino y col 2005), oscilando entre 1,6% a 4,6% en algunos experimentos (Leino y col 2005).

En el bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766), un pez migrador de los ríos sudamericanos, se observó la aparición de procesos de degeneración ováricos cuando éstos fueron mantenidos en confinamiento y no se indujo su reproducción durante un experimento controlado, en el cual se dividió la población en grupos que fueron muestreados histológicamente a lo largo de un periodo de tiempo. En el primer grupo se encontraron oocitos

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

en diferentes etapas de desarrollo. La atresia observada se caracterizó de forma similar a la encontrada en otras especies por hipertrofia de las células foliculares, corrugación del corion y algunas vacuolas en el ooplasma periférico. En el segundo grupo los ovarios presentaban gran cantidad de oocitos alterados, alrededor de un 10% más que en la etapa previa. Microscópicamente estos presentaban la pérdida de su forma redondeada, mostrando desorganización nuclear y citoplasmática. Su núcleo se presentó ligeramente excéntrico y a nivel citoplasmático se observaron grandes cantidades de gránulos de diferentes tamaños. Las células foliculares presentaban una hipertrofia severa, penetrando los alrededores del interior oocitario y gránulos de vitelo emergían entre las células foliculares. El corion estaba altamente corrugado y roto. En el tercer y cuarto grupo los ovarios contenían gran cantidad de oocitos perinucleares y pocos oocitos atrésicos, los cuales poseían un corion corrugado y en muchos casos completamente desintegrado. La mayor parte de los gránulos de vitelo estaban desintegrados y sólo una pequeña cantidad de vitelo permanecía en el centro del oocito. Esta etapa final marcó la completa degeneración oocitaria, con presencia de fagocitosis y vasos sanguíneos. Los eventos morfológicos observados son similares a los descritos en otras especies de peces de agua dulce nativas del Brasil. Los primeros signos de atresia ovárica y folicular aparecieron a finales de enero, coincidiendo con la caída en los valores de la temperatura del agua, días más cortos y disminución en las lluvias, lo que supondría que el estrés ambiental induce la atresia folicular en el caso de esta especie (Leonardo y col 2006). Por otra parte, en la lubina (*D. labrax*) Zanuy y col (1995) observaron un mayor número de oocitos atrésicos en individuos mantenidos en un fotoperiodo de días largos constantes y un régimen térmico alterado respecto al grupo control bajo condiciones naturales de luz y temperatura.

En la anguila de pantano (*Synbranchus marmoratus* Bloch 1795) el inicio de la atresia puede ser detectado por cambios en las células foliculares, las cuales modifican su apariencia de planas o cuboidales a una apariencia cilíndrica y vacuolada. Estas últimas participarían de forma

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

activa en el proceso de fagocitosis agrupándose en masas epitelioides en etapas avanzadas de fagocitosis. Estas estructuras atrésicas muestran una intensa fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV). Al final del proceso, las células fagocíticas, granulocitos degenerativos y remanentes foliculares permanecen juntos formando una estructura heterogénea compacta (Ravaglia y Maggese 2002).

En el "huaiquil" (*Micropogonias furnieri* desmarest, 1823) se han registrado incrementos en los porcentajes de atresia folicular, en poblaciones del estuario del Río de la Plata, en las cuales se observó un incremento en la atresia folicular, variando desde un 20% durante la primera temporada reproductiva hasta un 60% en la segunda temporada (Macchi y col 2003). Además, se observó un aumento en la presencia de oocitos atrésicos a medida que la temporada de desove progresaba, lo que coincide con lo descrito por valdebenito y col (1995) en poblaciones de esta especie del Lago Budi en el sur de Chile. Los altos niveles de atresia han sido usados para establecer el final del desove en esta especie (Macchi y col 2003).

En poblaciones silvestres de sardina monterrey (sardina española) (*Sardinops sagax* Jenyns 1842) se estimaron los porcentajes de atresia folicular, concluyéndose que un 2% puede ser considerado normal. Sin embargo, al final de la temporada este porcentaje se eleva a un 5%, lo que indica el final del máximo de puesta, aunque se ha descrito la reabsorción generalizada de los oocitos. Cuando sobre el 50% de los oocitos es afectado se denomina atresia mayor, lo que generalmente coincide con el final de la temporada de desove. Una vez alcanzado este nivel de reabsorción, se reduce la probabilidad que estas hembras desoven nuevamente. El proceso de atresia mayor es una problemática poco estudiada en poblaciones silvestres. En la sardina monterrey la atresia puede presentarse en oocitos durante los primeros estadios de desarrollo hasta en oocitos previos al desove. Las posibles causas de atresia mayor se han vinculado con condiciones de baja temperatura, problemas nutricionales, hacinamiento y

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

contaminantes. Establecer las causas de la interrupción del desarrollo ovárico es difícil. Sin embargo, se ha relacionado la atresia de folículos con vitelo en sardinas adultas con condiciones o cambios ambientales que puedan interrumpir la puesta (Torres-Villegas y col 2007). En el caso de la lubina (*D. labrax*) Zanuy y col (1995) demostraron que una manipulación inadecuada del fotoperiodo y la temperatura para alterar la época de puestas, indujo una atresia generalizada dando lugar a una drástica disminución de la fecundidad. En la sardina monterrey (*S. sagax*) la aparición de atresia en oocitos sin vitelo se asocia a factores de condición corporal subóptimos, lo que sugiere un efecto ambiental a largo plazo e inanición prolongada, ya que esta atresia se presentó principalmente en peces pequeños. El análisis histológico de la atresia folicular reveló una alta incidencia en el porcentaje de atresia de oocitos en estado de alvéolo cortical desde el inicio de la temporada reproductiva, observándose también atresia alfa y beta sin vitelo. Hacia finales de invierno e inicio de primavera se observó la presencia de atresia mayor en el 90% de las hembras, coincidiendo con el máximo de puesta de la temporada reproductiva, además de observarse atresia en oocitos en vitelogénesis avanzada (Torres-Villegas y col 2007).

En algunos peces pelágicos la frecuencia de atresia es alta de forma normal, alcanzando valores cercanos al 20% en especies como *Trachurus trachurus* (Linnaeus 1758) (Torres-Villegas y col 2007). Lee y Yang (2002) observaron la aparición de atresia folicular en alrededor de un 60% en la especie *Lateolabrax maculatus* (McClelland, 1844), la cual fue capturada desde un ambiente silvestre y posteriormente mantenida a una temperatura y horas de luz constantes, la atresia fue vinculada a una disminución de la temperatura.

Se ha postulado a la atresia como un mecanismo de reciclaje que permite recuperar componentes y energía de oocitos que no alcanzaron su desarrollo (Uribe y col 2006). Sin embargo, algunos autores postulan que la atresia sólo se trataría de un proceso de apoptosis (Torres-Villegas y col 2007). Aparentemente, el proceso de atresia se presenta como una vía

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

alternativa dentro del desarrollo del ciclo ovárico en peces, permitiendo la creación de un ambiente tisular óptimo a nivel gonadal para las futuras temporadas reproductivas. Sin embargo, este proceso se puede presentar de dos formas:

*"Normal"*, con reabsorción activa de todos los constituyentes foliculares por parte de células especializadas del folículo y estructuras ováricas adyacentes, la que se puede presentar en cualquier etapa del desarrollo oocitario, con vacuolización y licuefacción del vitelo en estados más avanzados. *"Patológica"* donde no ocurre reabsorción del contenido oocitario, la que de forma general se presenta en oocitos durante etapas de desarrollo avanzado posteriores a la vitelogénesis, produciendo un endurecimiento irreversible del vitelo que puede hipertrofiar el ovario y causar finalmente la muerte de la hembra. Esta atresia patológica se ha presentado con frecuencia en especies como el puye (*G. maculatus*) en poblaciones sometidas al estrés estando bajo condiciones de cultivo experimental. En dicha especie, los ovarios presentan un gran aumento de volumen, rompiendo incluso la pared abdominal en casos extremos, mostrándose duros al corte, lo que indicaría una alta presencia de minerales. Las causas de la atresia patológica en esta especie son aún desconocidas. Sin embargo, su incidencia es mayor en grupos mantenidos con fotoperiodos alterados, presentándose como un proceso crónico, donde aparentemente estarían involucrados procesos fisiológicos alterados del pez, tales como alteraciones inmunológicas o del balance mineral, dadas las características gonadales

La atresia folicular es un proceso multifuncional, donde los estímulos ambientales aparecen como los más relevantes y más específicamente los que hacen referencia al fotoperiodo y la temperatura.

Los cambios histológicos de la atresia a nivel folicular son muy similares entre las distintas especies estudiadas, por lo que la descripción de los caracteres anátomo-histológicos

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

de la atresia folicular realizados por diferentes autores no presenta grandes variaciones. A pesar de esto, no existe una nomenclatura clara para la descripción del proceso de atresia folicular.

La atresia folicular "normal" se presenta como un proceso estratégico establecido dentro del ciclo de desarrollo gonadal de diversas especies, el cual permite un reciclaje energético bajo condiciones adversas. Sin embargo, este proceso puede verse alterado en algunas especies.

La atresia folicular "patológica" afecta a individuos con alto nivel de estrés, en los cuales debido a factores internos no pueden mantener una adecuada homeostasis de sus procesos fisiológicos, lo que altera la ovogénesis en cualquiera de sus etapas, pudiendo llevar a la muerte de la hembra si el proceso se detiene durante la etapa final de desarrollo del oocito.

El sábalo es considerado una especie clave del ecosistema del río Paraná, debido a su régimen iliofago, su biomasa alta y sus hábitos migratorios. Por su abundancia en distintos ambientes, constituye el recurso pesquero más importante del litoral fluvial argentino, y es también un eslabón crucial para ser sostén de la cadena trófica (Espinach Ros & Fuentes, 2000).

Aunque los peces presentan estrategias reproductivas que los adaptan a condiciones ambientales variables, estas variaciones provocan cambios en algunas de sus características reproductivas. El régimen de lluvias y crecidas constituye la principal fuerza selectiva del ambiente en la modulación de la actividad reproductiva, existiendo elevado sincronismo entre las crecientes y los principales eventos del ciclo biológico (Agostinho & Julio, 1994). Como otras especies migradoras, el sábalo es particularmente vulnerable a la creciente alteración del ambiente como ser la interrupción de los circuitos utilizados, la regulación de los ríos por la construcción de las represas o los niveles de polución en aumento.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

En teleósteos, durante el proceso de desarrollo folicular se forman cíclicamente los folículos, desde primarios hasta su fase de maduración y ovulación. Sin embargo, no todos los folículos ováricos que inician su desarrollo llegan a madurar, algunos de ellos inician un proceso de degeneración y reabsorción, formando folículos atrésicos. La atresia es un proceso de degeneración y reabsorción de folículos ováricos que ocurre de manera normal en los ovarios de todos los vertebrados, incluidos los peces. Oocitos atrésicos pueden presentarse tanto en peces de vida silvestre como en los que permanecen en cautiverio (Ball, 1960; Saidapur, 1978; Leonardo et al., 2006) y pueden observarse en todos los estadios del ciclo reproductivo, aunque lo más común es observarlos durante el periodo de post-desove (Miranda et al., 1999; Guraya, 1994). En teleósteos, la atresia puede ser inducida por stress, confinamiento, feromonas, estímulos visuales y táctiles, agentes biocidas, contaminación, radiación, inanición, niveles hormonales inadecuados y cambios en las características del ambiente como luz, temperatura, corrientes de agua (Leino et al., 2005; Nagahama, 1983; Zanuy & Carrillo, 1987).

Varios autores postulan que en los últimos años se produjo una disminución de las poblaciones silvestres de sábalo (Oldani, 2006a, 2006b). La atresia esta vinculada a los índices de fertilidad ya que reduce el número de folículos que maduran. Los folículos atrésicos son importantes indicadores del impacto ambiental en los ovarios de los peces, sin embargo los mecanismos de la atresia folicular no están completamente entendidos. El aumento de la preocupación en la conservación de las especies nativas genera interés en conocer las características de todas las fases de su biología reproductiva de tal manera que se puedan detectar los cambios que podrían llevar a una posible disminución de las mismas.

En este trabajo se analizan los cambios morfológicos en ovarios de *Prochilodus lineatus* caracterizando particularmente la presencia de folículos atrésicos durante el ciclo reproductivo.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Aún cuando la atresia folicular es un fenómeno involutivo normal en los ovarios de todos los vertebrados incluidos los peces, constituyendo uno de los eventos más enigmáticos de la biología reproductiva (Hurwitz & Adashi, 1992). Los folículos atrésicos de *P. lineatus* predominaron en los meses de febrero a mayo en ejemplares con RGS inferior a 6,5%, y en estadio folicular posvitelogénico. Se señaló que la atresia puede presentarse en cualquier momento del desarrollo oocitario (Ganias et al., 2008; Leonardo et al.; Miranda et al.), sin embargo en cautividad, lo más común es que aparezca en las fases de vitelogénesis y preovulatoria (Bromage & Cumaranatunga, 1988; Linares-Casenave et al., 2002; Miranda et al.). En algunas especies, los factores más importantes que determinan el destino hacia la ovulación o la atresia de los folículos son la capacidad de respuesta a gonadotropinas, la capacidad de producir estradiol (Bao & Garverick, 1998; Braw-Tal & Roth, 2005; Garverick et al., 2002; Webb et al., 1999), la participación del sistema de factor de crecimiento insulinoide (IGF) (Rivera & Fortune, 2003a, 2003b) y el medio endocrinológico en el que se desarrollan (Webb et al.).

Los folículos atrésicos de *P. lineatus* compartieron un patrón común a nivel estructural. Se encontró disminución progresiva del diámetro folicular, fragmentación del corion y disolución del contenido citoplasmático, observándose como un proceso degenerativo paulatino e irreversible, que se extiende a todo el folículo, lo que determina la pérdida de su integridad y por lo tanto de su funcionalidad (Chedrese, 2003; Sharma, 2000).

En algunas especies la incidencia de atresia fue directamente relacionada con el tamaño de los folículos así, donde en los folículos más grandes, por presentar un índice proliferativo mayor, se tornan más susceptibles a la muerte por apoptosis y por lo tanto a la atresia (Rosales Torres & Guzmán Sánchez, 2008). En *P. lineatus* los folículos maduros tuvieron un diámetro medio de 698,45  $\mu$ , en tanto que en los folículos atrésicos detectados en el inicio del proceso era de 565  $\mu$ .

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

El primer signo de atresia descrito a nivel microscópico es la desintegración del núcleo del oocito seguido de la fragmentación de la zona pelúcida (Lowerre-Barbieri et al., 1996; Mylonas et al., 1997). El primer evento observado en el sábalo fue la presencia de ondulaciones del corion, que coincide con la fase alfa descrita en *Chaetodon multicinctus* (Tricas & Hiramoto, 1989).

Los gránulos de vitelo perdieron su individualidad y las células de la granulosa se hipertrofiaron. Estas modificaciones fueron descritas por algunos autores que además observaron hipertrofia de células tecales (Linares-Casenave et al.; Nagahama). En *P. lineatus* no se observaron células tecales hipertróficas, lo que coincide con el escaso desarrollo celular descrito en *L. taeniatus* (Santos et al., 2008).

La caracterización del proceso de atresia realizada por diferentes autores, en especies diferentes y con distintos criterios, explica la falta de unificación de la nomenclatura (Khoo, 1975; Rutaisire & Booth, 2004; Santos et al.). Algunos autores describen las etapas de la atresia folicular en base a los datos morfológicos (Bretschneider & Duyvene de Wit, 1947), mientras que otros separan los folículos atrésicos en hipertróficos y no hipertróficos (Uribe Aranzábal et al., 2006).

En *P. lineatus* los elementos constitutivos del folículo, teca, células foliculares, corion y oocito, fueron desapareciendo gradualmente. Los cambios vasculares a nivel de la teca que fueron observados en algunas especies (Linares-Casenave et al.; Santos et al.) resultaron prácticamente imperceptibles, sin embargo se observó escasa infiltración linfoplasmocitaria periférica, indicando una relación con el sistema inmune, detalle observado en otros vertebrados (Santos et al.).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La última etapa del proceso de atresia se caracteriza por la presencia de componentes residuales luego de la reabsorción de vitelo y citoplasma. Algunos trabajos expresan que la duración del proceso de atresia es más reducida en especies que en forma similar al sábalo tienen estrategia reproductiva de puesta total (Miranda et al.). Los cuerpos atrésicos multicelulares fueron encontrados en las distintas muestras de *P. lineatus* durante los sucesivos muestreos, observándose que los cuerpos formados en esta etapa persisten en el ovario por muchos meses. Por sus características morfológicas fueron relacionados inicialmente con la biosíntesis de esteroides (Hoar, 1969), aunque otros trabajos no hallaron evidencias de la secreción hormonal (Leonardo et al.; Linares-Casenave et al.).

Como en otras especies, en *P. lineatus* se observan gránulos oscuros dentro y fuera del citoplasma de las células foliculares. Algunos autores identificaron el origen del pigmento oscuro contenido en los folículos atrésicos como lipofucsina, residuo del proceso de digestión del vitelo, corion y orgánulos. Fue señalado que, mediante la atresia, la remoción de los ovocitos que no alcanzaron su desarrollo permite recuperar parte de la energía y los componentes invertidos durante la maduración folicular (Blazer, 2002; Miranda et al.; Norris, 1997; Saidapur ).

La estructura de los folículos atrésicos muestra reducción gradual del tamaño. Al parecer las células tecales están involucradas en los principales cambios fibróticos del folículo, los que resultan en la formación de una densa cápsula alrededor del cuerpo atrésico (Rutaisire & Booth). La reducción en el tamaño se relaciona con un proceso de apoptosis de las células transformadas de la granulosa, lo que provoca una disminución en el número de células (Linares-Casenave et al.). La presencia de núcleos picnóticos y cariorrexis en las células de la granulosa y teca de folículos atrésicos (Bao & Garverick; Saidapur), así como la fragmentación internucleosomal del ADN en estas células, permitieron conocer que la apoptosis es el tipo de muerte preponderante en la atresia (Santos et al.; Sharma) aunque no el único (Nagahama).

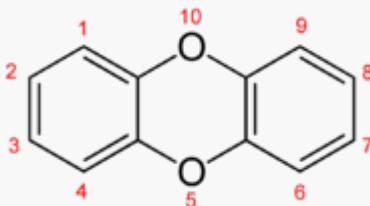
## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Algunos autores postularon que en esta etapa las células tecales se podrían diferenciar en nuevas células oogoniales (Khoo).

Dado que los folículos atrésicos pueden ser utilizados como importantes indicadores del impacto ambiental en los ovarios de los peces, en este trabajo las características morfológicas de los folículos atrésicos de *P. lineatus* se correspondieron con un proceso degenerativo que tuvo su mayor frecuencia en las gónadas de ejemplares en el final del ciclo reproductivo, con RGS baja. Tampoco se pueden establecer vínculos entre la atresia observada en *P. lineatus* con algún proceso patológico que conduzca a la disminución de la especie en el ecosistema del Paraná.

La presencia de atresia tipo II, de alta prevalencia encontrada en algunas poblaciones de *Labeo victorianus*, se caracterizó por el quiebre de los glóbulos vitelinos en gránulos más pequeños, degeneración vacuolar del citoplasma, presencia de corion intacto, sin detectarse signos de fagocitosis. Este es el tipo de atresia relacionada con una falla o interrupción en el desove (Rutaisire & Booth). Este cambio no fue observado como un evento definido en las gónadas de *P. lineatus* capturados, aunque si pudieron encontrarse escasos folículos atravesando este proceso.

*Para otros usos de este término, véase [2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina](#).*



La fórmula estructural y esquema de numeración de sustituyentes del compuesto principal de dibenzo-*p*-dioxina.

Las dioxinas son compuestos químicos obtenidos a partir de procesos de combustión que implican al cloro.<sup>1</sup> El término se aplica indistintamente a las policlorodibenzofuranos (PCDF) y las policlorodibenzodioxinas (PCDD).

Las dioxinas son un grupo de compuestos químicos que son contaminantes ambientales persistentes. Las dioxinas se encuentran en el medio ambiente por todo el mundo y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en el tejido adiposo de los animales.

En los alimentos están presentes en forma de *trazas*, es decir en cantidades del orden del nanogramo y del picogramo por kilogramo,

Las dioxinas se han hecho muy conocidas en los últimos años porque preocupa su presencia en el medio ambiente ya que se encuentran en muchos lugares, aunque en bajas concentraciones, y algunas de ellas son extremadamente tóxicas.<sup>3</sup> Junto con las dioxinas se suelen encontrar furanos que son unos compuestos químicos similares.

Las dioxinas son fundamentalmente subproductos de procesos industriales, pero también pueden producirse en procesos naturales como las erupciones volcánicas y los incendios forestales. Las dioxinas son subproductos no deseados de numerosos procesos de fabricación tales como la fundición, el blanqueo de la pasta de papel con cloro o la fabricación de algunos herbicidas y plaguicidas. En cuanto a la liberación de dioxinas al medio ambiente, la incineración descontrolada de desechos (sólidos y hospitalarios) suele ser la causa más grave, dado que la combustión es incompleta. Existe tecnología que permite la incineración controlada de desechos con bajas emisiones.<sup>4</sup>

Las dioxinas no se fabrican deliberadamente, excepto en pequeñas cantidades para trabajos de investigación.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Hay varios cientos de dioxinas y furanos. Una simple dosis de 6 millonésimas de gramo de la dioxina más letal, la 2,3,7,8-TCDD, puede matar a una rata. Todavía no se sabe bien cómo afectan a los humanos estas sustancias. Se ha podido observar la acción de estos compuestos cuando alguna persona ha quedado expuesta por accidente a ellas, pero en estos casos sólo se puede conocer la dosis que han recibido muy aproximadamente. Por esto es arriesgado pronunciarse sobre los efectos que producen las distintas dosis, especialmente cuando hablamos de contacto con estas sustancias durante periodos de tiempo largos.

La dioxina 2,4,5-T es uno de los componentes del Agente Naranja, arma química utilizada por Estados Unidos en la Guerra de Vietnam.

### *Efectos en humanos y en el medio ambiente*

---

Las dioxinas tienen elevada toxicidad y pueden provocar problemas de reproducción y desarrollo, afectar el sistema inmunitario, interferir con hormonas y, de ese modo, causar cáncer.<sup>5</sup> Cuando algunas personas han estado expuestas a altas concentraciones de 2,3,7,8-TCDD han tenido cloracné, con efectos que puede durar décadas eliminar.

Recientemente se ha encontrado una asociación de las dioxinas con la génesis de la endometriosis<sup>6</sup>, una enfermedad ginecológica caracterizada por el crecimiento del tejido endometrial por fuera de la cavidad uterina y que puede ocasionar dolor pélvico, dismenorrea o dolor menstrual e infertilidad.

A bastantes investigadores <sup>[cita requerida]</sup> les preocupan más los efectos que a largo plazo pueden darse en personas expuestas a dosis muy bajas, que no provocan efectos apreciables a corto plazo. El problema con este tipo de sustancias es que no se eliminan con facilidad (tardan cinco años en reducirse a la mitad <sup>[cita requerida]</sup> ni se degradan y, por tanto, van acumulándose en

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

los tejidos. En experimentos de laboratorio con animales se ha comprobado que dosis no letales pueden producir cáncer, defectos de nacimiento, reducción en la fertilidad y cambios en el sistema inmunológico.

### Efectos cancerígenos

La mayoría de los estudios que se han hecho con personas expuestas a estos productos no han encontrado que tengan más probabilidad de tener cáncer que los demás. Aunque existen estudios realizados y expuestos en la Occupational & Environmental Medicine que atribuyen, con seguimiento de 23 años después de cerrada una planta química en Hamburgo, y concluyen que mortandad de sus trabajadores por cáncer tiene su origen a la exposición de estos compuestos PCDD/F. Un estudio hecho por investigadores suecos encontró proporciones anormalmente altas de un extraño tipo de cáncer entre personas que trabajaban con herbicidas que contenían muy pequeñas cantidades de 2,3,7,8-TCDD. Pero estudios similares en otros países [\[cita requerida\]](#) no han confirmado este resultado. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos considera el estudio de los investigadores suecos como una evidencia importante pero no adecuada de que estos productos producen cáncer en humanos. De todas formas recomienda [\[cita requerida\]](#) que se tenga a esa sustancia como probablemente cancerígena ya que produce cáncer en animales en los experimentos de laboratorio.

### Efectos en la reproducción sexual

Las dioxinas y los furanos también reducen el éxito reproductivo en los animales de laboratorio al provocar nacimientos de bajo peso, camadas más pequeñas y abortos prematuros [\[cita requerida\]](#). Los problemas sólo suceden cuando es la madre la expuesta al 2,3,7,8-TCDD, nunca cuando es el macho, lo que demuestra que no se produce alteración del ADN, sino alteraciones en el proceso de formación del embrión.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

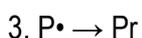
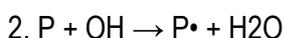
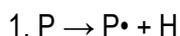
Se han hecho muchos estudios sobre defectos de nacimiento entre mujeres expuestas al 2,3,7,8-TCDD. Algunos han encontrado un número de nacimientos defectuoso mayor que el normal, pero en la mayoría de las investigaciones no se han encontrado evidencias de defectos de nacimiento o problemas reproductivos por este motivo.

Por lo que sabemos hasta ahora, con estudios minuciosos y detallados, las personas que han recibido dosis anormalmente altas de estas sustancias mantienen una salud normal. Todo indica que el hombre soporta estas sustancias mucho mejor que la mayoría de los animales de laboratorio. También es claro que trazas (concentraciones muy bajas, casi inapreciables) de estas sustancias se han encontrado en tejidos y en la leche materna de personas de muchos países; pero no se puede afirmar nada con seguridad sobre los efectos a largo plazo que esta contaminación puede suponer hasta la realización de nuevos y más detallados estudios.

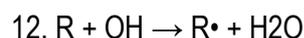
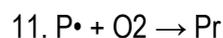
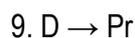
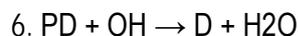
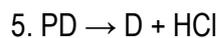
### *Mecanismos de formación*

---

Las dioxinas proceden principalmente de las emisiones de incineradores y otras fuentes de combustión. Su formación se produce como consecuencia de procesos químicos que ocurren durante la combustión, principalmente a partir de compuestos químicos relacionados como clorobenzenos, clorofenoles y policloruros de bifenilo. Debido a la elevada toxicidad de las dioxinas, se han realizado numerosos estudios sobre sus mecanismos de formación, ya que este conocimiento es de vital importancia a la hora de estudiar posibles procesos para su degradación. Se ha propuesto un mecanismo en fase gas que transcurre mediante una serie de reacciones radicalarias:



## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA



Donde P son fenoles policlorados, P• son radicales fenoxi policlorados, PD son 2-fenoxifenoles policlorados (precursores de las dioxinas), D son PCDDs, R es algún componente del combustible orgánico, R• es una molécula del combustible sin un átomo de hidrógeno y Pr son productos sin especificar.

La formación de dioxinas en fase gas sólo explicaría una parte del contenido total de estos compuestos encontrados en las emisiones de los procesos de combustión, por lo que también se ha propuesto un mecanismo basado en una catálisis heterogénea. Se sugiere que un mecanismo de Langmuir-Hinshelwood, que implica reacciones radical-radicales superficiales, y un mecanismo de Eley-Rideal, que implica reacciones entre una molécula en fase gas y otra adsorbida, son los responsables de la formación de PCDFs y PCDDs, respectivamente, en superficies. Las principales diferencias de este mecanismo con el mecanismo en fase gas es la formación del radical fenoxi clorado por el impacto de quimisorción del fenol policlorado en la superficie catalítica (normalmente óxidos metálicos como CuO) y el impedimento estérico de

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

radicales centrados en el oxígeno adsorbidos en la superficie, que inhiben reacciones radical-radical que llevan a la formación de dibenzo-p-dioxina.

Este tipo de reacciones son muy complejas y difíciles de estudiar, ya que los radicales que intervienen en ellas son extremadamente reactivos. Además, la variabilidad del material orgánico incinerado y el amplio rango de tecnologías de combustión hacen su estudio todavía más complejo. Por ello, el mecanismo preciso de la formación de dioxinas aún no está del todo claro, aunque existen varias teorías en desarrollo.

Es importante mencionar que también se pueden encontrar estudios sobre posibles mecanismos para la inhibición de estas reacciones, los cuales sugieren que la presencia de algunos compuestos básicos como amoníaco, óxido de calcio o hidróxido sódico inhiben la formación de PCDDs y PCDFs a partir de fenoles y bencenos clorados con eficacias de hasta el 99%.

La presencia de las dioxinas en el ambiente es consecuencia de actividades antropogénicas. Inevitablemente, restos de las dioxinas son emitidos directamente al agua, al sedimento/suelo y a la atmósfera desde instalaciones industriales. De la cantidad emitida, de las características físicas (especialmente la solubilidad de agua, la presión de vapor, la constante de Henry, y el coeficiente de partición del octanol-agua) del riesgo ambiental y de la biodegradabilidad del BPA dependerá la distribución de éste en el medioambiente (Wen-Tien, 2006).

### Contaminación acuática

Aunque las dioxinas sea un material fácilmente biodegradable y altamente tratable en depuradoras de aguas residuales bien diseñadas, se detecta en efluentes de muchas aguas residuales industriales (Wen-Tien, 2006) debido a que no es eliminado totalmente durante el tratamiento. Estas aguas residuales que contienen dioxinas pueden ser una fuente de contaminación del ambiente acuático (Staples et al., 1998; Furhacker et al., 2000). Lee y Peart (2000) demostraron que el dioxinas en aguas residuales se redujo tras su paso por plantas de tratamiento de un 37 a un 94%. Recientemente, se identificaron altos niveles de dioxinas en los residuos de un vertedero (Yamada et al., 1999; Behnisch et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Filho et al., 2003), con niveles de dioxinas en estos peligrosos efluentes de 1,3 a 17.200 ng/ml (con una media de 269 ng/ml). Yamada et al (1999) encontraron en cuatro vertederos unos niveles de BPA de 15 a 5.400 ng/ml y observaron que tras el tratamiento en diversas plantas depuradoras se pasó a niveles de 0,5 a 5,1 ng/ml. A pesar de esta reducción, los niveles de dioxinas pueden contaminar el ambiente acuático (Yamada et al., 1999; Behnisch et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Filho et al., 2003).

Las dioxinas en aguas fluviales puede degradarse bajo condiciones aerobias (Ike et al., 2000; Klecka et al., 2001; Kang y Kondo., 2002a), pero no bajo condiciones anaerobias (Kang y Kondo, 2002b). Recientemente, Kang y Kondo (2002a) encontraron que la mayoría de las bacterias (10 de 11 bacterias) aisladas a partir de 3 aguas fluviales podían biodegradar el BPA, pero con diferencias en el ratio de eliminación de las dioxinas (18-91%) y, solamente dos cepas de *Pseudomonas* demostraron alta biodegradabilidad.

Puede persistir más tiempo en agua de mar que en agua fluvial sin ninguna degradación (cerca de 30 días) y la posibilidad de contaminación con las dioxinas en un mamífero marino

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

puede ser más alta que en un organismo de agua dulce (Ying y Kookana, 2003; Kang y Kondo, 2005). El equipo de Basheer divulgó que la concentración de BPA en mariscos (gamba, cangrejo, berberecho, almeja blanca, calamar y pescado) de un supermercado de Singapur oscilaba entre 13,3 y 213,1 ng/g (Basheer et al., 2004). Por lo tanto, en el ambiente acuático, el consumo de peces de agua dulce o mariscos contaminados por las dioxinas podría ser una ruta importante de contaminación para los seres humanos.

Las emisiones anuales de las dioxinas publicadas en el inventario de emisiones tóxicas (TRI) para la Unión Europea (con resultados similares para los E.E.U.U.) incluyen 85.300 kilogramos de emisiones al aire, 3500 kilogramos directamente al agua, 1100 kilogramos que son eliminados en un 90% en instalaciones de tratamiento, y 10000 kilogramos adicionales al agua asumiendo similares mezclas de fuentes. Estas incluyen el papel de fax, migración de productos de la polimerización y otras pérdidas de los vertederos, residuos de tuberías, otros materiales desechados que no son depositados en vertederos y formación de polvo (Cousins et al., 2009).

### Descripción del modelo EQC (criterio en el equilibrio)

Para el análisis de evaluación de las características del comportamiento del químico en el ambiente, es decir, en cuyos medios el producto químico tenderá a repartirse, los mecanismos primarios de pérdida, su tendencia al transporte, a la bioacumulación, y su persistencia ambiental; se utilizó el modelo EQC (Mackay et al., 1996), en forma de programa de ordenador,

que deduce el destino de un producto químico en el ambiente a 3 niveles I, II, e III, usando un área de 100.000 km<sup>2</sup>.

### Efectos de las dioxinas en la vida salvaje

Anualmente en el mundo, unas 100 toneladas de las dioxinas son liberadas al medioambiente durante el proceso de fabricación, manejo y transporte de las dioxinas (Vandenberg et al., 2009). Por ello, se están realizando múltiples estudios en la fauna salvaje, con el objetivo de evaluar el impacto ecológico de las dioxinas en el medioambiente.

Los efectos disruptores endocrinos de las dioxinas identificados en la fauna incluyen (1) la alteración de la determinación del sexo en la exposición durante la organogénesis gonadal, (2) alteración de la función gonadal, durante y después de la organogénesis gonadal e (3) inducción de la producción hepática de vitelogenina (VTG) (Crain et al., 2007).

### Determinación del sexo

En animales con determinación del sexo temperatura-dependiente (TSD), esta determinación es particularmente susceptible a las perturbaciones ambientales. Por ello, los contaminantes con potencial disruptor endocrino han influido en la determinación del sexo en especies TSD desde la Revolución Industrial (Crain et al., 1998). La exposición del huevo a las dioxinas en los cocodriloideos *Caiman latirostris* a concentraciones de 140 ppm durante el momento crítico de la determinación del género (etapa 20 de la embriogénesis), hizo que todos los cocodrilos descendientes fuesen hembras sin importar la temperatura de incubación (Stoker et al., 2003). Todos los embriones de caimán expuestos a las dioxinas eran feminizados, teniendo ovarios al parecer normales.

En algunos pájaros, la presencia de 200 ppm de las dioxinas en la yema de huevo causó anomalías en el conducto de Müller en codornices hembras, mientras que la misma concentración en la yema de huevo causó feminización del testículo izquierdo en embriones de pollo machos (Berg et al., 2001).

La diferenciación del sexo se puede también alterar en el zebrafish (*Danio rerio*) expuesto a las dioxinas durante el período de desarrollo embrionario asociado a la ontogenia gonadal. Peces alimentados con dosis altas de 2000 mg/kg de las dioxinas tenían cocientes de sexo anormales de 11,5:1 (Drastichova et al., 2005). Ambientalmente, unos niveles relevantes de las dioxinas pueden contribuir a una reversión del sexo. Por ejemplo, barbos encontrados río abajo de una fuente de contaminación de BPA tenían una alta incidencia de intersexualidad (30-50%),

mientras que éstos mismos barbos intersexuales no se encontraron corriente abajo en un afluente de este río contaminado (Vigano et al., 2006). Estos peces feminizados presentaban gónadas que contenían sobre todo oogonias primarias y oocitos previtelogénicos, pero también incluían espermatogonias, espermatocitos, y espermátidas.

### Alteración de la función gonadal y características sexuales secundarias

Considerando que altas concentraciones de las dioxinas causan una determinación anormal del sexo en algunos peces, anfibios, reptiles y pájaros, concentraciones más bajas causan alteraciones en la función gonadal en un variado número de vertebrados.

Por ejemplo, concentraciones de las dioxinas encontradas comúnmente en el medioambiente, tienen el potencial para alterar la estructura y la función testiculares en los peces. Cuando machos de fathead minnow (*Pimephales promelas*) fueron expuestos a 16 µg/l o a concentraciones más altas de las dioxinas, sus testículos redujeron perceptiblemente el número de espermatocitos maduros e incrementaron significativamente el número de espermatozoides en estadios inmaduros en los túbulos seminíferos (Sohoni et al., 2001). De forma semejante, el recuento de espermatozoides se redujo perceptiblemente en guppies (*Poecilia reticulata*) machos expuestos a 274 µg/l de las dioxinas durante 21 días, aunque la cantidad de esperma no se vio afectada (Haubruge et al., 2000). Lahnsteiner *et al.* (2005) expusieron a truchas de ambos sexos a las dioxinas antes y durante el desove, e investigaron los efectos sobre los huevos, además de la maduración, cantidad y calidad del semen. El BPA fue añadido en un sistema de flujo continuo a concentraciones de 1,75 µg/l, 2,4 µg/l y 5 µg/l. La calidad del semen fue más baja a concentraciones de 1,75 µg/l y 2,4

$\mu\text{g/l}$  comparada con los controles (reducida densidad espermática, ratio de movilidad y velocidad de desplazamiento). El porcentaje de hembras ovuladas fue similar en el grupo control y en los dos grupos expuestos a las concentraciones más bajas; sin embargo, las hembras del grupo que eran expuestas a las concentraciones más altas no ovularon y ésta se retrasó unas 2 semanas en el grupo expuesto a  $1,75 \mu\text{g/l}$  y 3 semanas en el expuesto a  $2,4 \mu\text{g/l}$  por grupo. Mandich en su estudio utilizó carpas las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de BPA (1, 10, 100 y  $1000 \mu\text{g/l}$ ). En la carpa macho las dioxinas causó severas alteraciones de los testículos desde la concentración más baja, con pérdida de la típica estructura lobular, con espermatozoides libres degenerados dentro de la luz de los conductos espermatogénicos. En las hembras se pudo ver atresia de oocitos desde la concentración de  $1 \mu\text{g/l}$ , llegando a estar presente en el 57,1% de las hembras en la concentración de  $1000 \mu\text{g/l}$ . A esta misma concentración, el 27% de las hembras demostraron intersexualidad (Mandich et al., 2007).

### Producción de VTG

La VTG es una proteína precursora de la formación del huevo y es común para todas las hembras ovíparas vertebradas. Esta fosfogliproteína es producida por el hígado en respuesta a estrógenos circulantes. Normalmente, los machos no sintetizan VTG, pero sus hepatocitos pueden producirla y liberarla si son expuestos a estrógenos. La presencia de VTG en la sangre ha sido usada ampliamente como biomarcador para la exposición a tóxicos estrogénicos (Crain et al., 2007).

### Peces

Numerosos estudios han demostrado que peces macho capturados río abajo de depuradoras de aguas residuales tenían elevadas concentraciones de VTG en el suero (Folmar et al., 1996; Vermeirssen et al., 2005; Bjerregaard et al., 2006) Estas elevaciones no sólo se atribuyen las dioxinas sino también a etinilestradiol y nonilfenol presentes en los efluentes de estas aguas residuales.

Varias especies de peces (fathead minnow, medaka, trucha arco iris y zebrafish) se han expuesto solamente las dioxinas en condiciones controladas de laboratorio encontrándose un incremento de las cantidades de VTG aunque a concentraciones mayores que las medidas en las aguas superficiales. Mandich en su estudio con carpas, observó un incremento significativo de las concentraciones de VTG plasmáticas en las hembras a dosis de 1000 µg/l. Además, a dosis ambientales de BPA de 1 y 10 µg/l, un creciente número de machos mostraron sensibilidad a la VTG (Mandich et al., 2007).

En otro estudio, Van den Belt, expuso a zebrafish y trucha arco iris a dosis de 40, 200 y 1000 µg/l de dioxina, encontrando un incremento significativo de las concentraciones de VTG plasmática en respuesta a la exposición a 1000 µg/l de BPA (Van den Belt et al., 2003).

### Invertebrados

Los moluscos son usados generalmente como centinelas de ambientes acuáticos, y pueden ser organismos sensibles las dioxinas debido a un incremento de su exposición (inmóvilidad y alimentación por filtrado). Mejillones azules de agua dulce (*Mytilus edulis*) hembras, expuestas a 50 µg/l de las dioxinas durante 3 semanas mostraron elevados niveles de VTG (Aarab et al., 2006).

### FUENTES DE EXPOSICIÓN

Cada año, se utilizan más de 2 millones de toneladas de dioxinas en la fabricación de una gran variedad de productos domésticos (Le et al., 2008; Vandenberg et al., 2009). El BPA está presente en los envases de alimento de policarbonato plástico y de bebida, los biberones, así como en el recubrimiento de las latas de bebida y de alimento, o en los sellantes dentales utilizados en odontología (vom Saal y Myers, 2008).

La exposición humana a las las dioxinas es extensa como se ha comprobado en el análisis de muestras de orina humana (Matsumoto et al., 2003; Yang et al., 2003; Calafat et al., 2005; Kawaguchi et al., 2005; Liu et al., 2005; Ye et al., 2005). Calafat et al (2005) observaron las dioxinas en el 95% de las muestras de orina ( $\geq 0,1$  ng/ml) recogidas a 394 adultos de diversas edades, lugares de residencia y sexo. Varios estudios sugirieron que esos niveles de las dioxinas en orina estaban correlacionados con el consumo de alimentos conservados (Inoue et al., 2003; Matsumoto et al., 2003; Yang et al., 2003).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Aunque el consumo diario de las dioxinas en humanos puede ser considerablemente menor que las referencias de ingesta diaria tolerable, o los niveles de migración de la dioxina menores que los límites fijados por las diferentes agencias y países, varios estudios han sugerido un efecto endocrino adverso para las dioxinas a dosis de sólo 0,025-0,2 µg/kg/día tales como disminución de la producción diaria de esperma e infertilidad en varones a dosis de 0,2 g/kg/día (vom Saal et al., 1998; Chitra et al., 2003), estímulo del desarrollo de la glándula mamaria a dosis de 0,025 g/kg/día (Markey et al., 2001), una disminución de enzimas antioxidantes a 0,2 g/kg/día (Chitra et al., 2003) y alteraciones persistentes en el desarrollo peripuberal de la glándula mamaria a dosis de 0,025-0,25 g/kg/día (Muñoz del Toro et al., 2005).

Las rutas posibles de exposición para los miembros de la población en general se pueden dividir en (1) la exposición ambiental directa e indirecta debido a la liberación de las dioxinas durante su producción, uso, y disposición; (2) exposición a través de los envases al alimento; y (3) el contacto con o la inhalación de productos de consumo no en contacto con el alimento.

Según el Programa Nacional de Toxicología, la exposición de las dioxinas es probablemente casi exclusiva a través del alimento (National Toxicology Program, 2007). Por ejemplo, Wilson et al., (2007) examinaron la exposición a las dioxinas y a otros fenoles en 275 niños de 1,5-5 años de edad, concluyendo que el 99% de la exposición al BPA era dietética basándose en medidas de los niveles de las dioxinas de una variedad de fuentes tales como el alimento, el aire, y el polvo de sus hogares. Miyamoto y Kotake (2006) concluyeron que el 95% de las dioxinas en el varón adulto era procedente del alimento y de la bebida, exceptuando el agua.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Las medidas y el conocimiento ambiental de las características las dioxinas sugieren que las fuentes ambientales de exposición de dioxina no contribuyen perceptiblemente a la exposición de la población total (European Union Risk Assessment, 2003). Así, la mayor preocupación está puesta sobre la exposición a través del alimento (National Toxicology Program, 2007) particularmente en los niños que pueden ser expuestos por migración de dioxina a la leche en los biberones de policarbonato y la migración de las dioxinas en fórmulas alimenticias infantiles a través de las capas de resina epoxi de los envases que contienen el alimento (Kamrin et al, 2004). En fórmulas infantiles consumidas por los niños (listas para utilizar, en concentrado o en polvo), Environment Canada apoya la conclusión de que la migración de la dioxina es significativa sólo para las fórmulas infantiles líquidas (Environment Canada, 2008).

Además de fuentes comerciales de alimento, los niños consumen la leche materna. Calafat et al (2005) publicaron una concentración media de las dioxinas de 1,4 µg/l en la leche a partir de 32 mujeres. Ye et al (2005) encontraron concentraciones de las dioxinas en muestras de leche a partir de 18 mujeres lactantes, las dioxinas libre se encontró en las muestras de 12 de esas 18 mujeres. La concentración total media de las dioxinas en la leche era de 1,1 µg/l. Sun et al (2004) también midieron concentraciones del las dioxinas en leche a partir de 23 mujeres japonesas lactantes sanas. Las concentraciones de las dioxinas se encontraban entre 0,28 a 0,97 µg/l, con una concentración media de 0,61 µg/l.

### Migración de las dioxinas de las superficies de recubrimiento de las latas

La dioxina se ha detectado en los vegetales en conserva, bebidas en latas, productos conservados de pescado y carne, productos lácteos conservados y fórmulas infantiles (Kang et al., 2006).

Los principales factores que influyen en la migración de las dioxinas de los envases a los alimentos son el tiempo de almacenamiento y la temperatura de calentamiento utilizados en el proceso de fabricación (Kawamura et al., 1999, 2001; Munguía-López y Soto-Valdez, 2001; Goodson et al., 2002; Takao et al., 2002; Kang et al., 2003; Munguía-López et al., 2005). Munguía-López y Soto-Valdez (2001) en México, encontraron las dioxinas en las latas de atún y de jalapeño a la pimienta en supermercados a concentraciones de 82 y 2 ng/g, respectivamente, a temperatura y tiempo similar (90 minutos a 121 °C el atún y 90 minutos a 100 °C el jalapeño).

Kawamura también encontró niveles de migración de las dioxinas dentro del líquido de latas de 2 empresas diferentes tras el calentamiento a 120 °C durante 10 y 60 minutos (64 y 87 ng/ml respectivamente para las latas de una empresa y 99 y 166 ng/ml, respectivamente, para las latas de otra empresa) (Kawamura et al., 2001).

En otros recientes estudios (Kang et al., 2006) sobre muestras de agua, observaron que la temperatura tenía más efecto sobre la migración de las dioxinas de las latas que el tiempo de

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

calentamiento. Los niveles de migración del BPA para el agua fueron de 1 ng/ml tras el calentamiento a 105 °C durante 30 minutos y 5 ng/ml después de calentar a 121 °C durante 30 minutos. Sin embargo para latas calentadas a 121 °C, el nivel de migración de la dioxina (6 ng/ml) tras 60 minutos de calentamiento era similar a los 5 ng/ml de migración alcanzados tras calentar esas latas durante 15 y 30 minutos a 121°C.

La migración de las dioxinas también puede verse afectada por el tiempo de almacenamiento (Munguía-López y Soto-Valdez., 2001; Yoshida et al., 2001; Munguía-López et al., 2002, 2005), aumentando ésta migración. Sin embargo, otros autores sugirieron que el nivel de las dioxinas no cambia en tiempos de almacenamientos largos (hasta 9 meses) (Goodson et al., 2004). También se observó que cuando las latas eran calentadas a 121 °C en presencia de cloruro sódico al 5-10% o en presencia de aceites, la migración del BPA en las latas aumentó enormemente (> 10 ng/ml) (Kang et al., 2003).

### Migración de las dioxinas de los plásticos

Estudios de laboratorio han demostrado que las dioxinas biológicamente activo es liberado por las botellas de policarbonato después de un uso normal (Brede et al., 2003; Le et al., 2008). La migración de pequeñas cantidades de las dioxinas a través del uso repetido de los envases de policarbonato tales como biberones, botellas de consumo o jarras pueden contribuir a la exposición oral (Environment Canada, 2008). Se han publicado numerosos estudios sobre la migración de las dioxinas de las botellas de policarbonato bajo diversas condiciones (Mountfort

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

et al., 1997; Takao et al., 1999; Brede et al., 2003; Howdeshell et al., 2003; Miyamoto y Kotake, 2006; Maragou et al., 2008; Cao y Corriveau, 2008; Ehlert et al., 2008; Le et al., 2008).

Un estudio encontró que las concentraciones de las dioxinas liberadas de biberones nuevos o poco usados de policarbonato eran de 1 a 3,5 ppb y de 1 a 6,5 ppb respectivamente, pero eran de 10 a 28 ppb en biberones muy usados y deteriorados (Takao et al., 1999). De forma similar, después de la incubación en agua a 100 °C durante 1 hora, la cantidad de las dioxinas que migra de biberones sujetos a un uso simulado (lavado en lavavajillas, cepillado y hervido) excedió la cantidad que había migrado de los biberones nuevos (Brede et al., 2003).

Cao y Corriveau (2008) probaron cinco botellas de policarbonato, tres biberones y dos botellas de consumo recargables. Las concentraciones de las dioxinas en el agua se elevaron desde 1,7 a 4,1 µg/l. Además, la EFSA (2006) resume dos estudios llevados a cabo en biberones disponibles en el mercado, realizados de forma experimental diseñados para representar unas condiciones reales de uso, obteniendo concentraciones de hasta 50 µg/l de las dioxinas..

Los altos niveles de migración de las dioxinas de los envases utilizados de policarbonato comparados con envases nuevos, se debe a la degradación del polímero. Los acoplamientos del carbonato son estables, pero el calentamiento y el contacto con compuestos ácidos o básicos acelera la hidrólisis del enlace éster que une las moléculas de las dioxinas en el policarbonato plástico y las resinas epoxi (vom Saal y Hugues, 2005). El calor, tal como ocurre en la pasteurización, en la esterilización o el calentamiento al microondas, así como el proceso

de lavado y cepillado o el almacenamiento de los envases, da lugar a una migración creciente de las dioxinas desde los envases al alimento (Erler et al., 2010).

Exposición ocupacional.

La exposición ocupacional a las dioxinas podría ocurrir potencialmente durante su fabricación, en la producción de plásticos de policarbonato, y durante la fabricación o el uso de las resinas epoxi, pinturas o lacas (European Union Risk Assessment, 2003). Según la Unión Europea.

La Unión Europea resumió los datos de la exposición ocupacional para las dioxinas en Europa y en E.E.U.U. La Unión Europea indicó que las exposiciones a las dioxinas estaban por debajo de 5 mg/m<sup>3</sup>. Las exposiciones diarias más elevadas fueron observadas en la fabricación del BPA. Hay información limitada sobre la exposición a las dioxinas a corto plazo. En la fabricación de las dioxinas se han publicado exposiciones a corto plazo a partir de 0,13-9,5 mg/m<sup>3</sup> (European Union Risk Assessment, 2003).

En relación a la exposición por contacto con las dioxinas, el principal peligro para la salud son las dermatitis alérgicas de contacto (ACD), a través de un mecanismo aún desconocido (Tarvainen y Kanerva, 1999). La mayoría de las ACD ocurren en trabajadores que tratan con productos basados en el BPA, tales como trabajadores de productos plásticos,

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

expuestos a cintas adhesivas epoxi... (Jolanki et al., 1995; Kanerva et al., 2000, 2002). Los síntomas en la piel por las ACD ocupacionales causadas por las dioxinas o productos relacionados suelen aparecer en las manos, aunque también en otras áreas de la piel expuestas, tales como las piernas y la cara. La ACD puede ser más severa si la exposición al agente causante es duradera (Jolanki et al., 1995; Tarvainen y Kanerva, 1999; Kanerva et al., 2000, 2002).

## CINÉTICA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS DIOXINAS

### Cinética

El primer estudio acerca del metabolismo de las dioxinas se llevó a cabo en 1966 en ratas de la cepa ELIAS, utilizando una dosis oral de BPA de 800 mg/kg (Knaak y Sullivan, 1966), donde los mayores compuestos identificados en las heces de las ratas fueron las dioxinas no conjugado y su ácido glucurónico conjugado. La orina también fue una importante ruta de excreción y principalmente contenía el glucurónico conjugado. Los mismos autores también observaron la formación de un metabolito hidroxilado de las dioxinas. Se acepta que el glucurónico conjugado es el mayor metabolito *in vivo* (Miyakoda et al., 2000; Pottenger et al., 2000; Snyder et al., 2000) e *in vitro* (Yokota et al., 1999; Elsby et al., 2001; Nakagawa et al., 2000, 2001) de la dioxina incluyendo estudios llevados a cabo en microsomas hepáticos humanos (Elsby et al., 2001). Se ha establecido que el glucurónico conjugado, tienen un potencial estrogénico mucho más bajo que las dioxinas (Elsby et al., 2001; Mathews et al., 2001;

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Nakagawa et al., 2001), y no parecen jugar un papel importante en la toxicidad reproductiva de las dioxinas..

Más tarde, los resultados del estudio de Pottenger (2000) en ratas macho F-344 dosificadas por vía oral, confirmaron en gran parte los hallazgos obtenidos previamente por Knaak y Sullivan en 1966. Sin embargo existen algunas diferencias entre el estudio de Knaak y Sullivan con el de Pottenger. Los primeros encontraron que del 54 al 60% de la dosis fue excretada en la orina 8 días después de la exposición, mientras que el segundo encontró que ésta excreción era del 80%, independientemente de la vía de administración. Pottenger encontró que tanto en la vía oral como en otras vías, sólo una muy pequeña fracción de la dosis fue excretada en ratas macho por la orina (13-16% por un 26-31% en el estudio previo). Knaak y Sullivan administraron dosis muy altas de la dioxina, 800 mg/kg de las dioxinas, mientras que en el estudio de Pottenger se administraron dosis de 10-100 mg/kg. Así, el hecho de que fuese más alta la fracción excretada en la orina parece que fue debida a la saturación del mecanismo metabólico excretor responsable de la eliminación de las dioxinas por vía fecal. El trabajo de Knaak y Sullivan (1966), sugiere que el metabolismo oxidativo puede ocurrir *in vivo* a altas dosis, pero quizás sólo después de la saturación de otras rutas metabólicas. Además en este estudio no se encontraron más de un 7% de metabolitos en heces. Así, según esto, a estas dosis no hay evidencia de una fracción significativa fecal de un metabolito hidroxilado de las dioxinas como publicaron Knaak y Sullivan.

### Diferencias entre especies

Volkel en 2002 investigó la toxicocinética y la biotransformación de las dioxinas en humanos después de la administración de dosis bajas de 5 mg/kg (Volkel et al., 2002). Según Volkel, los resultados obtenidos demuestran que las dioxinas se absorben rápidamente del aparato gastrointestinal en los seres humanos, conjugándose en el hígado de forma casi completa las dioxinas a su ácido glucurónico, gracias a la acción de la enzima difosfoglucuronosil-transferasa (UGT) (Pottenger et al., 2000; Upmeier et al., 2000; Inoue et al., 2003), con un metabolismo de primer paso muy eficiente, siendo éste las dioxinas glucurónico, detoxificado rápidamente de la sangre y eliminado con la orina completamente a las 24 horas y en un 90% en las primeras 4-5 horas después de la administración oral. Según los resultados de éste estudio, tras la administración de dosis ambientales de las dioxinas en los humanos, solamente un porcentaje muy pequeño de la dosis de las dioxinas estaría disponible para otras vías de biotransformación, debido a una rápida glucuronidación.

La mayor parte de los estudios sobre la toxicocinética de las dioxinas en roedores utilizan a las ratas como modelo experimental. Sin embargo, existen diferencias en la

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

eliminación biliar de productos químicos del hígado según las diferencias existentes en el peso molecular entre los roedores y los seres humanos. Productos químicos con peso molecular >350 dalton (D) se eliminan preferentemente por la bilis del hígado del roedor, mientras que el peso molecular para la eliminación biliar en seres humanos es de 500-600 D. Esto da lugar a diferencias entre los roedores y los seres humanos en la eliminación de la dioxina (peso molecular 403 D) del hígado y así a diferencias importantes en la toxicocinética de las dioxinas.

En contraste con los seres humanos, debido a la eliminación de las dioxinas glucurónido por la bilis y la reabsorción de las dioxinas del intestino, éste experimenta una circulación enterohepática en ratas. Así, la excreción urinaria de las dioxinas y sus metabolitos resulta sólomente en un 10 a un 40% de la dosis administrada.

Según el trabajo de Volkel en 2002, en los seres humanos, la excreción rápida y completa de las dioxinas como glucurónido en la orina sugiere que no ocurre la circulación enterohepática.

- Diferencias en el metabolismo según la vía de administración

Donde más conocemos acerca del metabolismo de las dioxinas es principalmente en roedores (Miyakoda et al., 2000; Snyder et al., 2000; Takahashi y Oishi, 2000; Upmeier et al., 2000; Yoo et al., 2000), en los que es rápidamente absorbido por cualquier vía de administración

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

pero su disponibilidad es más baja cuando la administración oral es comparada con la parenteral.

La biodisponibilidad relativa, que se define como la concentración de las dioxinas en sangre sistémica, fue claramente dependiente de la vía de administración, resultando la administración oral en una mucho menor biodisponibilidad que en la intraperitoneal o la subcutánea (Pottenger et al., 2000). Las concentraciones sistémicas de las dioxinas en sangre o plasma fueron muy bajas tras una administración oral de 10-100 mg, donde la dioxina fue principalmente metabolizado a su monoglucurónido conjugado en un metabolismo de primer paso (Pottenger et al., 2000).

El alto aclaramiento metabólico de primer paso parece estar mediado por el intestino y por las enzimas hepáticas. La probable contribución de la UDP-glucuroniltransferasa es apoyada por una bastante mayor concentración arterial sistémica de las dioxinas en la administración intraperitoneal comparada con la oral, esto significa una más alta disponibilidad de las dioxinas en las vías subcutánea o intraperitoneal.

Esta dependencia de la vía en cuanto a la biodisponibilidad relativa ofrece probablemente una explicación farmacocinética para las diferencias evidentes de la vía en la potencia estrogénica (es decir, cambios uterinos) observados con las dioxinas en las ratas hembras. Específicamente, recientes estudios han demostrado una dependencia clara de la vía de la administración en la magnitud de la respuesta uterotrópica las dioxinas, donde se requerían

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

dosis orales más elevadas para producir una respuesta estrogénica que las requeridas a nivel subcutáneo (Laws y Carey, 1997; Twomey, 1998 a, b).

### - Diferencias entre sexos en la especie humana

Como explicación a las diferencias entre sexos en la conjugación de las dioxinas encontramos que la actividad de la UGT hepática es doble en los machos que en las hembras y otra puede ser las diferencias sexuales en la glucuronidación extrahepática, tanto en intestino como en riñón (Pottenger et al., 2000)

### - Cinética de las dioxinas en el feto

Aunque el feto es muy sensible a trastornos en el desarrollo debido a compuestos químicos (Welshons et al., 2006), se suponía inicialmente que era protegido por la barrera placentaria (Matsumoto et al., 2003).

Sin embargo, disruptores endocrinos como las dioxinas y el nonilfenol pueden llegar fácilmente a los órganos reproductores de los fetos y las ratas recién nacidas a través de componentes activos libres (Matsumoto et al., 2002). Trabajos recientes han publicado que las dioxinas tiene un rápido acceso al feto tras la exposición maternal (Miyadoka et al., 1999; Takahashi y Oishi, 2000).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Nishikawa (2010) observó que las dioxinas pasan a través de la placenta y es reconjugado a las dioxinas en el feto. La placenta actúa como barrera para el feto contra xenobióticos, drogas y otros compuestos químicos. Sin embargo, en la perfusión uterina en ratas utilizada en el estudio de Nishikawa, los datos cinéticos para las dioxinas glucurónido después de la perfusión indicaban que aunque la placenta proteja en su mayor parte al feto contra la exposición las dioxinas, una pequeña cantidad de éste, es transferida al feto a través de los vasos sanguíneos maternos en la placenta. Además, detectó que en el compartimento fetal, menos del 4% de las dioxinas estaba en la forma conjugada. A esto habría que añadir la baja capacidad del feto para metabolizar las dioxinas a su forma glucurónida debido a una baja expresión de la UGT2B1 (isoforma activa de la enzima hepática) en el feto. Las dioxinas es retenido en la circulación fetal e incrementado entre las 12 y 50 horas tras una dosis individual en ratas preñadas (Miyadoka et al., 1999; Takahashi y Oishi, 2000). Incluso en exposiciones agudas individuales, las dioxinas se acumula en el feto, excediendo los niveles fetales, de los maternos, sólo 40 minutos después de la exposición a la madre (Takahashi y Oishi, 2000). Zalko et al en 2003 midieron directamente los niveles de las dioxinas en ratonas preñadas y en sus fetos tras la administración de una dosis baja medioambiental de la dioxina, de 25 µg/kg, por vía subcutánea a ratonas CD-1 gestantes, el día 17 de gestación. El transporte de las dioxinas a los fetos ocurrió rápidamente, como se muestra en sus concentraciones hepáticas, plasmática y fetal a las 0,5 horas (cerca de 10, 1, y 4 ng/g, respectivamente). A este tiempo las concentraciones de la dioxina calculadas en el feto eran similares a las de las dioxinas no conjugado (Zalko et al., 2003).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

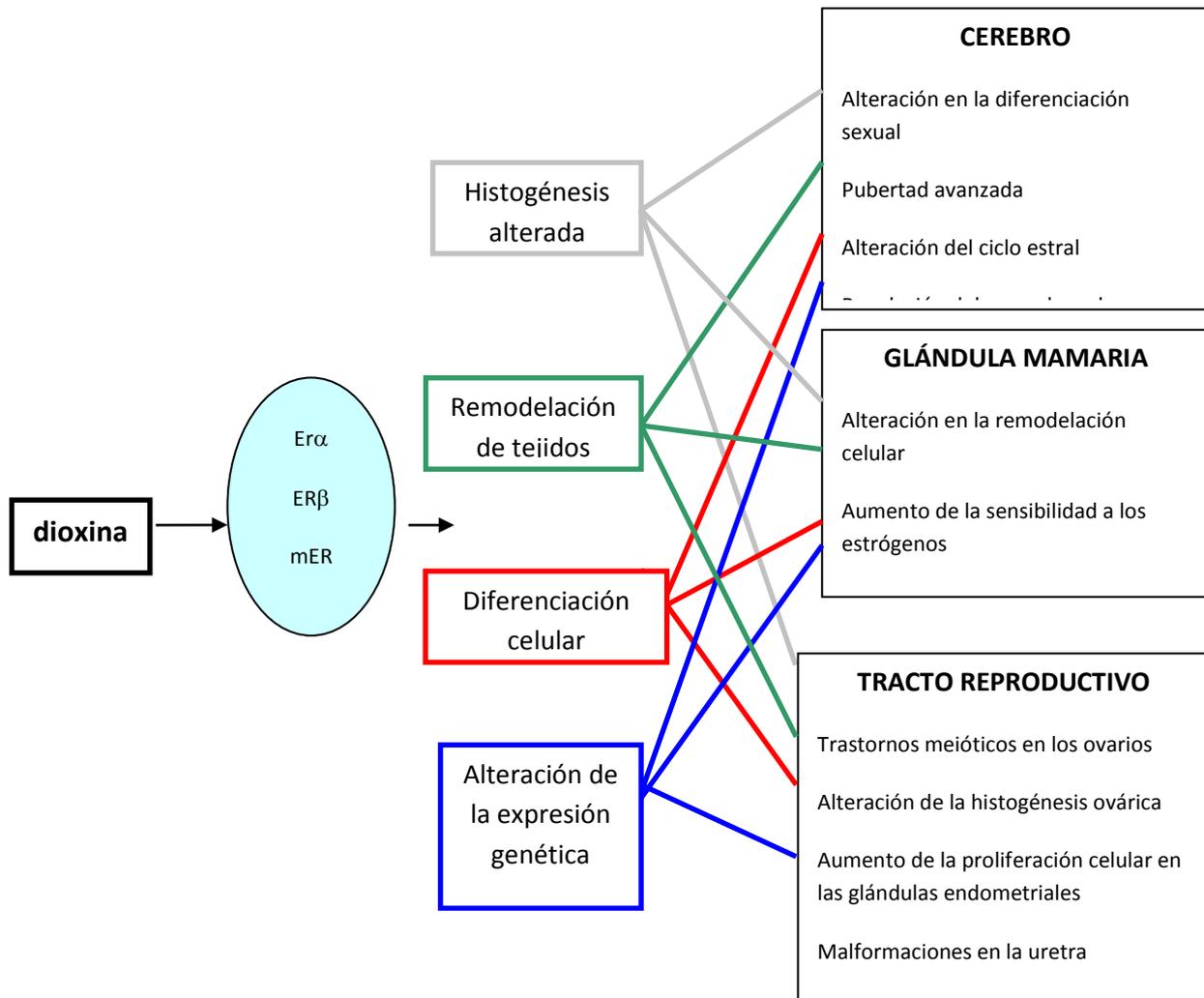
Los niveles de las dioxinas sin conjugar en el suero fetal humano recogidos en el parto están entre 0,1-10 ng/ml, y la concentración principal de las dioxinas en fetos masculinos humanos es de 3,5 ng/ml (Schonfelder et al., 2002). Los niveles de las dioxinas encontrados en fetos humanos en el estudio de Schonfelder, son similares a los niveles en ratones fetales poco después de que ratonas gestantes sean expuestas a las dioxinas (a bajas partes por millón). Entre 2 y 24 h después del tratamiento de ratonas gestantes a estas dosis tan bajas de las dioxinas, los niveles fetales humanos exceden de los niveles fetales en ratones (Zalko et al., 2003).

### Mecanismos de acción y estrogenicidad de las dioxinas

Los estudios moleculares empleando gran cantidad de modelos *in vitro* han revelado una variedad de rutas moleculares a través de las cuales las dioxinas pueden conseguir respuestas celulares. Como prototipo de estrógeno no esteroideo, las dioxinas interfiere con la actividad de estrógenos endógenos (por ejemplo el  $17\beta$  estradiol) mimetizándolo *in vivo* incluso a bajas dosis (vom Saal et al., 2005; Welshons et al., 2006; Vandenberg et al., 2009), interrumpiendo la propia actividad de los receptores nucleares estrógenicos en múltiples tejidos diana (Nagel et al., 1997; Kurosawa et al., 2002; Vivacqua et al., 2003; Adachi et al., 2005). Es bien conocido que el BPA ejerce algunos de sus efectos por unión a los receptores nucleares esteroides ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Las dioxinas se une selectivamente a ellos y tiene una alta afinidad sobre todo por el ER $\beta$  en las células diana (Matthews et al., 2001).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Sin embargo, las actividades de disrupción endocrina primarias de las dioxinas se extienden más allá de su capacidad de mimetizar, realzar o inhibir la actividad de estrógenos endógenos y/o de interrumpir la acción nuclear del receptor de hormona del estrógeno, incluyendo efectos sobre el sistema andrógeno (Wetherill et al., 2002; Xu et al., 2005; Sun et al., 2004) además, las dioxinas es el primer producto químico ambiental conocido que se une a los receptores estrogénicos "no clásicos" (Alonso-Magdalena et al., 2005), ya que existen evidencias de que se une a los receptores de la glándula tiroides, afectando su función (Kitamura et al., 2005; Zoeller et al., 2005; Iwamuro et al., 2006), a la membrana plasmática del receptor de las células pancreáticas, pudiendo inducir insulina-resistencia (Alonso-Magdalena et al., 2006) y aumentando de esa forma los riesgos del síndrome metabólico (Hugo et al, 2008), tiene influencias diversas en el desarrollo, en la diferenciación y la función del sistema nervioso central (Ishido et al., 2004; Kabuto et al., 2004) e influencias en el sistema inmune (Youn et al., 2002; Tian et al., 2003; Yoshino et al., 2004; Yurino et al., 2004; ).



En cuanto a la actividad estrogénica de las dioxinas ha sido determinada por una amplia variedad de análisis *in vitro*, incluyendo la unión a los receptores estrógenos (ERs) (Kuiper et al., 1997), por proliferación de células cancerosas humanas de mama MCF-7 (Pérez et al., 1998), inducción de los receptores de la progesterona en células humanas MCF-7 (Krishnan et al., 1993) y células de carcinoma endometrial (Bergeron et al., 1999).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

El metabolismo puede desempeñar un papel importante en la modulación de la actividad estrogénica de xenoestrógenos *in vivo* (Elsby et al., 2000). La glucuronidación de las dioxinas, es probablemente determinante del grado de ésta actividad estrogénica *in vivo*. En un estudio, la actividad estrogénica de las dioxinas, disminuyó entre 3 y 7 veces después de la glucuronidación en mujeres y en microsomas de hígado de hembras no maduras de rata, respectivamente (Elsby et al., 2000). Los resultados del estudio de Elsby confirmaron que la glucuronidación disminuye la actividad estrogénica de las dioxinas (Elsby et al., 2000). Por ello, Volkel sugirió que la glucuronidación de las dioxinas y una rápida excreción son más eficaces en la reducción de la actividad estrogénica de las dioxinas en los seres humanos que en los roedores.

### EFFECTOS DE las dioxinas SOBRE LA SALUD

#### Efectos sobre la reproducción

Numerosos estudios han implicado las dioxinas y a otros disruptores endocrinos en una reducción de la fertilidad en las hembras y el papel de los estrógenos sobre el desarrollo de los oocitos es un tema de considerable interés investigador. Las células de la teca en su última fase folicular expresan ambos receptores tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$ , mientras que las células de la granulosa expresan predominantemente el ER $\beta$ . En consecuencia, las dioxinas tiene potencial para afectar tanto a las células de la teca como a las células de la granulosa, sin embargo el grado de impacto y la afinidad sobre estas células ováricas es desconocido. (Routledge et al., 2000; Matthews et al., 2001). El impacto de las dioxinas, a dosis tan bajas como 0,1 nM sobre las células granulomatosas en el ovario de ratón fue investigado por Xu et al (2002) quienes

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

encontraron a estas dosis tan bajas, una disminución de la viabilidad de las células de la granulosa por apoptosis, sugiriendo que éstas células son altamente sensibles a las dioxinas. En un estudio *in vivo* se encontró que la exposición crónica a bajas dosis de las dioxinas causó aneuploidía meiótica en oocitos de ratones, lo que implica las dioxinas en la disrupción de la meiosis en las hembras (Hunt et al., 2003).

La exposición en mujeres embarazadas es una preocupación debido a la posibilidad de bioacumulación en los fetos y en períodos sensibles específicos durante el desarrollo embrionario (Lee et al., 2003; Soto et al., 2006; Sun et al., 2004; Wetherill et al., 2007). Diversos estudios han demostrado que las mujeres embarazadas están expuestas posiblemente a niveles más altos de las dioxinas que la población en general (Lee et al., 2003; Kruger et al., 2008). También se conoce que las dioxinas atraviesa la placenta, según lo evidenciado por su presencia en el tejido placentario y líquido amniótico (Wetherill et al., 2007). Además, un estudio reciente en células placentarias expuso los múltiples efectos deletéreos demostrados por las dioxinas en varios resultados adversos de embarazo tales como preeclampsia, niños prematuros y pérdida del embarazo (Benachour et al., 2009) lo que podría ayudar a explicar abortos involuntarios de etiología desconocida.

En cuanto a animales de laboratorio, en ratones hembra se produjo un incremento en la mortalidad de los embriones tras exponer a las madres a dosis de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Al Hiyasat et al., 2004). La exposición fetal con las dioxinas a través de la madre resultó en un comienzo temprano del desarrollo en la maduración de ratones hembras a 2,4-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Howdeshell et al., 1999; Honma et al., 2002) y en otro estudio a dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , la dosis más baja examinada (Nikaido et al., 2004).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La exposición a las dioxinas durante la gestación y la lactación causa disrupción del ciclo estral en las ratas y los ratones adultos a dosis de entre 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Talsness et al., 2000; Nikaido et al., 2004). además de alterar los niveles de la hormona luteinizante (LH) a dosis de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Akingbemi et al., 2004).

Ejemplos de efectos causados sobre las células y los tejidos reproductivos masculinos por exposición a bajas dosis de las dioxinas en ratas y ratones, son una significativa disminución en la producción diaria de esperma y en la fertilidad en machos a dosis de entre 0,2 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (vom Saal et al., 1998; Sakaue et al., 2001; Al Hiyasat et al., 2002; Chitra et al., 2003). Estudios sobre las células de Leydig en adultos, demostraron que bajas dosis de las dioxinas (0,01 nM) disminuyen la síntesis de testosterona en un 25% como resultado de una disminución en la expresión de la enzima esteroidogénica 17 $\alpha$ -monooxigenasa (Kawai et al., 2003; Akingbemi et al., 2004).

La exposición postnatal a las dioxinas disminuyó los niveles de 17 $\beta$ -estradiol en ratas Long-Evans expuestas a 2,4, 10 o 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de las dioxinas por inhibición de la actividad aromatasa de las células de Leydig y exposiciones inferiores a dosis medioambientalmente relevantes (2,4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) disminuyeron los niveles de ARNm de la hormona luteinizante (LH) (Akingbemi et al., 2004). Estos hallazgos demuestran que el periodo perinatal es una ventana de sensibilidad para la exposición las dioxinas en este sistema animal (Wetherill et al., 2007).

### Acción sobre la hormona tiroidea

La hormona tiroidea (TH) es esencial para el desarrollo normal del cerebro tanto en seres humanos como en animales (Dussault y Ruel, 1987).

Existe una cierta evidencia de que las dioxinas se une a los receptores de la hormona del tiroides (TR), actuando como antagonista de la activación de la triyodotironina (T3) (Moriyama et al., 2002). Además, se encontró que la exposición las dioxinas en ratas produce un perfil endocrino similar al que se observa en el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea (Cheng, 2005).

Estudios *in vivo* que examinaban los efectos de las dioxinas sobre la hormona del tiroides han sido llevados a cabo en ratas expuestas a 1, 10, o 50 mg/kg de peso vivo, en ratas perinatales (Zoeller et al., 2005), observando en el día 15 posterior al nacimiento una sobre regulación de los niveles del gen responsable de la hormona tiroidea en el cerebro. También fue observado en pez medaka que la aceleración en el desarrollo y el tiempo de fertilización embrionario inducido por las dioxinas fue bloqueado por un receptor antagonista de la hormona del tiroides, sugiriendo que las dioxinas actúa a través de la ruta de la hormona tiroidea (Ramakrishnan y Wayne, 2008).

Meerts et al (2001) demostraron que los compuestos polibrominados de las dioxinas tienen actividad estrogénica y son capaces de unirse al ER $\alpha$ , demostrando que los derivados brominados actúan como TR agonistas en las células GH3 de la pituitaria.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Seiwa et al (2004) demostraron que las dioxinas bloquea el desarrollo de la T3 inducida por las células precursoras oligodendrocíticas (OPCs). Además, puede haber una asociación entre el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea y el síndrome de atención dispersa e hiperactividad (ADHD) en los seres humanos (Vermiglio et al., 2004; Siesser et al., 2005) y en las ratas (Siesser et al., 2005), por lo tanto, es potencialmente importante que las ratas expuestas las dioxinas mostraran síntomas parecidos a los del ADHD (Ishido et al., 2004).

La exposición las dioxinas también altera la histogénesis neocortical en el ratón (Nakamura et al., 2006), siendo posible que las dioxinas altere el desarrollo temprano de la corteza interfiriendo con la señalización de la hormona tiroidea.

### Efectos sobre el páncreas endocrino

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que más de 180 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus. La diabetes tipo 2 comprende el 90% de la gente afectada, y se estima que la diabetes es responsable de 2,9 millones de muertes al año. Las causas parecen misteriosas, aunque la predisposición genética, la obesidad, la dieta, la falta de ejercicio y una población envejecida están entre las principales causas consideradas ([www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)). La diabetes tipo 2 ocurre tras un periodo prolongado de resistencia a la insulina, caracterizada por una disminución de la acción de la insulina en tejidos periféricos. También es la principal causa del síndrome metabólico caracterizado por obesidad visceral, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensión (Biddinger y Kahn., 2006).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

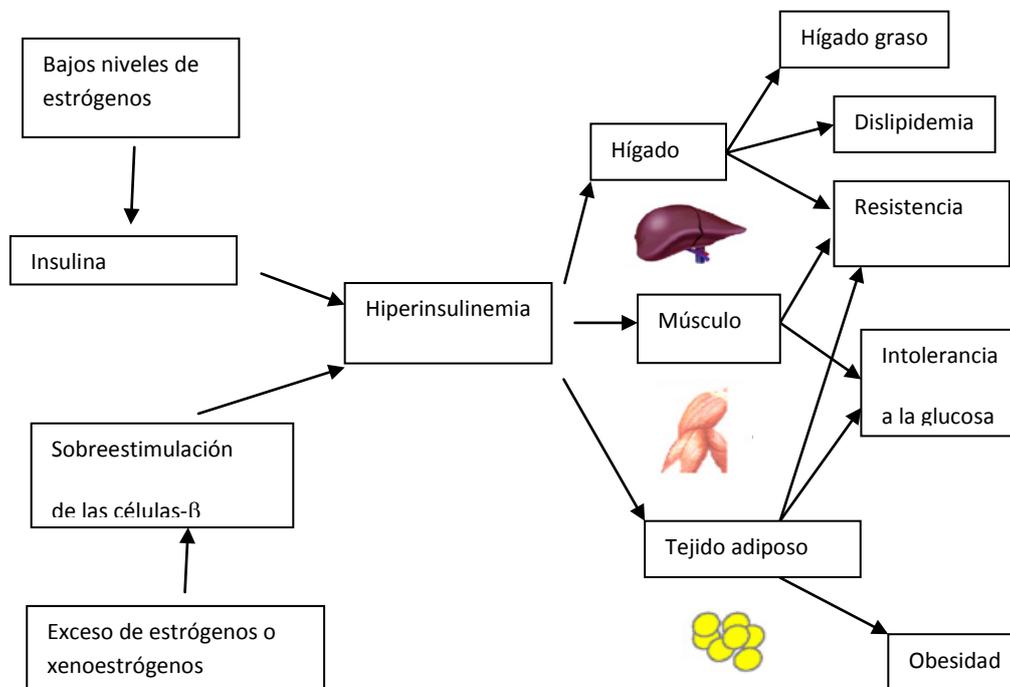
Las dioxinas afectan drásticamente las funciones de los islotes de Langherans, la unidad fisiológica del páncreas endocrino. Cada islote contiene entre 1000 y 3000 células de cinco tipos, las más abundantes son las células  $\beta$ , que sintetizan y liberan la insulina y las células  $\alpha$  que sintetizan y secretan el glucagón (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006).

En estudios sobre ratones se demostró que las dioxinas y el estradiol tienen la misma potencia y eficacia, además ambos inhiben la liberación de adiponectina de los adipocitos humanos a 1 nM, más allá de una implicación adicional de las dioxinas en la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico en humanos a niveles actuales de exposición (Hugo et al, 2008; vom Saal y Myers, 2008). Las concentraciones a las cuales las dioxinas afecta a las células  $\alpha$  y  $\beta$  están dentro del rango de las dioxinas detectado en el suero humano (0,9-8,8 nM) (Takeuchi y Tsutsumi, 2002). *In vivo*, a dosis tan bajas como 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (una dosis 5 veces por debajo de la IDA) se observó un aumento rápido en la insulina plasmática y una disminución consiguiente de la glicemia (Alonso-Magdalena et al., 2006). El tratamiento en ratones machos adultos durante 4 días con dosis diarias de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  alteró el contenido y la secreción de la insulina pancreática, provocando hiperinsulinemia postprandial y resistencia a la insulina en ratones machos (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Un exceso en la acción ER $\alpha$  mediada por un estrógeno como las dioxinas provocará un aumento en el contenido y secreción de las células  $\beta$  pancreáticas *in vivo* e *in vitro*, sobreestimulando a las células  $\beta$ . Una excesiva señal de insulina en el hígado o el endotelio produce dislipidemia, y en el tejido graso produce obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (Biddinger y Kahn, 2006). Además, una excesiva señal de insulina puede provocar resistencia a la insulina en el hígado y el músculo (Ueno et al., 2005), además de un agotamiento

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

de las células  $\beta$  y de esa forma contribuir al desarrollo de diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009). Los receptores estrógenos son moléculas claves envueltas en la homeostasis de la glucosa en la sangre. Particularmente, el ER $\alpha$  en las células  $\beta$  tiene un papel crucial en el incremento de la biosíntesis de la proinsulina en respuesta a concentraciones fisiológicas de estradiol. Por otra parte, el tratamiento *in vivo* con las dioxinas a dosis ambientalmente relevantes induce resistencia a la insulina en ratones machos adultos sanos.



## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Se ha demostrado que la diabetes tipo 2 solamente se desarrolla en sujetos insulina resistentes con inicio de disfunción de las células  $\beta$ . En seres humanos adultos, sin embargo, existe evidencia epidemiológica de que las dioxinas actúa como un importante factor de riesgo dentro del desarrollo de la diabetes tipo 2 (Lang et al., 2008). Además, hay nexos causales entre la exposición las dioxinas y la resistencia a la insulina (Alonso-Magdalena et al., 2006), alteración de la biosíntesis de la insulina y secreción de las células  $\beta$  en ratones macho adultos (Alonso-Magdalena et al., 2008) y disminución de la adiponectina de los adipocitos humanos (Hugo et al., 2008).

Aunque dos de las causas principales de fallo en las células  $\beta$  en la diabetes tipo 2 son la sobrenutrición y la carencia de ejercicio, los estrógenos ambientales, en particular las dioxinas, son fuertes candidatos a exacerbar y acelerar el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009).

### Efectos sobre el sistema inmune

Se conoce bien que los estrógenos juegan un papel fundamental en el sistema inmune, recientes hallazgos demuestran que las dioxinas es capaz de influenciar las funciones del sistema inmune (Paavonen et al., 1981; Holdstock et al., 1982) Por otro lado, las enfermedades alérgicas tales como el asma bronquial y la dermatitis atópica han crecido marcadamente durante las últimas décadas en los países desarrollados (Burr et al., 1989; Bjorksten, 1999; von Mutius, 2000). Revisando todos los datos disponibles se ha sugerido que los factores ambientales contribuyen a este aumento observado en las enfermedades alérgicas (Fujimaki et

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

al., 1994;; Takano et al., 1997; Nel et al., 1998). También se ha divulgado que enfermedades autoinmunes tales como la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), el lupus eritematoso sistémico (SLE), la dermatomiositis y la escleroderma han aumentado de forma alarmante durante varias décadas (Yurino et al., 2004). Al mismo tiempo, ha existido un aumento de la atención científica y social en productos químicos que podemos encontrar en el medioambiente y que pueden ser incorporados a nuestro organismo por ingestión o absorción, mimetizando las acciones de los estrógenos, siendo uno de estos productos químicos las dioxinas

Yurino et al estudiaron el grado de implicación de los disruptores endocrinos entre ellos las dioxinas en las enfermedades autoinmunes demostrando que las dioxinas aumentó la producción de autoanticuerpos por las células B1 tanto *in vivo* como *in vitro* en ratones BWF1 en un modelo para el lupus eritematoso sistémico (Yurino et al., 2004).

Un estudio *in vitro* a concentraciones tan bajas como 10 nM, disminuyó el índice de adherencia de los macrófagos peritoneales en ratas (Segura et al., 1999). Basándonos en que la adhesión es el primer paso en el proceso fagocítico de los macrófagos y de la presentación de antígenos, los autores de este estudio sugirieron que las dioxinas puede modular respuestas inmunes e inflamatorias.

Han et al (Han et al., 2002) examinaron la regulación de la producción de Ig por las dioxinas en esplenocitos de ratón. Éstos fueron tratados con dosis de entre 10 nM-1  $\mu$ M las dioxinas midiéndose los niveles de IgM, IgE, IgA e IgG, la dosis de 1  $\mu$ M aumentó la producción de IgM y disminuyó los niveles de IgE.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Youn et al también estudiaron la respuesta inmune tras exposición a la dioxina en células esplénicas de ratón. Las dioxinas se administró en el agua de bebida durante 4 semanas a dosis de 0,015, 1,5 y 30 mg/ml, induciendo una producción de prolactina en el bazo y un incremento en la actividad de proliferación esplenocítica (Youn et al., 2002). Basándose en estos hallazgos, el autor especuló con que la estimulación de la producción de prolactina debida a efectos estrogénicos de la dioxina puede afectar a la producción de citoquinas, desencadenando una respuesta celular inmune desequilibrada (Wetherill et al., 2007).

También se han examinado los efectos de las dioxinas sobre la producción de interleukina-4 (IL-4), una citoquina proinflamatoria muy asociada a la respuesta alérgica inmune, llegando a la conclusión de que las dioxinas aumenta la producción de varias citoquinas, incluyendo la IL-4 (Lee et al., 2003; Tian et al., 2003).

### Efectos sobre el tejido adiposo

La incidencia de obesidad ha crecido notablemente en las últimas décadas, aunque se ha considerado como principales causas una alta dieta calórica y un estilo de vida sedentaria, el rol de los factores medioambientales está ganando crédito (Hugo et al., 2008).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La adiponectina es una hormona específica de los adipocitos que incrementa la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa en el músculo, reduce la salida de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina en el hígado, también tiene funciones protectoras contra el síndrome metabólico (Kadowaki et al., 2006) el cual incluye obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertensión y es asociado con un aumento en el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ritchie y Connel, 2007). La disponibilidad de la adiponectina es controlada a 3 niveles: biosíntesis, ensamblaje y liberación (Trujillo y Scherer, 2005). La síntesis es estimulada por el agonista PPAR $\gamma$ , la insulina y el IGF-1 e inhibido por el TNF $\alpha$  y las catecolaminas (Lihn et al., 2005). El BPA podría suprimir la adiponectina por un antagonismo del PPAR $\gamma$  (Wright et al., 2000; Knouff y Auwerx, 2004).

La formación correcta de enlaces disulfuro es crítica para el ensamblaje y retención de adiponectina (Trujillo y Scherer, 2005). La formación del enlace disulfuro dentro del retículo endoplásmico es catalizado por oxirreductasas, de las cuales la proteína disulfuroisomerasa (PDI) juega un papel crítico (Tsao et al., 2003; Wang et al., 2007). Puesto que se publicó que las dioxinas se unía a la PDI inhibiendo su actividad enzimática, éste podría representar otro mecanismo por el cual la dioxina inhibe a la adiponectina (Ben-Jonathan et al., 2009).

Un estudio demostró una inhibición de la liberación de adiponectina a concentraciones nanomolares las dioxinas (1-10 nM) en tejidos cultivados de adipocitos maduros humanos aislados de tejido mamario, subcutáneo y visceral, sumado al estudio de Alonso-Magdalena en el que dosis bajas de las dioxinas y estradiol estimularon respuesta en las células del tejido adiposo, mientras que dosis cien veces más altas no estimularon la producción de insulina ni liberaron adiponectina de los adipocitos humanos, demuestran claramente una curva dosis-respuesta en las dioxinas con forma de U invertida (Alonso-Magdalena et al., 2008; Hugo et al.,

2008). La acción de diversos disruptores endocrinos, entre ellos las dioxinas, podría explicar el aumento significativo de peso del cuerpo humano durante el último medio siglo (Rubin y Soto, 2009; Somm et al., 2009; Trasande et al., 2009).

### Otros efectos

Las dioxinas provoca otros efectos a diferentes niveles, como cambios en los receptores de somatostatina del cerebro a dosis muy bajas de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Facciolo et al., 2002), efectos comportamentales que incluyen hiperactividad a 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Ishido et al., 2004), un incremento en la agresividad a 2-40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Farabollini et al., 2002; Kawai et al., 2003) una alterada reacción al dolor a 40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Aloisi et al., 2002), una alteración del aprendizaje a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Negishi et al., 2004). De manera importante, Lang, en su estudio, relacionó altas concentraciones de las dioxinas en la orina de humanos con un incremento en la prevalencia de enfermedades coronarias (Lang et al., 2008).

### Evaluación del riesgo en la salud humana

Las Agencias Reguladoras Europeas han confirmado que no existe riesgo para los consumidores, por materiales basados en las dioxinas en contacto con los alimentos (EFSA, 2006).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Pequeñas cantidades de las dioxinas pueden migrar del plástico o del recubrimiento de resina a los alimentos y bebidas. En este caso la directiva 2002/72/CE establece un límite de migración específico de 0,6 mg/kg.

En enero de 2007, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió su opinión sobre la seguridad de las dioxinas en aplicaciones de contacto con los alimentos para consumidores. La EFSA es un grupo científico independiente que asesora a la Comisión Europea sobre cuestiones de seguridad alimentaria.

Tras un examen de alrededor de 200 nuevos estudios, se decidió que se debían utilizar los resultados de un extenso estudio de tres generaciones en ratas para determinar el nivel de seguridad. Utilizando el "Nivel Sin Efecto Adverso Observado" (NOAEL) de 5 mg/kg y aplicando un factor de incertidumbre de 100 (10 para diferencias entre especies, 10 para las diferencias entre individuos) la ingesta diaria tolerable (IDT) de las dioxinas se ha establecido en 0,05 mg/kg de peso corporal al día, esto representa la cantidad de las dioxinas que un consumidor (incluyendo bebés y niños) puede ingerir con seguridad sin efectos dañinos.

En cuanto a los niveles de migración típicos de las dioxinas procedentes de materiales en contacto con el alimento, según la EFSA, son menores a 10 µg/kg de alimento y, por tanto, muy por debajo del nivel reglamentario de migración específica de las dioxinas de 600 µg/kg de alimento (sobre la base de la IDT, bajo el supuesto de que una persona de 60 kg coma 1kg de comida al día, con un factor de seguridad adicional de 5). Utilizando números conservadores de migración, la EFSA concluyó en 2007 que la exposición a las dioxinas por las botellas de plástico de policarbonato y las latas de comida y bebida revestidas por resinas epoxi está muy por debajo de la IDT.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La evaluación de riesgos actualizada de junio de 2008, así como la actualización del dictamen de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) de julio de 2008, establecen claramente que los materiales en contacto con alimentos, tales como los biberones de policarbonato y otras botellas, así como las latas de alimentos y bebidas revestidas en resinas epoxi son seguros en sus usos indicados.

En cuanto a los límites de exposición ocupacional, el riesgo de exposición a las dioxinas a través de partículas de polvo, debido a una exposición ocupacional liberada en altas concentraciones durante periodos de tiempo medio y corto es poco frecuente. Según los análisis de las dioxinas hechos por la Comisión Alemana acerca de la Máxima Concentración del Lugar de Trabajo (MAK), los datos sobre inhalación a medio plazo y la toxicidad asociada a la exposición a las dioxinas tienen un "nivel de efecto no observado" (NOEL) de 10 mg/m<sup>3</sup> (German MAK Commission, 1996) y por lo tanto, en base a los datos sobre la toxicidad de inhalación a medio plazo se estableció un valor máximo de concentración del lugar de trabajo (MAK) para el BPA de 5 mg/m<sup>3</sup> (medidos como la fracción de polvo inhalable). En contraste, en E.E.U.U. no hay estándares o límites ocupacionales fijados sobre las dioxinas por las diferentes agencias sobre seguridad ocupacional (Wen-Tien, 2006)

Para la evaluación de riesgo de las dioxinas, los expertos gubernamentales examinaron varios cientos de estudios que han ido apareciendo en los últimos años, tanto pequeños estudios exploratorios que no siguen los protocolos establecidos, como estudios amplios, estadísticamente robustos y que cumplen con los protocolos y normas internacionalmente aceptados, así como la Directiva de Buenas prácticas de laboratorio (BPL). Asimismo, la evaluación abarca todos los grupos de edad de consumidores potencialmente afectados, incluidos bebés y niños pequeños.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La última conclusión de la EFSA sobre las dioxinas es similar a las conclusiones de las evaluaciones científicas de otros organismos reguladores, incluyendo la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE.UU. y el Ministerio Japonés de Salud, Trabajo y Bienestar Social.

Sin embargo, la publicación relacionada con efectos de las dioxinas en roedores de laboratorio en 1997 (Nagel et al., 1997) sacó a la luz problemas en el sistema reproductor masculino en la descendencia, al utilizar dosis orales de BPA en ratones, 25000 veces más bajas que las estudiadas comúnmente, y 25 veces por debajo de la dosis de exposición diaria definida como "segura" por la EPA y la FDA de los EE.UU, así como por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

A raíz de ésta publicación, gran cantidad de estudios publicados, financiados en múltiples casos por los gobiernos y llevados a cabo por Institutos Nacionales de Salud, describen efectos de las dioxinas en animales expuestos a menos de 50 mg/kg/día, incluyendo un desarrollo alterado del tracto reproductivo en machos y hembras, una organización alterada del dimorfismo sexual en el hipotálamo, alteración del ciclo estral, una pubertad temprana, alteración del peso corporal, una organización alterada de la glándula mamaria y cáncer de mama y próstata (Richter et al., 2007), por lo que se han publicado numerosas revisiones discutiendo el cálculo de los niveles de exposición seguros para las dioxinas (Markey et al., 2003; Welshons et al., 2003, 2006; vom Saal y Hughes, 2005; vom Saal y Myers, 2008).

A pesar de que Volkel en 2002, observó un metabolismo rápido y eficiente para la dioxina en los humanos, se ha sugerido que la exposición a xenoestrógenos como las dioxinas

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

durante el desarrollo temprano puede contribuir de manera importante a una incidencia creciente de la infertilidad, anormalidades del tracto genital, obesidad, desorden del déficit de atención-hiperactividad, infertilidad, y cáncer de próstata y mama observado en poblaciones humanas durante los últimos 50 años (Sharpe y Skakkebaek, 1993; Soto et al., 2006). Sin embargo, para traducir los resultados de estos estudios animales en riesgo para la salud en los seres humanos, la biomonitorización para la evaluación de la exposición a las dioxinas en diversas poblaciones, es esencial.

En 2010, Vandenberg et al, examinaron más de 80 estudios de biomonitorización que medían concentraciones de las dioxinas en tejidos y fluidos humanos, centrándose específicamente en individuos expuestos al BPA a través del ambiente. Estos estudios, examinaron miles de individuos de diversos países, y las dioxinas fue detectado de forma aplastante en adultos, adolescentes y niños, lo que contrasta con los estudios de biomonitorización de Volkel en los que concluía que tras la absorción oral de las dioxinas éste era rápidamente metabolizado en el hígado y el intestino (Volkel et al., 2002, 2005). Según Vandenberg et al (2010), Volkel en 2002 y 2005, al extraer su conclusión de que no existe riesgo de exposición a las dioxinas a los niveles de exposición humanos actuales pasó por alto varios aspectos importantes de la evaluación del riesgo:

- 1) No reconoció la probabilidad de una toxicocinética diferente cuando la exposición a las dioxinas es a largo plazo comparada a la que se produce con una sola administración.
- 2) El potencial para que las dioxinas tenga acciones a niveles bajos (ng/ml) no fue considerado.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

- 3) Hasta muy recientemente (Stahlhut et al., 2009), fue asumido que la mayoría, si no toda, de la exposición las dioxinas en seres humanos ocurre vía oral. Sin embargo, como no todas las fuentes de las dioxinas se han identificado, las exposiciones no orales no pueden ser descartadas.
- 4) Finalmente, Volkel (2002, 2005) pasó por alto la posibilidad de las diferencias toxicocinéticas bajo diversas situaciones fisiológicas. La posibilidad de que la toxicocinética de productos químicos y fármacos, incluyendo las dioxinas, sea muy diferente en fetos y en recién nacidos comparado a los adultos. De hecho, esto fue confirmado en dos modelos cinéticos independientes, que encontraron que la exposición interna a las dioxinas en recién nacidos puede ser 3-10 veces más alta que en los adultos (Edginton y Ritter, 2009; Mielke y Gundert-Remy, 2009). Además, estudios en roedores han encontrado que los recién nacidos tienen limitada la capacidad de convertir las dioxinas en una forma conjugada inactiva, independientemente de la ruta de la administración (Taylor et al., 2008), pudiendo igualmente considerarse esto para los fetos y recién nacidos humanos.

Lang et al (2008) realizaron un análisis de las concentraciones de las dioxinas y del estado de salud de la población en general de los Estados Unidos, de datos derivados del NHANES 2003-2004. De acuerdo con las dioxinas urinario medido en los sujetos (n = 1455) de entre edades de 18 a 74, los investigadores encontraron que una concentración urinaria más alta de las dioxinas fue asociada a un aumento en la incidencia de diabetes, enfermedad cardiovascular y hepática y anormalidades enzimáticas (Lang et al., 2008). Melzer en 2010 también relacionó altas concentraciones urinarias de las dioxinas con enfermedad cardiovascular (Melzer et al., 2010). Stahlhut en 2009, utilizando datos de 1469 personas, observó que el período de eliminación de las dioxinas en la base de la población es mucho más largo que el

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

esperado, basado en estudios publicados de exposición aguda. En este estudio se demostró una fuerte disminución de las dioxinas en sangre en el intervalo de 4,5-8,5 horas, representando posiblemente una fase inicial de eliminación tras la exposición oral. Sin embargo, a partir de las 8,5 a 24 horas, la pendiente es esencialmente constante, demostrando un pico del 46% de la concentración de las dioxinas a las 17 horas, con lo que la vida media del BPA es larga, encontrándose altos niveles de las dioxinas en sujetos que habían ayunado entre 8-24 horas previas, obteniéndose niveles de las dioxinas de entre 12-80 ng/ml. Estos niveles de las dioxinas son sustancialmente mayores que la media de 2,7 ng/ml determinada por Calafat et al (2008), y sugieren la posibilidad de a) una importante exposición no alimenticia a través de vía no-orales que evitan el hígado y el metabolismo de primer paso intestinal (Stahlhut et al., 2009), que no han sido identificadas en su totalidad (la tinta de las impresoras contiene las dioxinas, el papel sin carbono usado en los recibos de las compras que está recubierto con las dioxinas, al igual que el papel de periódico o el papel reciclado) ni están siendo consideradas como fuentes de exposición en algunos estudios de biomonitorización (Vandenberg et al., 2010); ó b) una acumulación de las dioxinas debido a exposiciones frecuentes, que podrían dar lugar a una bioacumulación si las dioxinas se distribuye en los tejidos humanos liberándolo lentamente.

Por ello, para una completa evaluación del riesgo, Vandenberg et al (2010) sugieren que los pequeños estudios de biomonitorización realizados previamente se deben repetir usando como referencia grandes poblaciones, ya que es necesario obtener múltiples muestras de sangre y orina para determinar la variabilidad de la exposición en un cierto plazo, de semanas, meses, o años probablemente, ya que son necesarios estudios de biomonitorización a lo largo de la vida de una persona para confirmar los niveles de las dioxinas totales y sin conjugar en la sangre. Estos estudios necesitan comparar niveles de exposición en hombres y mujeres, adultos, recién nacidos y niños (antes y después de la pubertad), mujeres embarazadas y no embarazadas,

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

individuos obesos y no obesos, poniendo especial atención al análisis de las dioxinas totales y sin conjugar en las poblaciones más vulnerables (niños y mujeres embarazadas). Además, son necesarios estudios toxicocinéticos humanos de las dioxinas que empleen métodos sensibles a través de estados fisiológicos diversos, y de grupos de la misma edad, así como la necesidad de identificar todas las fuentes de exposición y determinar la dosis diaria de las dioxinas a la que estamos expuestos.

Además para la evaluación del riesgo es muy importante el uso de las bases de datos (<http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>) sobre los niveles de las dioxinas y la relación de éstos con diversas enfermedades, así como ejemplos los ya comentados estudios recientes de Lang y Stahlhut en 2008 y 2010, respectivamente (Vandenberg et al., 2010).

Para finalizar, recientemente, según informó la Comisión Europea en un comunicado, el 25 de noviembre de 2010, la Unión Europea (UE) ha acordado prohibir los biberones de plástico que lleven el componente de las dioxinas por sus posibles efectos perjudiciales para la salud de los niños. Expertos de los Veintisiete países de la UE así como del Ejecutivo comunitario, en el marco del Comité Permanente para la Cadena Alimentaria y la Salud Animal, han adoptado esta prohibición, que entrará en vigor el 1 de junio de 2011. Se trata de una Decisión de la Comisión Europea en base al informe realizado por la EFSA que hace que se modifique la Directiva 2002/72/EC de 6 de agosto de 2002 de la Comisión Europea, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.

### EL ZEBRAFISH COMO ORGANISMO MODELO

El zebrafish (*Danio rerio*) es un pequeño pez que pertenece a la familia *Ciprinidae* y al grupo de los barbos, más concretamente al de los danios. Fue uno de los primeros peces que se importaron a Europa para el mercado acuariófilo. El zebrafish tiene un tamaño de unos 4-5 cm de largo. Los machos son delgados y con el cuerpo en forma de torpedo, con rayas longitudinales negras y generalmente una coloración oro en el vientre. Las hembras son más gruesas cuando están cargadas con huevos y tienen poco o nada de color oro en su superficie inferior (Wixon, 2000).

Los primeros pasos hacia el establecimiento del zebrafish como un importante modelo para el estudio del desarrollo vertebrado fueron llevados a cabo en 1972 por George Streinsinger en Eugene, Oregon (USA). Buscando un vertebrado en el cual poder estudiar el desarrollo temprano, eligió al zebrafish por poseer tres importantes cualidades: la producción de un gran número de huevos accesibles en los primeros estadios de su vida, la claridad óptica en el desarrollo del pez y el genoma diploide que permitiría los estudios genéticos.

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

Un organismo modelo debe ofrecer ventajas técnicas y prácticas para estudiar los principales procesos biológicos, sus efectos y sus mecanismos. Además, el organismo modelo tiene que ser representativo para un grupo más grande de organismos (Segner, 2009). El zebrafish, en contraste con otros organismos modelo, los cuales pueden ser triploides o tetraploides (lo que hace difícil el análisis genético), mantiene el estado diploide (Wixon, 2000), además, debido a que la embriogénesis ocurre externamente, unido a que los embriones son transparentes, permite la observación al microscopio de todos los estadios de su desarrollo y seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). El desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda, los somitas (precursores del músculo y del esqueleto), además de ser visibles los eritrocitos (Wixon, 2000). A los cinco días de desarrollo se han formado algunos órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de ser funcionales los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso (Kimmel et al., 1995).

El tiempo de generación relativamente corto, de tres a cuatro meses es una ventaja para los estudios crónicos o genéticos. Los descendientes pueden ser producidos continuamente y en número elevado, puesto que bajo condiciones laborales, el zebrafish se reproduce durante todo el año (Spence et al., 2008). Generalmente, las hembras desovan una vez por semana y generan de 50 a 200 huevos o más, los cuales son fertilizados externamente. Además, mientras que los embriones de los mamíferos se desarrollan en el interior del útero, los embriones del zebrafish se desarrollan fuera de la madre donde se pueden manipular fácilmente, por ejemplo, por exposición en el agua o por microinyección en el huevo (Segner, 2009).

En resumen, la capacidad para medir una amplia variedad de objetivos, junto con un número elevado de descendientes, el pequeño tamaño del embrión y su rápido desarrollo han promovido el uso del zebrafish para grandes análisis. Estas características hacen del zebrafish un modelo conveniente para estudiar la base genética de enfermedades humanas, por ejemplo enfermedades inmunes (Yoder et al., 2002), cáncer (Berghmans et al., 2005), o desórdenes del metabolismo de la glucosa (Elo et al., 2007).

El zebrafish también se ha utilizado como modelo general vertebrado en toxicología (Spitsbergen y Kent, 2003; Hill et al., 2005; Carvan et al., 2007), así como especie ecotoxicológica para determinar diversos efectos adversos de productos químicos en relación con la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de estos peces y así establecer criterios de la calidad del agua (Bresch et al., 1990; Nagel, 1991).

La investigación sobre el zebrafish ha progresado de menos de 10 publicaciones internacionales al año en los años 70, a más de 400 en los 90, unos 1000 artículos al año a final del siglo XX, hasta llegar a los 3500 artículos por año en la actualidad (Houart, 2001).

### El zebrafish en el análisis de la actividad endocrina

Hasta la fecha, una gran variedad de desordenes reproductivos y del desarrollo han sido observados en diversas especies de nuestra fauna (Tyler et al., 1998; Guillete, 2000; Vos et al.,

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

2000; Edwards et al., 2006), y han sido claramente relacionados con la exposición a contaminantes ambientales que actúan como disruptores endocrinos (EDCs).

Para estudiar el potencial de una sustancia química, que puede ser endocrinamente activa, se realiza un análisis de *screening*. En los estudios de EDCs frecuentemente se seleccionan biomarcadores los cuales especifican la actividad endocrina de los productos a analizar, por ejemplo la VTG, proteína precursora del huevo sintetizada en el hígado de las hembras de los peces bajo el control de los estrógenos. La síntesis de VTG en hembras es fisiológica y puede ser inducida en el hígado de los machos si son tratados con compuestos estrogénicamente activos. La VTG es inducida rápidamente, Rose et al (2002) demostraron que en zebrafish machos se podían detectar cambios cuantificables en la VTG tras 24 horas de exposición a  $17\beta$  estradiol.

El zebrafish también puede ser utilizado como modelo para estudiar los efectos de los EDCs sobre procesos centrales de retroalimentación, en la regulación neuroendocrina gonadal (hipotálamo-hipófisis-gónadas). Las gónadas juegan un papel clave en la síntesis de esteroides sexuales y en su acción; la exposición a EDCs altera la progresión de la gametogénesis, puede causar daño tisular, necrosis, apoptosis, hiperplasia celular e hipertrofia (van der Ven et al., 2003). Para este tipo de *screening* se utilizan 2 tipos de test toxicológicos: los test de ciclo completo y los de ciclo parcial.

Los test de ciclo completo tienen 2 importantes desventajas: requieren varios meses para completarlos, con un alto coste y, no son capaces de discernir si la generación reproductiva

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

es debida a una disrupción del desarrollo y diferenciación sexual, o a una disminución de las capacidades reproductoras de los adultos.

Los test de ciclo parcial suelen ser más rápidos y menos costosos para detectar efectos de los ECDs. Existen 2 tipos de test parciales (Ankley y Johnson, 2004) y ambos han sido llevados a cabo en el zebrafish: a) actuando sobre las capacidades reproductivas de los adultos (Van den Belt et al., 2001; Brion et al., 2004; van der Ven et al., 2007) y b) observando el impacto que tienen los EDCs sobre la diferenciación sexual durante la "ventana sensitiva" de desarrollo gonadal. Durante este periodo sensible, las gónadas indiferenciadas están bajo la influencia del balance entre estrógenos y andrógenos (Devlin y Nagahama, 2002; Piferrer y Blazquez, 2005). Si este balance es modulado por la exposición a EDCs exógenos, la señal medioambiental puede determinar el sexo genético y generar un fenotipo sexual alterado. Esta ventana sensitiva en el zebrafish suele ir desde la fertilización hasta los 60 o 70 días postfertilización (Andersen et al., 2003; Hill y Janz, 2003; Orn et al., 2003; Brion et al., 2004; Holbech et al., 2006).

Sólo han sido publicados datos del zebrafish en cuanto a su ciclo de vida para algunos ECDs: etinilestradiol (EE2) (Nash et al., 2004; Fenske et al., 2005; Schafers et al., 2007), BPA, 4 tert-octilfenol (Segner et al., 2003a, b) y fitosteroles (Nakari y Erkooma, 2003). En estos estudios se ha observado que la exposición crónica a sustancias estrógenicas en el zebrafish indujo síntesis de VTG, crecimiento alterado, retraso en la maduración, diferenciación y proporción sexual alterada, además de fecundidad y éxito de fertilización reducida (Nash et al., 2004; Fenske et al., 2005; Schäfers et al., 2007).

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

### Morfología gonadal en el zebrafish

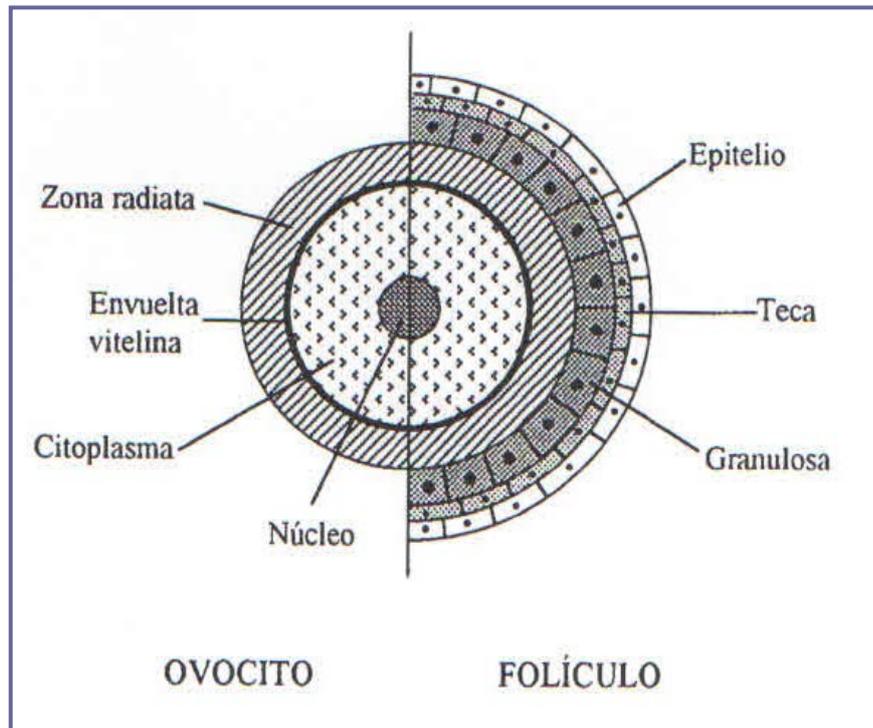
#### Ovarios

Los ovarios tienen como función primordial generar células femeninas u óvulos. En general, la mayoría de los teleósteos, entre ellos el zebrafish, poseen un ovario bilobulado, aunque en algunas especies ambos lóbulos llegan a fundirse en un órgano único durante el desarrollo temprano.

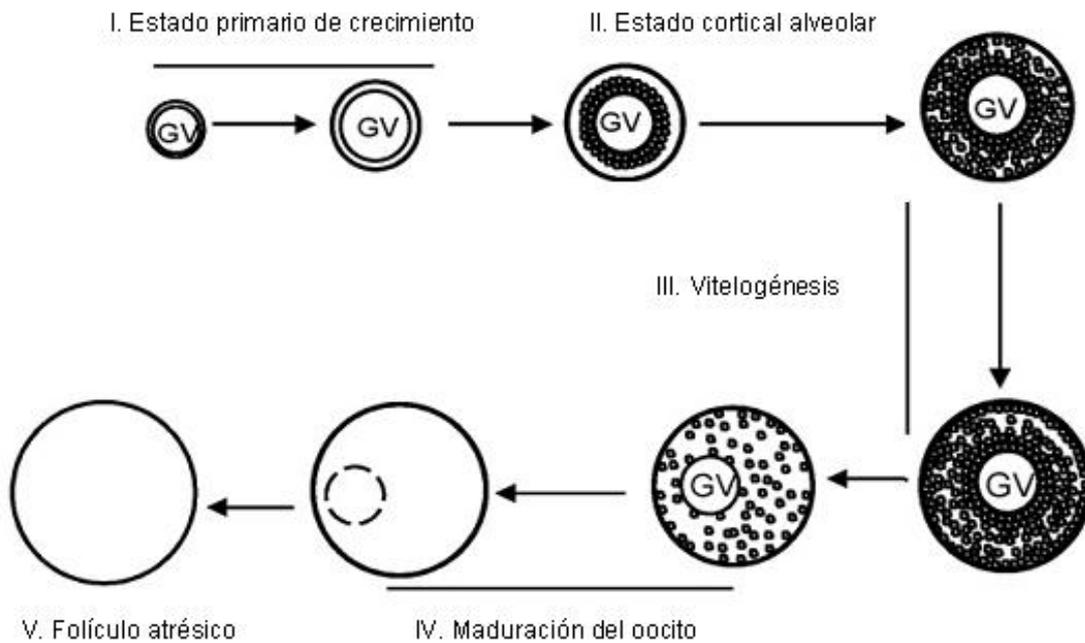
El ovario del zebrafish tiene una morfología coincidente con la estructura típica del ovario de los teleósteos, correspondiendo al tipo cistovárico, donde la luz del ovario se prolonga en un oviducto que termina en la papila o poro genital.

De acuerdo con el patrón de desarrollo de los ovocitos, el ovario del zebrafish se encuadraría dentro del tipo asincrónico (metacrónico) ya que contiene ovocitos en todos los estados de desarrollo, y la puesta de huevos se extiende durante todo el año.

Los folículos ováricos se originan a partir del epitelio germinal y están constituidos por las ovogonias u ovocitos, y por otras células somáticas de función diversa, como las células de la granulosa y las células de la teca, que constituyen la envoltura folicular y que presentan un desarrollo más o menos sincrónico con las células de la línea germinal



El ciclo de crecimiento de los ovocitos en el zebrafish pasa por diferentes etapas (figura 8), tomando como base las características morfológicas más importantes para su identificación, sucediendo este ciclo en un periodo de unos 10 días.



. Diferentes etapas del desarrollo folicular (modificado de Clelland et al., 2007).

El crecimiento del ovocito se clasifica en diferentes fases que van a conformar los diferentes folículos ováricos existentes.

#### Fase I. Estado de crecimiento primario

Esta fase se corresponde con el crecimiento primario del ovocito. El ovocito de menor grado de desarrollo encontrado es denominado ovocito con cromatina y

nucleolo. Los ovocitos empiezan a aumentar de tamaño y comienzan a formarse los folículos.

Se distingue por presentar poco citoplasma, fuertemente basófilo y dispuesto de forma homogénea. El núcleo es grande y esférico y en su interior se encuentran los nucleolos. En la periferia del ovocito se encuentra en contacto con las futuras células foliculares y las envueltas típicas del folículo, las cuales en esta fase aún no se distingue.

### Fase II. Estado cortical alveolar

Durante este periodo, aparecen los alveolos corticales, que dan nombre a esta segunda fase. Son unas vesículas esféricas compuestas de mucopolisacáridos y glicoproteínas, que forman un anillo alrededor del núcleo y liberan su contenido al espacio perivitelino en el momento de la fecundación. Los ovocitos primarios, antes de iniciarse la etapa de vitelogénesis, experimentan una serie de transformaciones que afectan al núcleo, al nucleolo y al citoplasma: el ovocito comienza un período de crecimiento y aparecen múltiples nucleolos que suelen situarse en la periferia del núcleo (estado perinucleolar).

### Fase III. Vitelogénesis

La fase de vitelogénesis está caracterizada por la acumulación de material de reserva en forma de vitelo. El crecimiento del ovocito implica la captación de los

derivados de una glicolipofosfoproteína formada en el hígado en respuesta a los estrógenos endógenos, la VTG, y su incorporación en los gránulos de vitelo. La VTG llega a la superficie del folículo y atraviesa la envoltura folicular y la membrana plasmática del ovocito, llegando hasta el citoplasma. Los gránulos de vitelo van a ir aumentando progresivamente en número y tamaño, hasta ocupar totalmente el citoplasma. La vitelogénesis es el principal evento responsable del enorme crecimiento del oocito. Los oocitos deben alcanzar un cierto valor mínimo antes de entrar en el desarrollo vitelogénico y la absorción de la VTG.

### Fase IV. Maduración del ovocito

Esta fase representa la fase final de formación y maduración de los folículos ováricos. La maduración del ovocito tiene lugar antes de la ovulación. El primer suceso indicativo de la maduración es la migración del núcleo o vesícula germinal hacia el polo animal. A continuación, tiene lugar la ruptura de la vesícula germinal, la condensación de los cromosomas y la emisión del primer corpúsculo polar. Los gránulos de vitelo y las vacuolas lipídicas sufren coalescencia. Como consecuencia de todos estos fenómenos, el ovocito adquiere un aspecto translúcido. Previo a la ovulación, las conexiones microvellosas entre el oocito y las células de la granulosa se rompen, una serie de enzimas digieren la capa folicular y la contracción del folículo permite la liberación del ovocito. Por lo tanto, la ovulación es la liberación del ovocito al lumen del ovario, y supone la separación del óvulo de la envuelta folicular.

### Fase V. Fase de atresia

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

La fase de atresia supone la degeneración y absorción de los ovocitos en cualquiera de las fases de su desarrollo. La atresia es un proceso que ocurre de forma natural en el ovario, aunque también puede estar provocado o amplificado por estrés ambiental o por deficiencias hormonales.

Se trata de un fenómeno fisiológico en el ovario de animales vertebrados bajo condiciones naturales y experimentales (Saidapur, 1978), aunque se da en un bajo porcentaje de folículos. Este mecanismo es un proceso muy regulado y esencial para el mantenimiento de la homeostasis ovárica; en peces se ve generalmente al final de cada ciclo reproductivo (Krysko et al., 2008). En los folículos atrésicos el contenido celular se reabsorbe y las células foliculares se colapsan, formándose una masa celular que terminará por desaparecer del ovario.

En relación a su presentación, los folículos atrésicos es más común que se produzcan en folículos que se encuentran en la última fase vitelogénica o en la fase correspondiente a la maduración /ovulación y, aunque de forma más improbable, también pueden afectar a folículos no maduros que se encuentren en las primeras fases de división y crecimiento (OECD, 2009).

La formación del ovario de los peces varía en general con el de los mamíferos en la constitución de los ovocitos, sin embargo, para su exposición, son numerosos los autores que plantean las diferentes fases en cinco folículos ováricos:

- Primordiales (estado de crecimiento primario)
- En transformación (estado alveolar cortical)

## REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

- En crecimiento (fase de vitelogénesis)
- Maduros (fase de maduración del ovocito)
- Atrésicos (fase de atresia).

## Material y métodos

---

Para el presente estudio se utilizaron 120 zebrafish (*Danio rerio*) hembras, de unas 16 semanas de edad, con un peso medio de  $0,568 \pm 0,139$  gramos y una longitud media de  $4,173 \pm 0,239$  centímetros, en buen estado de salud y libres de malformaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento experimental se realizó en el Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, centro registrado como establecimiento de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación y otros fines científicos cumpliendo con el Real Decreto 199/2005 de 20 septiembre y siguiendo en todo momento las directrices del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Previamente a la experiencia, los peces se sometieron durante 2 semanas a un periodo de aclimatación en condiciones idénticas a las que posteriormente utilizaremos en nuestra experiencia (pH: 7-8; temperatura del agua:  $26\pm 1^{\circ}$  C; dureza: 50-250 mg  $\text{CaCO}_3$ ). El fotoperiodo utilizado para los peces fue de 16 horas luz: 8 horas oscuridad. Durante toda su estancia los animales fueron alimentados 2 veces al día, por la mañana y por la tarde (Supervit<sup>®</sup> minigranulado compuesto de: pescado y subproductos de pescado, cereales, extractos de proteínas vegetales, moluscos y crustáceos, carnes y subproductos animales, levaduras, subproductos de origen vegetal, algas, aceites y grasas, sustancias minerales, vitamina A6 500 IU/kg, vitamina E 190 mg/kg, proteína bruta 48%, materias grasas brutas 8,5%, celulosa bruta 3,5%, cenizas brutas 10,5% y humedad 8%).

Antes del inicio de la experiencia, los peces fueron separados por sexos, el sexaje se realizó mediante las características fenotípicas específicas. El zebrafish hembra posee un abdomen más abultado y redondeado y carece de un tinte rojizo a lo largo de



zebrafish hembra

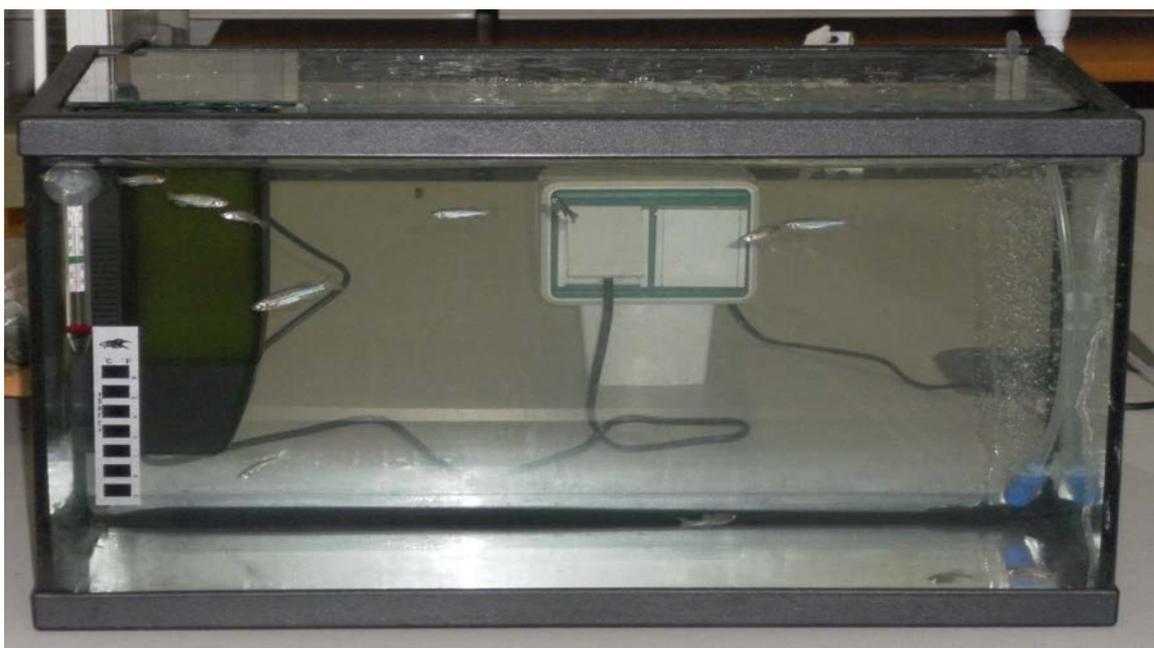
Una vez realizado el sexaje, los animales se introdujeron al azar en acuarios de 25 litros en 5 grupos 12 y 12 hembras a diferentes concentraciones de dioxina, grupo control, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  (tabla 4). Las condiciones a las que se encontraba el agua de estos acuarios era la misma a la utilizada en el periodo de aclimatación, para evitar cualquier tipo de estrés o cambio de comportamiento.

La dioxina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St. Luis, EE.UU.) se les administró a los animales disuelto en el agua, durante 14 días siguiendo las directrices de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) número 204: "Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study" a través de un flujo continuo regulado por bombas peristálticas programadas (GHL<sup>®</sup> EL09819) que renovaban a intervalos regulares de tiempo (10-12 renovaciones/día) la solución formada por la dioxina y el agua. Distribución de los peces en los acuarios.

## MATERIAL Y MÉTODOS

ACUARIO	DOSIS BPA	NºHEMBRAS	Nº HEMBRAS	TOTAL
1	CONTROL	12	12	24
2	1µg/l D	12	12	24
3	10 µg/l D	12	12	24
4	100 µg/l D	12	12	24
5	1000 µg/l D	12	12	24

Los acuarios contaban en su interior con un filtro interno (Eheim modelo Pick Up 2006-02<sup>®</sup>) que mediante un motor, aspiraba el agua y la transportaba a través de una esponja filtrante, para a continuación el agua limpia volver a ser conducida al interior de la pecera a través de un difusor ajustable; además, en cada acuario colocamos un termómetro de cristal con ventosa (Ica ka 21<sup>®</sup>), para controlar la temperatura, y un aireador (Sonic silent powerful 9905<sup>®</sup>) que consistió en un sistema que producía burbujas por medio de un motor, que distribuye de manera uniforme el oxígeno, mejorando la captación de éste por parte de los peces y facilitándoles el intercambio gaseoso (figura 11).



Acuario de peces con el filtro interno y el aireador.

Con el fin de asegurarnos de que las concentraciones de dioxinas no variaban a lo largo del experimento, se tomaron diariamente y siempre a la misma hora, muestras de los acuarios, las cuales se congelaron para realizar posteriormente la medición de los niveles de dioxina en el agua mediante la técnica LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas).

Después de las 2 semanas de exposición, todos los animales fueron eutanasiados según las recomendaciones de FELASA (Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio), con una solución del anestésico MS-222<sup>®</sup> (tricaína metano sulfonato, CAS: 886-86-2) a una concentración de 100-500

## MATERIAL Y MÉTODOS

mg/l y bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$  CAS: 144-55-8) a una concentración de 300 mg/l para reducir la irritación de las membranas mucosas y el daño tisular que pudiera producir el MS-222. Se sexaron, se midió la longitud y se pesaron, e inmediatamente se diseccionaron 6 y 6 hembras de las que se extrajeron las gónadas para su estudio histopatológico y morfométrico.

El resto de peces, tras el sacrificio, fueron macerados por lote y por sexo para el posterior estudio de la dioxina mediante la técnica LC-MS/MS, y de la VTG mediante un kit inmunoenzimático ELISA. El macerado del cuerpo entero de los peces se realizó con un homogeneizador (Ribolyser<sup>®</sup>) a 10.000 G en tubos de 1 ml con bolas de cerámica, utilizando una proporción peso del pez: volumen (50 mM Tris-HCl pH 7,4 y 1% de la proteasa inhibidora (P 8340 Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, MO, USA)) de 1:2. La proteasa inhibidora fue utilizada sólo en el caso de la determinación de VTG y no en la determinación de BPA, para evitar la degradación de esta proteína. Para la determinación de la VTG, el homogeneizado fue centrifugado en la centrífuga (Eppendorf Microfuge 5404<sup>®</sup>) durante 20 segundos, a 3.500 revoluciones por minuto, recogiendo posteriormente el sobrenadante en tubos eppendorf. Tanto para la determinación de la dioxina como para la determinación de VTG, las muestras procedentes del homogeneizado del cuerpo entero de los peces fueron congeladas a -80°C.

El análisis de las dioxinas se llevó a cabo sobre las muestras del cuerpo entero de los zebrafish, que fueron descongeladas previamente a realizar determinación de los niveles de dioxinas. Paralelamente a las muestras y para cada lote se preparó:

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Blanco de reactivos: compuestos por 0,5 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura (mili Q), 6 ml de ácido nítrico y 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Muestras a analizar: se tomó 1 gramo de pez homogenizado.
- Muestra adicionada a 5 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra Control negativa y se añadieron 50 µl de la solución de 0,1 ppm de Dioxina. Muestra adicionada a nivel de 5 ppb.
- Muestra adicionada a 10 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra Control negativa y se añadieron 10 µl de la solución de 1 ppm de Dioxina. Muestra adicionada a nivel de 10 ppb.
- Muestra adicionada a 25 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra Control negativa y se añadieron 25 µl de la solución de 1 ppm de Dioxina. Muestra adicionada a nivel de 25 ppb.
- Muestra adicionada a 50 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra Control negativa y se añadieron 50 µl de la solución de 1 ppm de Dioxina. Muestra adicionada a nivel de 50 ppb.
- Añadir a todos los puntos de la serie de trabajo 25 µl de la solución de 1 p.p.m. de dioxina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez preparados el blanco y las muestras adicionadas podemos distinguir tres etapas en la realización de la detección del dioxina: extracción, purificación y detección.

### a) Extracción

- Añadimos 100  $\mu$ l de tampón acetato sódico 2M pH 4,8 y 25  $\mu$ l de  $\beta$ -glucuronidasa a cada una de las muestras y elementos de la serie de trabajo.
- Incubamos en estufa a  $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante al menos 150 minutos.
- Enfriar, añadir 2 ml de agua reactiva tipo I, agitar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Tomar el sobrenadante.

### b) Purificación

- Activar el cartucho de extracción en fase sólida de Oasis HLB con 3 ml de metanol y 3 ml de agua calidad reactiva tipo I.
- Pasar la muestra (sobrenadante) por el cartucho.
- Lavar el cartucho con 3 ml de la solución de (2% de ácido fórmico en agua) 50 %/metanol 50 %.
- Reequilibrar con 3 ml x 2 de agua calidad reactiva tipo I.
- Lavar con 3 ml de la solución (4% de hidróxido amónico) 90

## MATERIAL Y MÉTODOS

%/ metanol 10 %.

- Pasar 6 ml de agua calidad reactiva tipo I (3 ml x 2).
- Secar bien con N<sub>2</sub> para eliminar el agua.
- Acondicionar el cartucho bondelut NH<sub>2</sub> con 3 ml de metanol (1 x 3 ml).
- Acoplar los cartuchos oasis hlb reservados con los cartuchos isolute ya acondicionados (hlc sobre isolute).
- Eluir con 3 ml de metanol (1ml x 3).
- Evaporar los 3 ml de metanol en el TurboVap y llevar a sequedad a 48 ± 5 ° C.
- Disolver el residuo de evaporación con 200 microlitros de acetonitrilo/agua (10/90) y filtrar a través del filtro de 0.45 µm y transferirlo a viales.

### c) Detección por LC-MS/MS

El sistema cromatográfico, debe ser capaz de visualizar la solución patrón de 50 ppb con una relación señal/ruido ≥ 3 para la transición.

- Condiciones instrumentales

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cromatógrafo líquido:

- 1) Temperatura del horno de columna: 40 ° C.
- 2) Flujo: 0,2 ml/min.
- 3) Volumen de inyección: 20 µl.
- 4) Fase móvil: Gradiente.

Tiempo	% A	% B
0,00	90	10
0,40	90	10
5,00	50	50
13,00	50	50
14,00	20	80
18,00	20	80
18,01	90	10
21	90	10

### Condiciones del espectrómetro de masas:

- 5) Ionización negativa.
- 6) Detector 1400 V.
- 7) Gas de secado: 350 ° C.
- 8) Presión del gas de secado: 30 psi.
- 9) Presión del CID: 2-2,1 psi.
- 10) Housing: 60 ° C.
- 11) Manifold: 42 ° C.
- 12) Método de MS-MS: Se trabaja en modo MRM en un sólo segmento en las siguientes condiciones:

## MATERIAL Y MÉTODOS

Analito	Voltaje de capilar	Transición	Energía de colisión
dioxina	- 108 V	227 > 132	24.0 Volts
	- 108 V	227 > 211	18.0 Volts
dioxina– d16	- 112 V	241 > 142	26.5 Volts
	- 112 V	241 > 222	20.0 Volts

Se realizó una curva de calibrado correspondiente a 5, 10, 25, 50

ppb. La ecuación de la curva es  $y=ax+b$ . Siendo:

**X**= Concentración (ppb) del bisfenol manteniendo fija la concentración de bisfenol-d16.

**Y**= Relación entre el área del bisfenol correspondiente a la transición 227>132, y el bisfenol-d16 correspondiente a la transición 241>142.

La concentración final en la muestra en el caso de dos o más replicados será la media de la concentración de los replicados debiendo tener un C.V.  $\leq 2 \times 32$  %. La concentración obtenida en la muestra, deberá estar dentro de los márgenes de la curva de calibrado.

El análisis de la dioxina en el agua, se llevó a cabo sobre muestras de 20 ml de agua recogidas diariamente de los acuarios en los que se encontraban los peces. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta su análisis, atemperándose antes de empezar el análisis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron diversos reactivos, patrones químicos así como material de referencia. Paralelamente, se prepararon unas muestras adicionadas según se describe a continuación. Se prepararon en tubos eppendorf y se pasaron a los viales de microinyección del cromatógrafo.

- Muestras a analizar: se tomaron 940  $\mu\text{l}$  de agua + 10  $\mu\text{l}$  de amoníaco al 0,1 % en agua.
  
- Muestra adicionada a 1 ppb: Se tomaron 940  $\mu\text{l}$  amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de la solución de 0,1 ppm de dioxina. Muestra adicionada a nivel de 1 ppb.
  
- Muestra adicionada a 10 ppb: Se tomaron 850  $\mu\text{l}$  de amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de la solución de 0,1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 10 ppb.
  
- Muestra adicionada a 25 ppb: Se tomaron 700  $\mu\text{l}$  amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de la solución de 0,1 ppm de dioxinas. Muestra adicionada a nivel de 25 ppb.
  
- Muestra adicionada a 50 ppb: Se tomaron 900  $\mu\text{l}$  de amoníaco al 0,1 % en agua y se añaden 50  $\mu\text{l}$  de la solución de 1 ppm de dioxinas. Muestra adicionada a nivel de 50 ppb.
  
- Muestra adicionada a 100 ppb: Se tomaron 850  $\mu\text{l}$

## MATERIAL Y MÉTODOS

amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 100 µl de la solución de 1 ppm de dioxinas. Muestra adicionada a nivel de 100 ppb.

- Añadir a todos los puntos de la serie de trabajo 50 µl de la solución de 1 p.p.m. de dioxinas-d16

La fase de detección por medio de la técnica LC-MS/MS es similar a la realizada para la detección de las dioxinas en las muestras del homogeneizado de los peces..

Para determinar cuantitativamente la VTG se utilizó un ensayo inmunoenzimático ELISA (zebrafish vitellogenin kit ELISA® número V01008402, laboratorios Biosense, en Bergen, Noruega) específico para el zebrafish. Este ELISA está optimizado para el análisis de las muestras del homogeneizado del cuerpo entero, aunque también puede utilizarse en otros tipos de muestra como el plasma sanguíneo.

Para la realización de la determinación de la VTG, previamente se descongelaron los tubos eppendorf que estaban a -80° C y, que contenían el sobrenadante procedente del macerado de los peces que habíamos realizado tras el sacrificio. Debido a la inestabilidad de la molécula de VTG, durante toda la realización

de la técnica ELISA, tanto las muestras de homogeneizado de los peces como la VTG patrón, estuvieron mantenidas en hielo picado.

En la determinación de la VTG se utilizó:

- A) Una microplaca pretratada de 96 pocillos
- B) 2 tabletas de PBS (fosfato buffer salino)
- C) 1 tableta de PBS/Tween
- D) 2 gramos de suero bovino de albúmina (BSA)
- E) 1 vial que contiene el anticuerpo revelador
- F) 1 vial que contiene el anticuerpo secundario
- G) 1 tableta del sustrato OPD-peroxidasa
- H) 1 vial del patrón de la VTG de zebrafish

- Preparación de los buffers/reactivos

En primer lugar se preparó la dilución buffer que contenía PBS (fosfato buffer salino) y suero bovino albúmina al 1%, contenidos ambos en el kit, en un volumen de 100 ml de agua, y permaneciendo almacenado en refrigeración hasta su uso. Después se preparó el buffer lavador (PBS 0,05% Tween-20) el

cual se diluyó en un volumen de 1 litro de agua destilada refrigerándolo hasta su uso.

- Preparación de las diluciones de las muestras y los patrones

1) Se realizó la solución del patrón de VTG, disolviendo el contenido de un vial de VTG patrón de zebrafish en un volumen de 1 ml de la dilución buffer (solución stock). Posteriormente se realizaron por duplicado una serie de diluciones para así poder establecer la recta patrón. Se preparó la primera dilución de la recta patrón diluyendo 50  $\mu$ l de la solución stock en un volumen apropiado de dilución buffer consiguiéndose así una solución de 125 ng de VTG de zebrafish/ml. La serie patrón incluyó 11 diluciones más, hasta finalizar con una concentración de 0,12 ng de VTG de zebrafish/ml.

2) Se hicieron las diluciones de las muestras homogeneizadas, tal y como recomendaba la técnica ELISA, dado el amplio rango de niveles de VTG encontrados en los estudios experimentales, se realizaron tres diluciones diferentes de cada muestra. Las diluciones fueron 1: 500 (añadiendo 5  $\mu$ l de muestra y 2495  $\mu$ l de dilución buffer), 1: 30.000 (añadiendo 10  $\mu$ l de la dilución 1: 500 a 590  $\mu$ l de dilución buffer) y 1: 1.800.000 (añadiendo 10  $\mu$ l de la dilución 1: 30.000 a 590  $\mu$ l de la dilución buffer).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La disposición del control negativo, el patrón de VTG y las muestras en la microplaca fue la siguiente:

NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P1	P12	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3

P1 Disposición del control, el patrón y las muestras en las microplaca.

P1 **NSB: Control S1-S11: Diluciones patrones 1-11 (0,12-125 ng/ml VTG)**

La adición de las alícuotas en la placa se realizó añadiendo 100  $\mu$ l de la dilución buffer a los dos pocillos control (NSB), 100  $\mu$ l por duplicado de cada dilución del patrón de VTG de zebrafish, 100  $\mu$ l por duplicado de cada dilución de las muestras, después se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Incubación del anticuerpo revelador

Se realizó una dilución 1: 350 del anticuerpo revelador, añadiendo 31  $\mu$ l a 11 ml de la dilución buffer. A continuación, lavamos la placa 3 veces consecutivas utilizando en cada lavado 100  $\mu$ l de la dilución buffer, la cual habíamos preparado al comienzo de la técnica, utilizando para ello un lavador de microplacas (Dynex ultra wash plus<sup>®</sup>, figura 12). Por último, se añadió 100  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo revelador a todos los pocillos, tras lo cual se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.



. Lavador de microplacas.

- Incubación del anticuerpo secundario

Se realizó una dilución 1: 2.000 del anticuerpo secundario añadiendo 6  $\mu$ l a 12 ml de dilución buffer. Se lavó de nuevo la placa con 300  $\mu$ l de buffer de lavado. Se añadieron 100  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo secundario a todos los pocillos, volviendo a incubar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Visualización de la placa

Finalmente, para terminar la técnica, se preparó la solución sustrato (OPD-peroxidasa<sup>®</sup>), contenida en el kit. Lavamos la placa 5 veces consecutivas utilizando en cada lavado 100  $\mu$ l de la dilución buffer. A continuación, añadimos 100  $\mu$ l de la solución sustrato a todos los pocillos e incubamos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, añadimos 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción, y tras 5 minutos de incubación leímos la absorbancia a 492 nm en el lector de microplacas (Asys Expert 96<sup>®</sup>, figura 13).



Lector de microplacas.

El lector de microplacas nos dio un valor de absorbancia por cada pocillo de la placa, y estos valores son los que, posteriormente, utilizamos para realizar los siguientes cálculos:

- Preparación de la recta patrón

Para determinar el rango de absorbancias con el que íbamos a realizar la recta patrón, tuvimos en cuenta que:

- b) El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de nuestra recta de regresión debía ser siempre mayor de 0,990. Si el valor de ( $R^2$ ) era menor de 0,990, excluimos los puntos que se salían de la recta, hasta obtener un valor de ( $R^2$ ) superior a 0,990.
- c) Los puntos que se desviaban claramente de la recta de regresión, no se incluyeron, incluso si el valor de ( $R^2$ ) estaba por encima de 0,990.
- d) Los puntos con valores de absorbancia que se encontraron por debajo de 0,020, no se incluyeron en la recta de regresión.

- Cálculo de las concentraciones de VTG en las muestras

Para calcular las concentraciones de VTG, sólo tomamos las diluciones con valores de absorbancia que entraban dentro de nuestro rango de trabajo de la recta patrón. Si más de una dilución de una misma muestra cumpliera este requisito, habría que calcular la media de la absorbancia de VTG de cada una y multiplicar por el correspondiente factor de dilución. El kit también recomendaba que si la media de todas las diluciones de una muestra se salían del rango de trabajo de nuestra recta patrón, esa muestra debería ser analizada de nuevo, pero no fue nuestro caso, ya que en todas las muestras que analizamos, al menos una de las 3 diluciones realizadas entraba dentro de nuestra recta patrón.

Posteriormente aplicamos la fórmula  $y=ax+b$ , calculándose los valores de las concentraciones que se correspondían con las absorbancias seleccionadas, obteniendo así la concentración de VTG de cada muestra correspondiente a un acuario expuesto a una determinada concentración de dioxinas.

### **Estudio histopatológico estructural y ultraestructural**

Tras el sacrificio, las gónadas de 3 machos y 3 hembras de cada lote al azar, se incluyeron para estudiar la histopatología al microscopio óptico y la morfometría y las gónadas de 3 machos y 3 hembras se procesaron para el estudio histopatológico

Mediante microscopía electrónica y morfométrica.

#### Microscopio óptico

Las muestras de las gónadas seleccionadas fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10% a temperatura ambiente, se deshidrataron en escala ascendente de etanol y fueron incluidos en parafina.

Las primeras secciones de cada bloque (4  $\mu\text{m}$ ) fueron teñidas con hematoxilina/eosina para su estudio morfométrico e histopatológico. Los cortes fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Leitz Ortholux.

#### Microscopio electrónico

Pequeñas muestras de las gónadas fueron fijadas en glutaldehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) a 4 °C durante toda la noche y, posteriormente refijadas en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH

7.4) durante 30 minutos. Después de la deshidratación en escala ascendente de alcoholes e inclusión en Araldita, los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes para el estudio ultraestructural fueron estudiados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

### Procedimientos morfométricos y estereológicos

El estudio cuantitativo se llevó a cabo mediante un sistema de análisis de imagen constituido por un microscopio triocular Leitz Ortholux conectado con un sistema informático digitalizador de imágenes por medio de una cámara de vídeo SONY SSC-C370P<sup>®</sup> y utilizando el programa informático Visilog 5<sup>®</sup>.

Los cortes histológicos de cada espécimen fueron muestreados de forma sistemática para seleccionar las imágenes microscópicas que fueron digitalizadas con objetivos de 10x (N.A. 0,25) y 40x (N.A. 0,70). En cada sección se capturaron una media de 7 campos, lo que teniendo en cuenta el número medio de secciones por animal (4), contabilizaron una media de 28 campos capturados por órgano.

### Estimaciones morfométricas nucleares

Los parámetros morfométricos incluyeron datos sobre el tamaño de los núcleos de las poblaciones celulares de interés (figura 16). Las estimaciones se realizaron trazando los perfiles de los núcleos a estudiar mediante el cursor del sistema de

análisis. Los datos morfométricos comprendieron los valores sobre los diámetros máximo, mínimo y medio, así como los factores de forma siguientes:

FFELL (*diámetro mínimo / diámetro máximo*) con los valores de 1,00 para el círculo y  $< 1,00$  para las estructuras elípticas.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI<sup>®</sup>), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación típica y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## ***Resultados***

---

Tras las 2 semanas de exposición a la dioxina, todos los peces presentaban un aspecto externo normal, no mostraron variaciones en su tamaño, no se observaron cambios en el comportamiento natatorio ni en la ingesta de la comida. No se produjo mortalidad en ninguno de los acuarios, de la misma forma que no existieron diferencias significativas en los valores medios de peso y longitud de los peces al terminar la experiencia.

## RESULTADOS

Las concentraciones de dioxina en el agua de los diferentes acuarios se mantuvieron prácticamente constantes durante toda la experiencia, con una variación del 10% en relación a las concentraciones basales de dioxina.

### Determinación de dioxina en los peces

Los valores de dioxina obtenidos en los peces aparecen recogidas en la tabla 6 donde se muestran los niveles obtenidos para cada lote.

<b>Concentración dioxina en el acuario (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Nº peces</b>	<b>Concentración BPA en los peces (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>
CONTROL	6	Nd
1 $\mu\text{g/l}$ BPA	6	0,0465 $\pm$ 0,005
10 $\mu\text{g/l}$ BPA	6	0,071 $\pm$ 0,0152
100 $\mu\text{g/l}$ BPA	6	0,57 $\pm$ 0,0340

## RESULTADOS

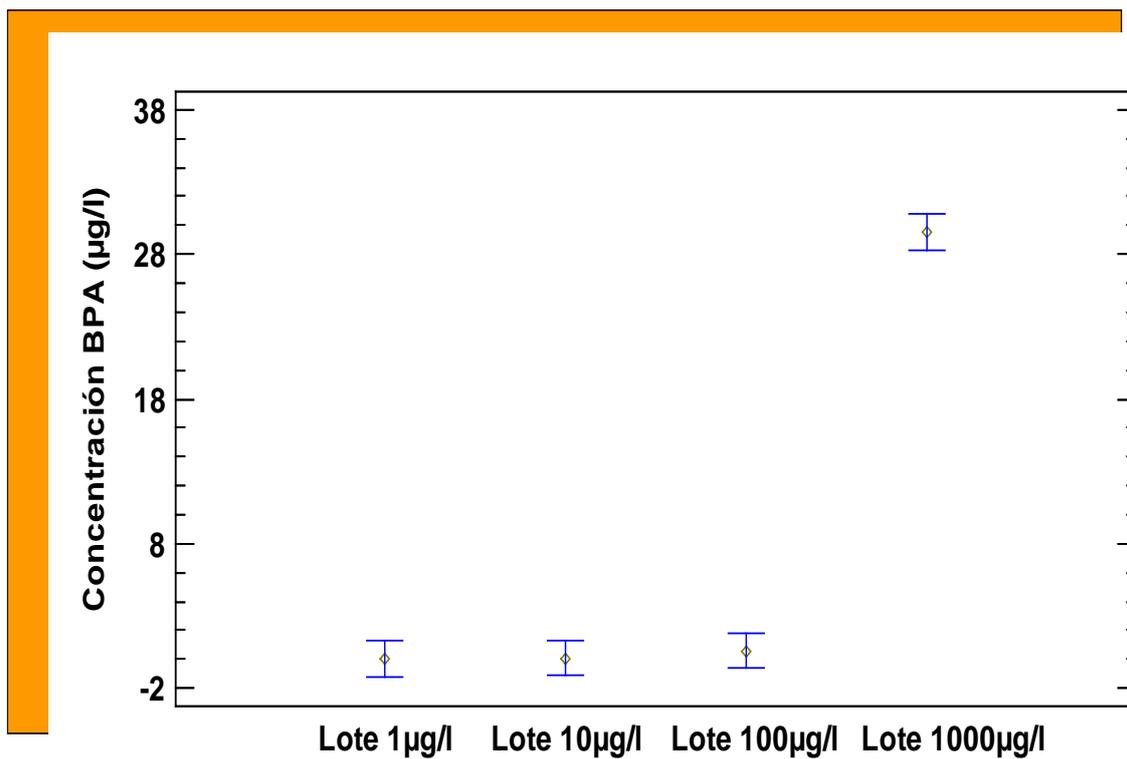
1000 µg/l BPA	6	29,5617±4,076
---------------	---	---------------

nd: no detectable

Medias y desviaciones típicas de las diferentes concentraciones de dioxina en los zebrafish expuestos a las distintas concentraciones en los acuarios.

En los peces expuestos se obtuvieron valores de dioxina frente al lote control en el que no se detectó presencia del mismo. Los valores obtenidos de dioxina en los peces están correlacionados con la concentración de dioxina en el agua a la que estaban expuestos. La función que mejor los representa es una exponencial cuya fórmula está incluida en la grafica.

## RESULTADOS



Medias de las diferentes concentraciones de dioxina en los acuarios.

Existe una correlación entre los niveles de dioxina determinados en los peces, y la concentración de dioxina a la que fueron expuestos.

## RESULTADOS

Al realizar la prueba F en la tabla ANOVA, obtenemos un valor de  $p < 0,05$ , por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un nivel del 95 % de confianza.

Al realizar la comparación múltiple entre los lotes, observamos que no existen diferencias significativas al comparar entre ellos los lotes 1, 10 y 100  $\mu\text{g/l}$  de dioxina, mientras que sí existen diferencias estadísticamente significativas de cada uno de ellos al compararlo con el último lote de estudio (1000  $\mu\text{g/l}$ ). Además existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 lotes tratados y el control.

ns: diferencias no significativas al comparar ambos lotes

\*: diferencias significativas al comparar ambos lotes

Comparación múltiple entre los diferentes lotes de estudio y significación de las mismas.

## RESULTADOS

	Control	Lote 1 µg/l	Lote 10 µg/l	Lote 100 µg/l	Lote 1000 µg/l
Control		*	*	*	*
Lote 1 µg/l	*		ns	ns	*
Lote 10 µg/l	*	ns		ns	*
Lote 100 µg/l	*	ns	ns		*
Lote 1000 µg/l	*	*	*	*	

### Determinación de vitelogenina en los peces

Al realizar la lectura de la placa en el lector, nos proporcionó una imagen que se tradujo en unos valores de absorbancia por pocillo.

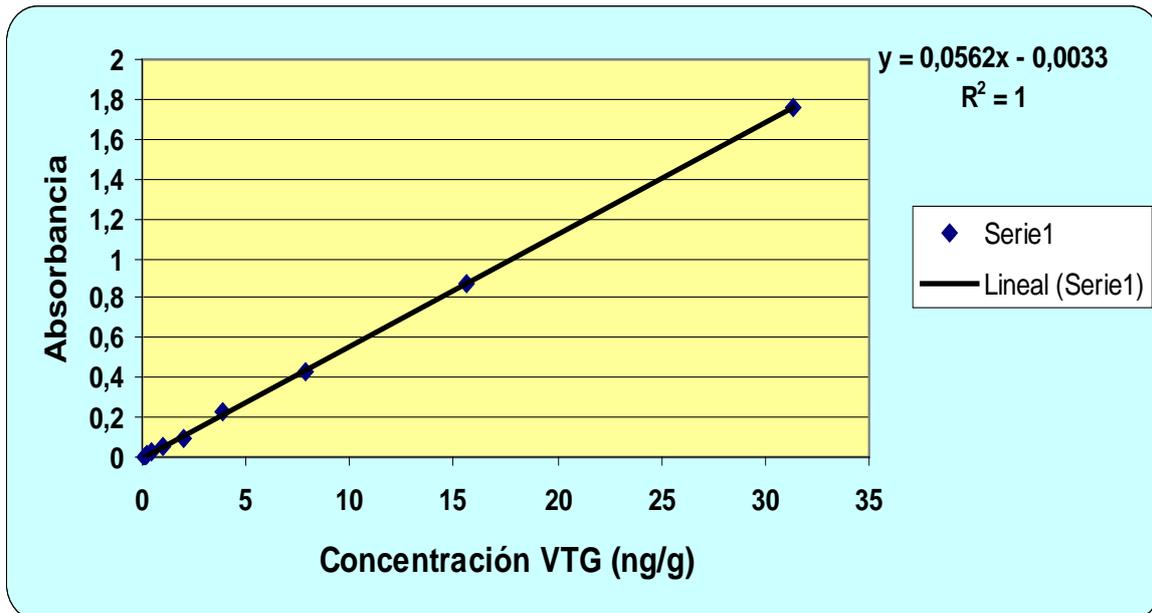
Para realizar el cálculo de las concentraciones de VTG en las muestras, en primer lugar tomamos los datos de absorbancia obtenidos de los pocillos S1-S11 de la microplaca y calculamos la concentración (tabla 8) para así poder realizar la recta patrón del análisis.

Concentración de VTG patrón y sus correspondientes valores de absorbancia.

RESULTADOS

ABSORBANCIA										
3,196	3,002	1,755	0,873	0,434	0,224	0,1	0,051	0,027	0,008	0,04
125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24	0,12
CONCENTRACIÓN VTG PATRÓN (ng/g)										

Las concentraciones obtenidas de VTG de las muestras de peces, se obtuvieron tomando los valores de las absorbancias de la microplaca que se hallaron



Representación de la recta de regresión patrón (concentración vs absorbancia).

mediante la ecuación que aparece en la recta patrón  $y=0,0562x-0,0033$ , donde y=valor de absorbancia; x= concentración de VTG (ng/g), aplicando ésta obtuvimos los valores de concentración de VTG en las muestras de peces según sexo y concentración de dioxina a la que habían sido expuesto.

RESULTADOS

LOTE	CONCENTRACIÓN VTG (ng/g)	
	HEMBRAS 1	HEMBRAS 2
Control	446,42	21.133,93
1 µg/l BPA	1.875,00	4.676.785,60
10 µg/l BPA	5.892,85	8.308.928,50
100 µg/l BPA	755.357,04	9.321.428,50
1000 µg/l BPA	1.189.285,60	11.925.000,00

Concentración de VTG (ng/g) según sexo del pez en función de la concentración de dioxina a la que han sido expuestos.

### **Estudio histopatológico y morfométrico**

En las observaciones macroscópicas de los ovarios realizadas en la necropsia de los peces, se aprecia un aspecto aparentemente normal de estas, tanto en el lote control como en los lotes tratados.

## **Ovarios**

### **Lote control.**

Se trata de un órgano hueco, que presenta una cavidad central o luz, cuyo tamaño varía según la fase del ciclo ovárico. El ovario está formado por un tejido de soporte o estroma ovárico y células de diversos tipos, recubierto de una membrana serosa peritoneal que constituye el epitelio germinal y en cuyo tejido conjuntivo laxo aparecen vasos sanguíneos y terminales nerviosos, así como tejido adiposo.

Bajo la capa serosa se encuentra la túnica albugínea formada por tejido conjuntivo denso, y un manto muscular liso constituido por dos capas, una externa longitudinal y una interna más gruesa y circular. De esta capa muscular parten haces de tejido conjuntivo laxo, que se entremezclan con fibras musculares lisas hacia el interior de ovario, separando las diferentes lamelas ováricas. Las lamelas ováricas son pliegues del estroma que se proyectan hacia la luz del ovario, recubiertas por un epitelio simple plano.

El parénquima del ovario correspondiente al grupo control, estudiados al microscopio óptico y electrónico, muestra imágenes de un amplio desarrollo de sus folículos, exhibiendo una distribución correcta de todos sus elementos. En este grupo control, el intersticio mostró las imágenes típicas de este componente tisular en la especie que estamos estudiando, con presencia de abundantes células conectivas y vasos sanguíneos.

### **Folículos primordiales.**

El folículo primordial es la primera fase de la evolución folicular del ovocito y está integrado por el ovocito recubierto por una capa única de células foliculares planas, que establecen un epitelio simple plano rodeado por una nítida membrana basal.

El ovocito integrante del folículo primordial tiene un núcleo esférico, vesiculoso y de gran tamaño, de situación excéntrica con respecto al citoplasma y un nucleolo muy desarrollado. El citoplasma de los ovocitos tiene una basofilia muy intensa, que al electrónico muestra una imagen de una fortísima densidad electrónica.

Los ovocitos tienen un citoplasma homogéneo y muy basófilo. Destacamos los núcleos, que poseen un gran tamaño, ocupando la mayor parte del citoplasma, apreciándose unos nucleolos patentes. La densidad electrónica disminuye, destacándose los numerosos nucléolos pequeños y de alta densidad-

### **Folículos en transformación**

El paso de un folículo primordial a un folículo en transformación, implica una serie de cambios en el ovocito, en el epitelio folicular y en el tejido conectivo que lo rodea. El inicio del desarrollo viene marcado por un notable aumento en el tamaño del ovocito en relación a los folículos primordiales, ya que está comenzando un periodo de crecimiento que va a implicar al núcleo, al nucleolo y al citoplasma, acompañado por la

## RESULTADOS

transformación de las células epiteliales foliculares desde su forma plana a células cúbicas.

También se producen otra serie de cambios. En las zonas periféricas del citoplasma del ovocito, aparecen las vesículas vitelinas, lo que hace que el núcleo se comprima en la zona central, éste es de un tamaño aún más evidente que en los folículos primordiales, tiene los contornos ondulados y posee una cromatina homogénea y de menor basofilia que el citoplasma. El número y tamaño de los nucleolos se incrementa, aumentado su basofilia y situándose en la periferia del núcleo (estado perinucleolar).

Las vesículas vitelinas, que eran escasas en los folículos primordiales, rápidamente aumentan su número, y como hemos comentado, ocupan todo el citoplasma del ovocito. Estas vesículas tienen una morfología de esférica a oval. Se constituyen por una membrana envolvente nítida y un contenido homogéneo y de escasa acidofilia y densidad electrónica.

Los ovocitos muestran una envuelta externa, homogénea y acidófila, denominada zona pelúcida. En esta fase dicha membrana está en formación, por lo que es estrecha e irregular. La pared folicular, que tiene dos capas, está separada del ovocito por la zona pelúcida.

Los folículos primordiales se integran en las zonas interiores del parénquima ovárico, entremezclándose con el resto de folículos ováricos.

### **Folículos en crecimiento**

Los folículos en crecimiento están formados por el ovocito rodeado por una gruesa membrana pelúcida, formando las células foliculares un epitelio cilíndrico. Se localizan en el seno del parénquima ovárico, junto a los folículos primordiales, siendo un paso intermedio entre los folículos en transición y los folículos maduros

Los núcleos se mantienen en el centro del ovocito, con los bordes ondulados, siendo la cromatina homogénea y de escasa basofilia. En su seno se aprecian numerosos nucleolos que se disponen preferentemente en la periferia del núcleo, aunque también los encontramos en el resto del núcleo. Morfológicamente son esféricos, muy basófilos y electrodensos, y tienen una oquedad en el centro.

La membrana pelúcida rodea totalmente al ovocito. Es muy gruesa y homogénea, con una acidofilia y densidad electrónica manifiestas. El epitelio envolvente está formado por escasas capas, pero se destaca por estar formado por un epitelio de células cúbicas.

### **Folículos maduros.**

Los folículos maduros están constituidos por ovocitos muy transformados en relación al folículo primordial.

## RESULTADOS

Estos folículos poseen una fina envuelta de células planas. Se disponen por todo el ovario, ocupando la mayor parte del mismo, y representan a los ovocitos que en la fase final serán liberados al exterior. En ellos podemos destacar sobre todo el citoplasma, ya que en estos folículos se produce un enmascaramiento del núcleo. El citoplasma está muy bien desarrollado, es de unas grandes proporciones y está ocupado prácticamente en su totalidad por grandes gránulos de vitelo y por vacuolas lipídicas.

La capa pelúcida se mantiene, si bien su grosor ha disminuido notablemente y aunque mantiene su acidofilia, el contorno es irregular. La capa de células foliculares es más delgada, debido a una disminución en el número y el grosor de sus células.

### **Folículos atrésicos.**

En esta fase podemos destacar principalmente la fagocitosis e invasión por parte de las células foliculares de los restos citoplasmáticos del ovocito, produciéndose la atresia y reabsorción de los folículos ováricos con:

- Destrucción del núcleo.
- Plegamiento y disolución de la zona pelúcida.
- Desorganización y licuefacción de las vesículas vitelinas.
- Destrucción de los gránulos lipídicos.

## RESULTADOS

En esta fase de atresia podemos encontrar los centros melanomacrofágicos, cuya presencia se relaciona con la degradación final de los folículos atrésicos.

### **Lote 1 µg/l.**

En este grupo de estudio encontramos todos los folículos que previamente habíamos descrito en el grupo control: folículos primordiales, folículos en transformación, folículos en crecimiento, folículos maduros y folículos en atresia. Todos ellos mantienen la composición y el tipo de células de revestimiento.

Los folículos primordiales mantienen una fuerte basofilia y densidad electrónica en los ovocitos, y como diferencias en relación al grupo control sólo tenemos que mencionar la existencia de ciertas vacuolizaciones en la zona periférica del ovocito. Este tipo de folículo sigue representando el estrato germinal del ovario.

Los folículos en transformación, en comparación al lote control, no muestran signos evidentes de lesión, sólo ciertas vacuolizaciones junto al inicio de formación de la zona pelúcida.

En los folículos en crecimiento, aparecen principalmente numerosas vesículas de vitelo, siendo menos numerosas las gotas lipídicas.

## RESULTADOS

Los folículos maduros son muy numerosos y mantienen su morfología normal, destacándose las numerosas vesículas de vitelo y sobre todo las gotas lipídicas. Finalmente podemos indicar que son escasos los folículos atrésicos.

### **Lote 10 µg/l.**

Como en el caso anterior, en el segundo grupo de exposición también se aprecian con toda nitidez todos los folículos ováricos comentados en el grupo control: folículos primordiales, folículos en transformación, folículos en crecimiento, folículos maduros y también folículos en atresia.

Los folículos primordiales realizan la función de estratos germinales, ya que tras su activación formarán el resto de folículos. Se disponen dispersos por todo el ovario y se destaca la fuerte basofilia de su ovocito.

Los folículos en transformación, están formados por los ovocitos y las envueltas de células foliculares. Los núcleos del ovocito tienen numerosos nucleolos, un citoplasma basófilo y se puede destacar la presencia de vesículas de vitelo iniciando su formación.

## RESULTADOS

Los folículos en crecimiento, muestran una membrana pelúcida muy desarrollada, homogénea y acidófila con abundantes vesículas de vitelos y gotas lipídicas.

Los folículos maduros actúan como almacenamiento de vesículas vitelinas y gotas de grasa, con una membrana pelúcida nítida y algo delgada. En ellos no se aprecia el núcleo del ovocito.

Por último, destacar los folículos atrésicos, con una destrucción parcial de todos sus componentes granulares.

### **Lote 100 µg/l.**

Como en el caso anterior, en el tercer grupo se aprecian con toda nitidez los diferentes tipos de folículos ováricos ya comentados: folículos primordiales, folículos en transformación, folículos en crecimiento, folículos maduros y también folículos en atresia, predominando sobre todo las fases más maduras.

Los folículos primordiales, mantienen su composición y podemos destacar que su citoplasma se encuentra vacuolizado, manteniendo una fuerte basofilia.

## RESULTADOS

Los folículos en transformación tienen los mismos componentes. También podemos apreciar numerosas vesículas en formación.

En los folículos en crecimiento son muy numerosas tanto las vesículas como las gotas lipídicas. En ellos podemos destacar que el núcleo presenta los bordes anfractuosos.

Los folículos maduros presentan abundante contenido vesicular, con una disminución del grosor de la membrana pelúcida.

Son muy numerosos los folículos atrésicos, con desintegración de sus componentes. La atresia incide sobre todos los folículos ováricos.

### **Lote 1000 µg/l.**

De la misma forma que en los grupos anteriores, en éste último también se aprecian con nitidez todos los tipos de folículos ováricos.

Los folículos primordiales mantienen la morfología normal, con la presencia de los ovocitos con un revestimiento de células foliculares.

## RESULTADOS

Los folículos en transformación, presentan la vacuolización del citoplasma, aunque mantienen las vesículas. El núcleo tiene los bordes contorneados y muestra abundantes nucleolos.

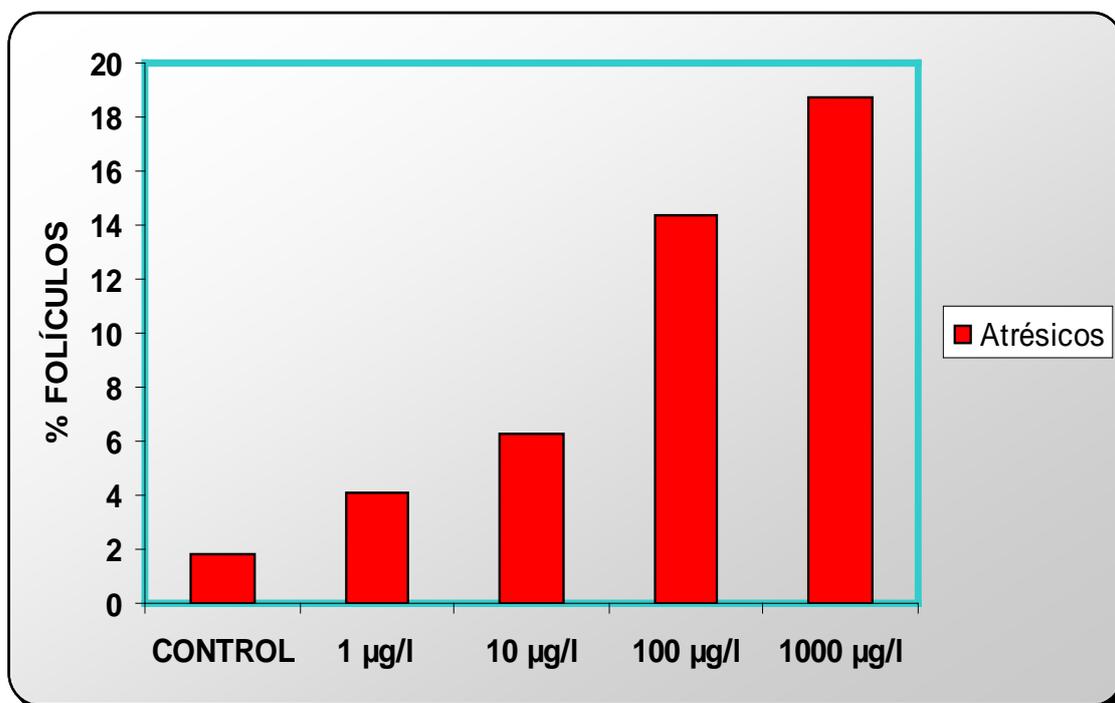
<b>Lotes</b>	<b>Control</b>	<b>Lote 1µg/l</b>	<b>Lote 10µg/l</b>	<b>Lote 100µg/l</b>	<b>Lote 1000µg/l</b>
<b>% Folículos atrésicos</b>	<b>1,8±0,3</b>	<b>4,1±0,8</b>	<b>6,3±1,6</b>	<b>14,4±2,7</b>	<b>18,7±3,5</b>

Tanto los folículos en crecimiento como los maduros presentan un gran desarrollo, con abundantes estructuras granulares, destacando su núcleo basófilo con abundantes gránulos y gotas lipídicas.

En este último grupo de estudio son muy numerosos los folículos atrésicos, con degradación de todos los componentes de los folículos ováricos.

En este lote también podemos destacar una fibrosis intersticial caracterizada por la presencia de tejido conectivo fibroso en el interior del estroma ovárico, además de infiltraciones granulomatosas. Mediante el estudio morfométrico observamos un incremento en el porcentaje de folículos atrésicos a medida que aumentamos las concentraciones de exposición a la dioxina.

## RESULTADOS



Porcentaje de folículos atrésicos en el ovario de las hembras a las diferentes

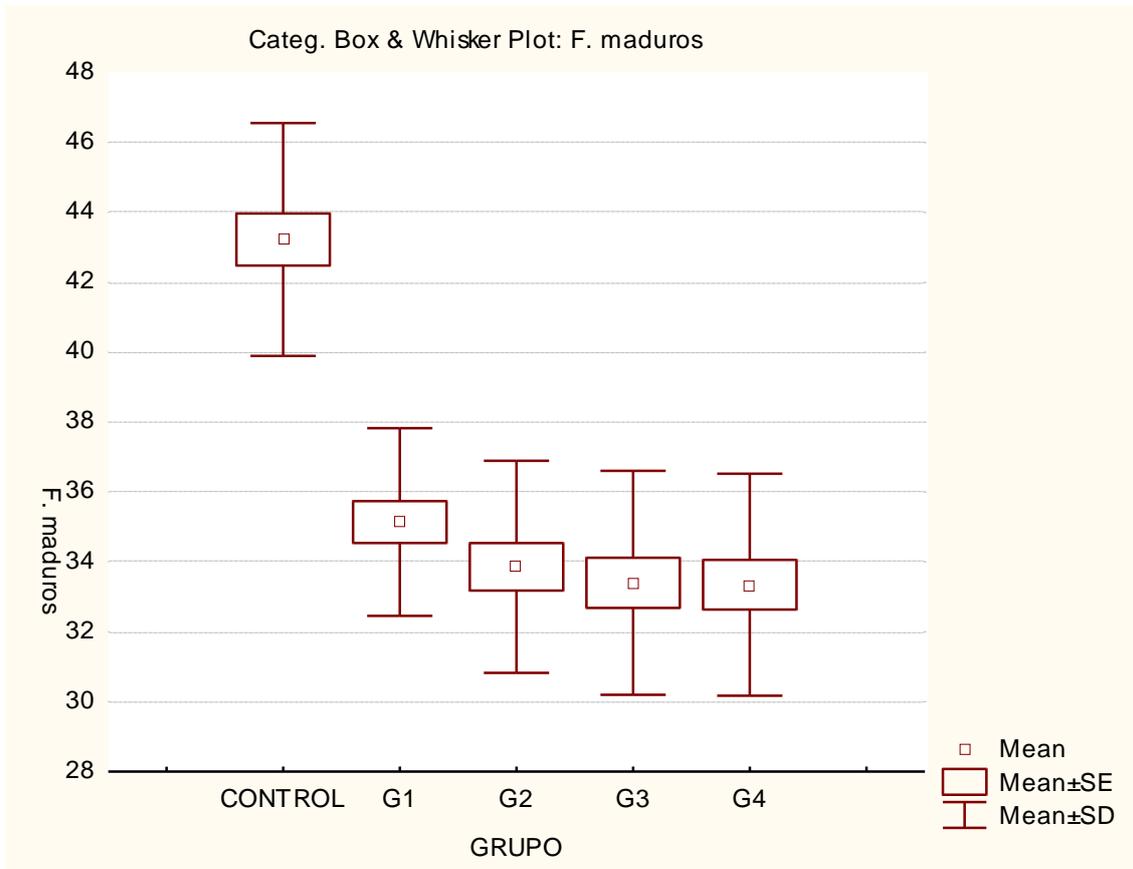
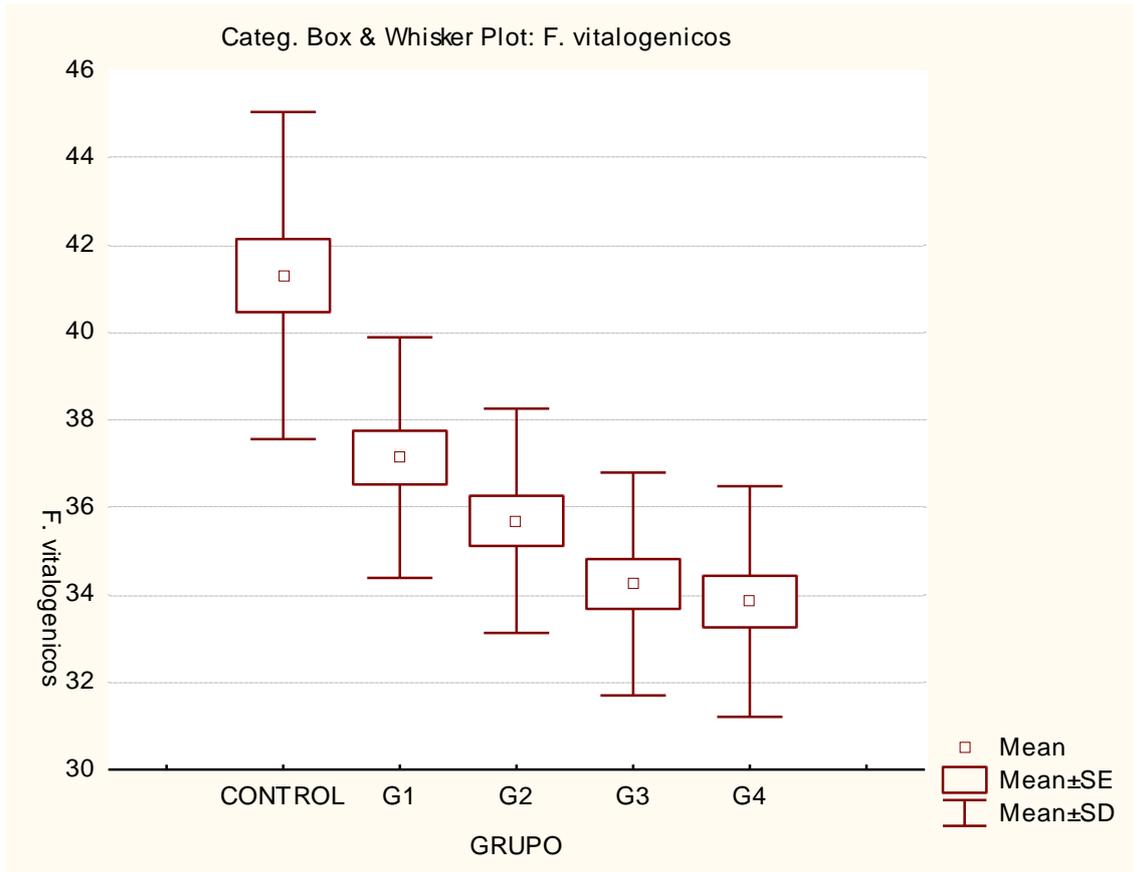
Concentraciones de exposición a la dioxina.

## RESULTADOS

L

## **Tablas**

## RESULTADOS

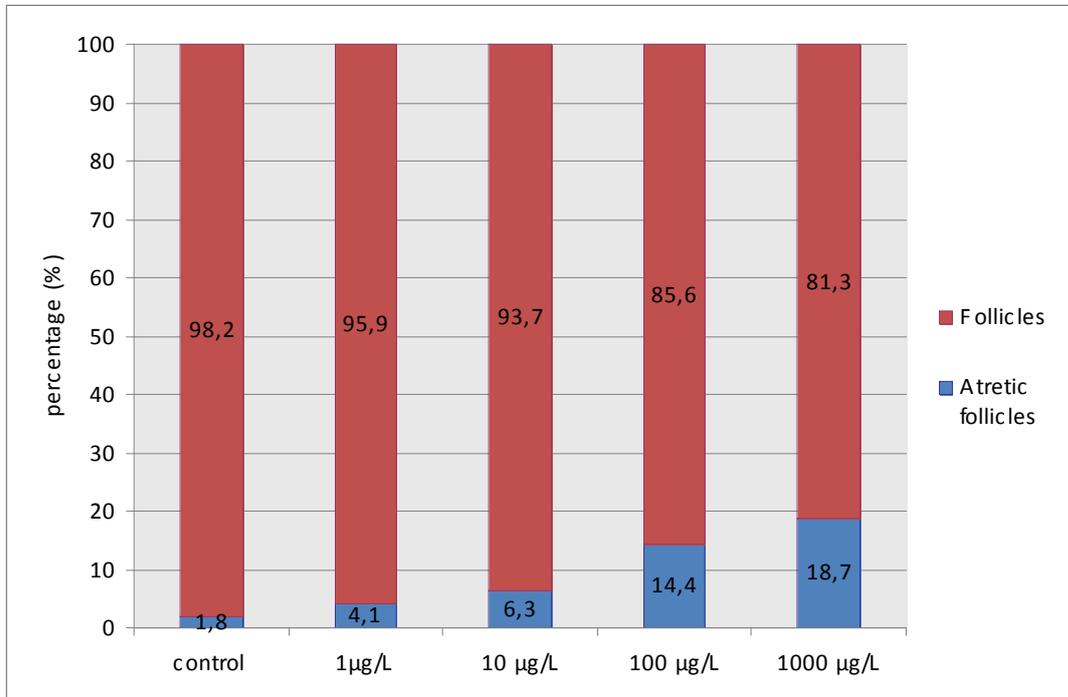
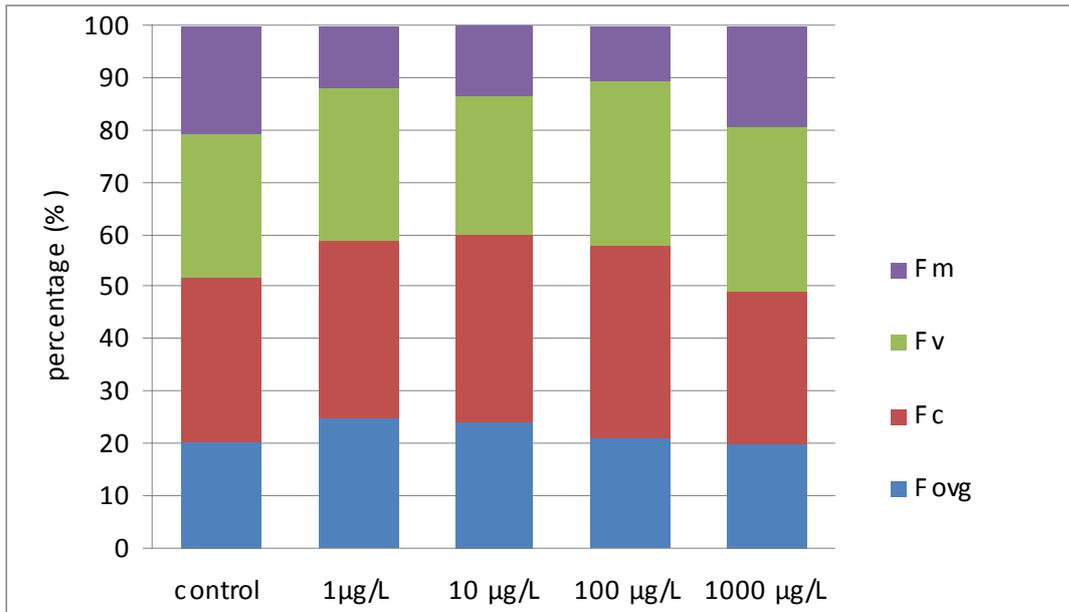


## RESULTADOS

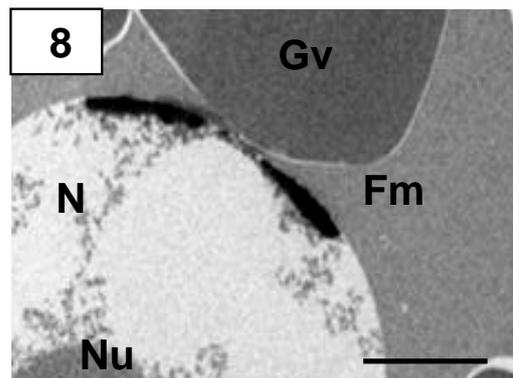
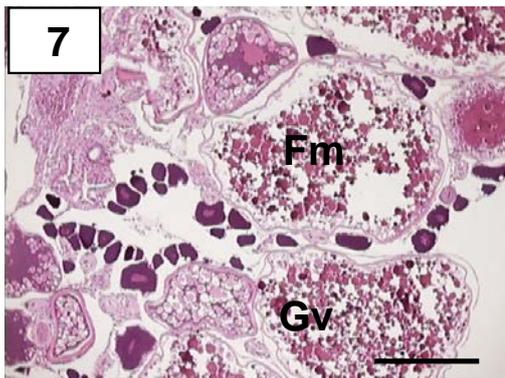
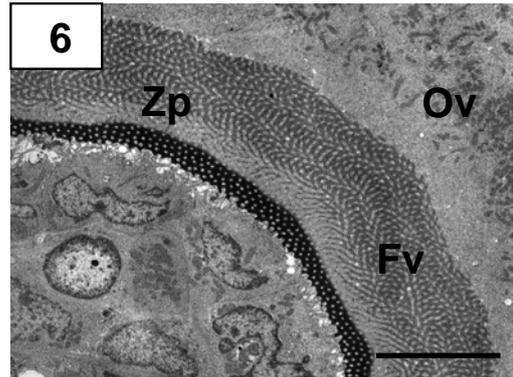
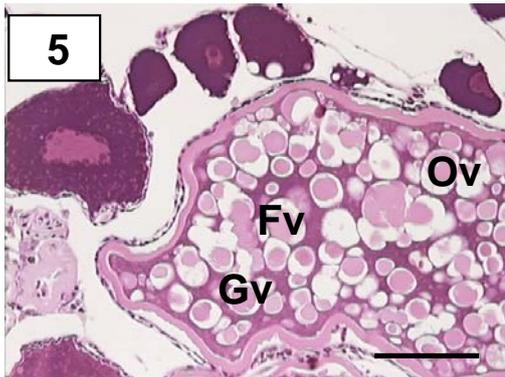
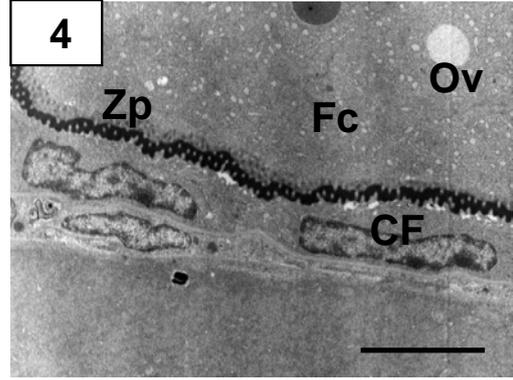
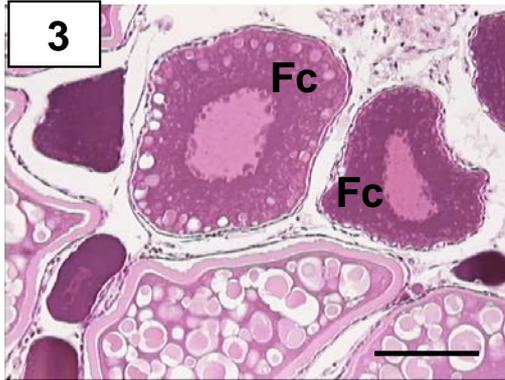
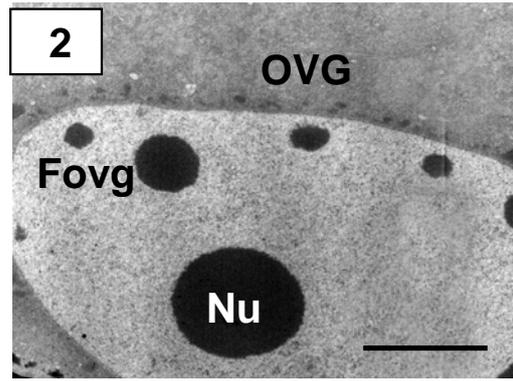
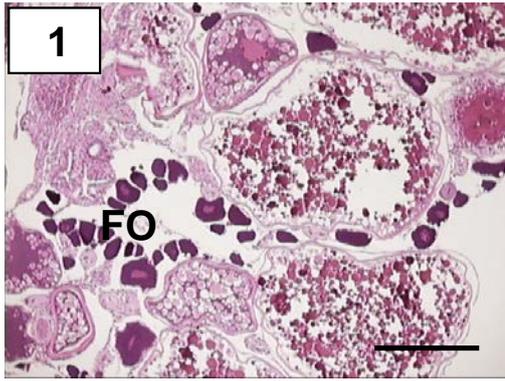
Scheffe Test; Variable: F. primordiales (Ovarios.sta)					
Marked differences are significant at p < ,05000					
GRUPO	(1) M=22,706	(2) M=23,214	(3) M=24,088	(4) M=25,214	(5) M=24,208
CONTROL (1)		0,839643	0,038900	0,000005	0,018727
G1 (2)	0,839643		0,383881	0,000488	0,252095
G2 (3)	0,038900	0,383881		0,145603	0,999201
G3 (4)	0,000005	0,000488	0,145603		0,241688
G4 (5)	0,018727	0,252095	0,999201	0,241688	

dioxinas concentration (µg/L)					
Control	1	10	100	1000	
nd	0.046±0.005 *	0.071±0.015 *	0.570±0.034 *	29.562±4.076 *	

## RESULTADOS

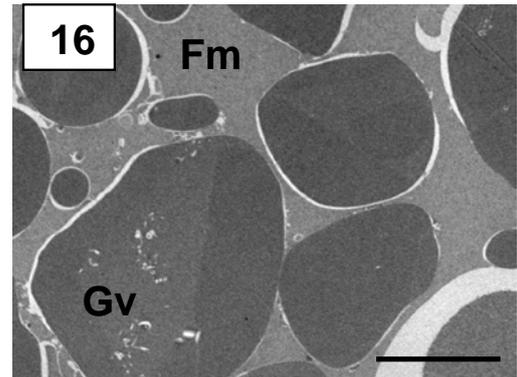
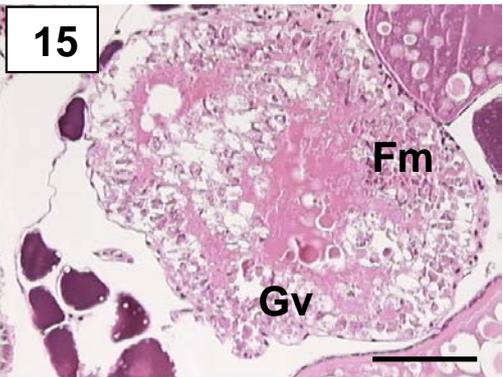
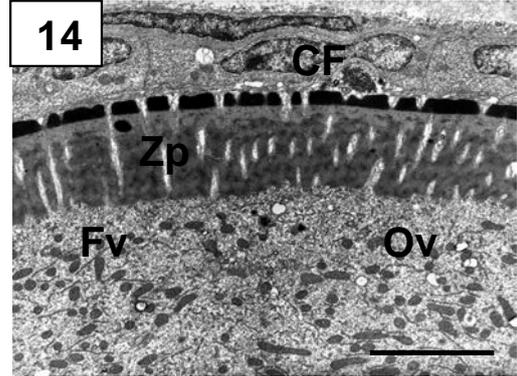
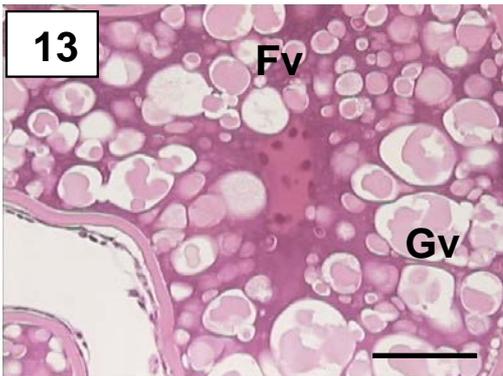
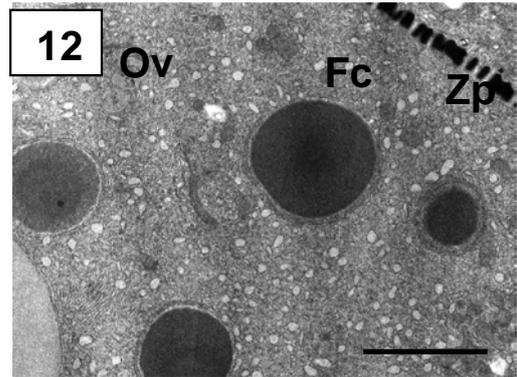
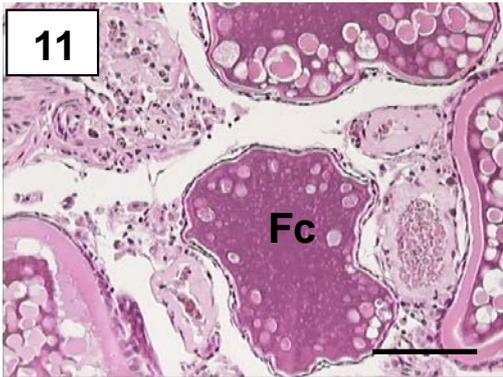
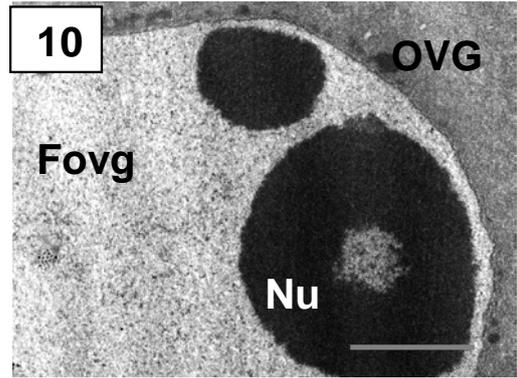
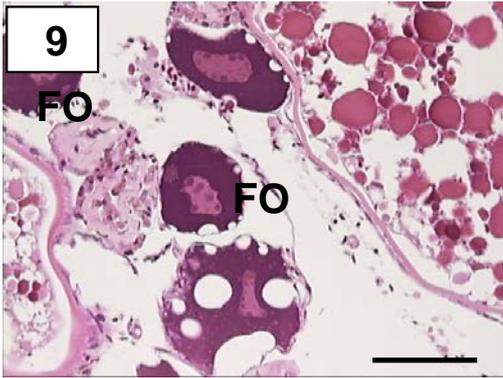


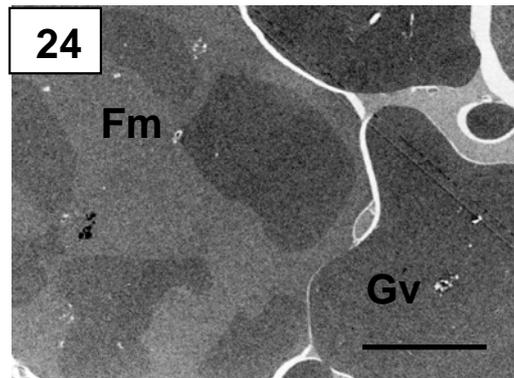
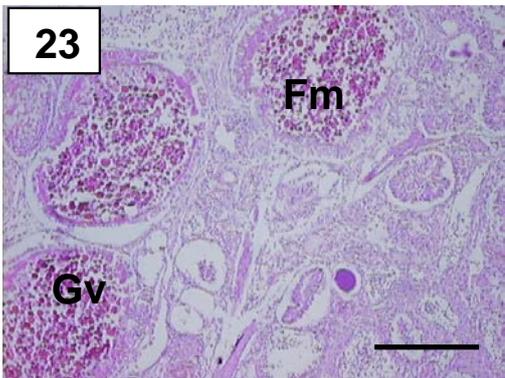
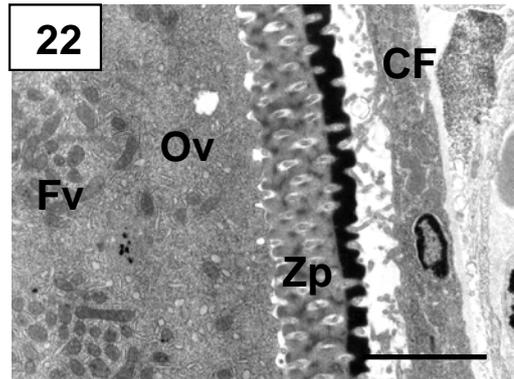
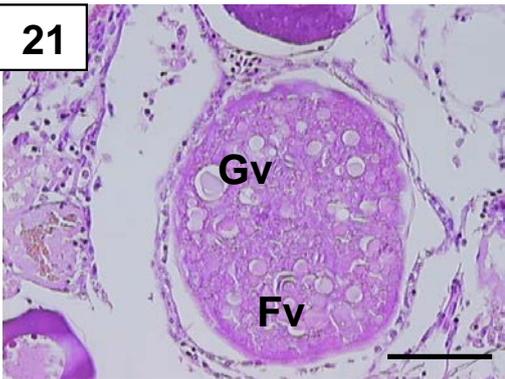
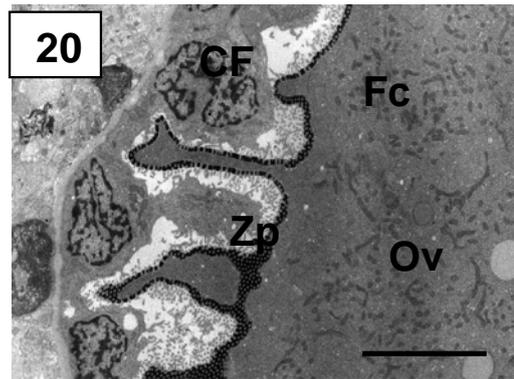
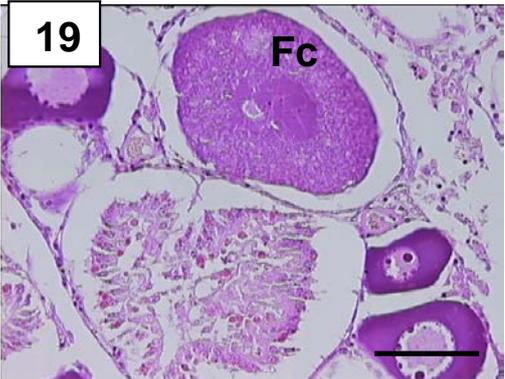
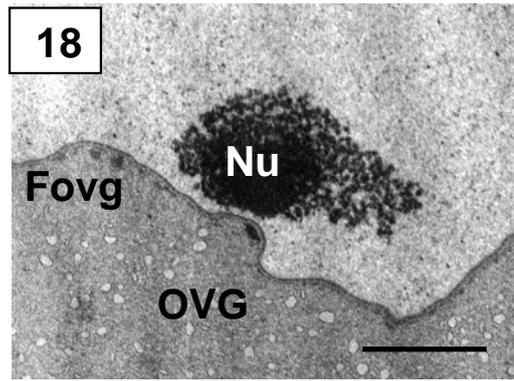
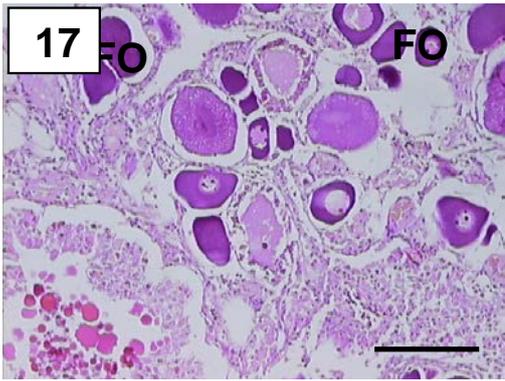
# Iconografía



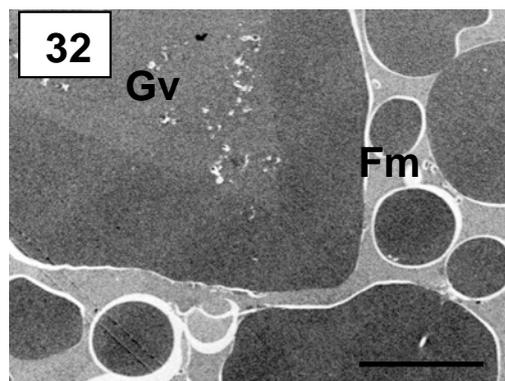
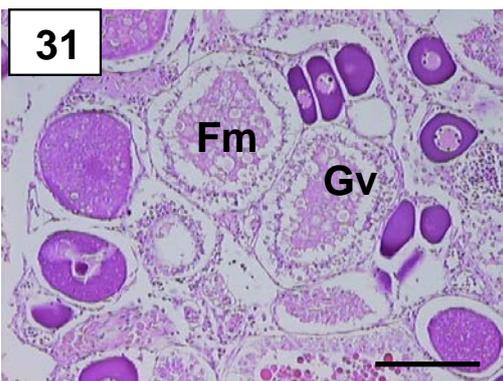
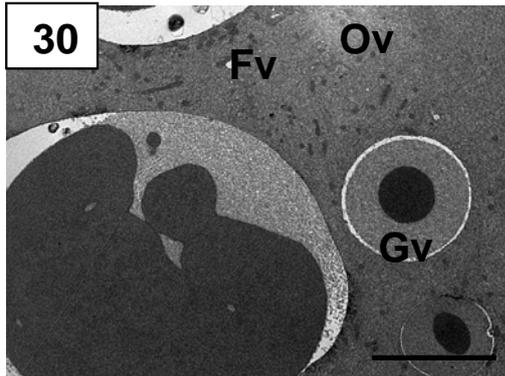
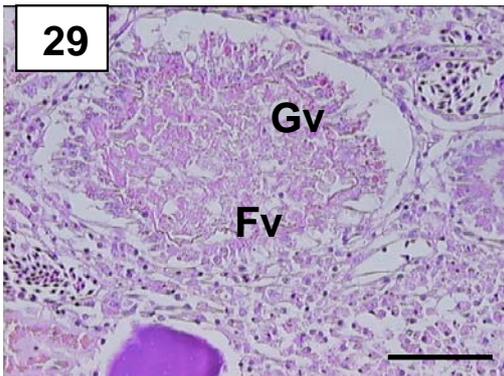
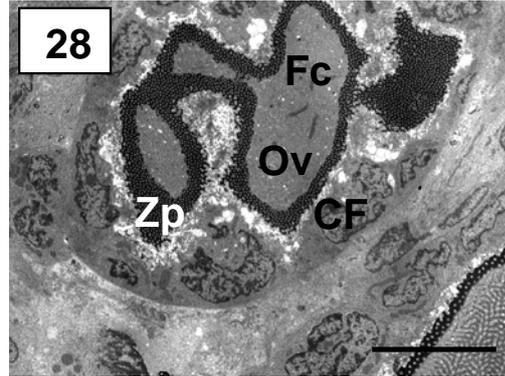
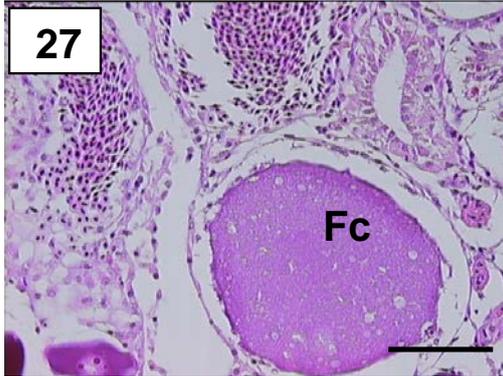
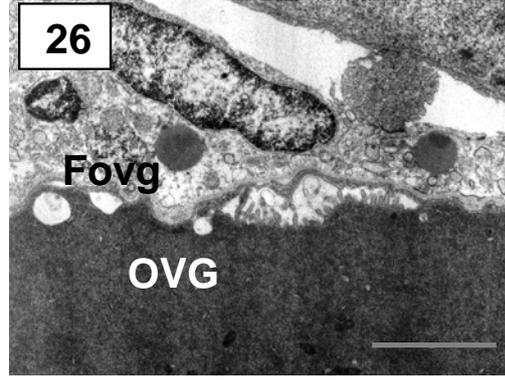
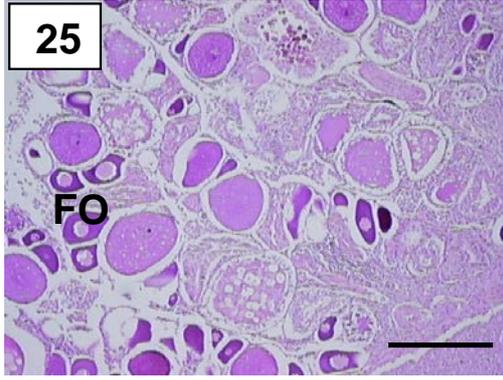
Grupo control y 1°

RESULTADOS





RESULTADOS



# Leyendas.

Figs. 1 al 8.

Grupos control y 1<sup>o</sup>.

Se aprecian al microscopio óptico y electrónico, las imágenes de los diferentes tipos de folículos

Barras del microscopio óptico 50  $\mu\text{m}$  y electrónico 10  $\mu\text{m}$

Figs. 9 al 16.

Grupo 2<sup>o</sup>

Se aprecian al microscopio óptico y electrónico, las imágenes de los diferentes tipos de folículos. En todos los folículos ováricos se destacan modificaciones, y en las figuras 15 y 16 se presenta atresia folicular.

Barras del microscopio óptico 50  $\mu\text{m}$  y electrónico 10  $\mu\text{m}$

## RESULTADOS

Figs 17 al 24.

Grupo 3º

Se aprecian al microscopio óptico y electrónico, las imágenes de los diferentes tipos de folículos. En todos los folículos ováricos se destacan graves alteraciones, y en las figuras 23 y 24 se presenta atresia folicular.

Barras del microscopio óptico 50  $\mu\text{m}$  y electrónico 10  $\mu\text{m}$ .

Figs 25 al 32.

Grupo 4º

Se aprecian al microscopio óptico y electrónico, las imágenes de los diferentes tipos de folículos. En todos los folículos ováricos se destacan graves alteraciones, y la atresia folicular se destacan en todos los folículos.

Barras del microscopio óptico 50  $\mu\text{m}$  y electrónico 10  $\mu\text{m}$

## *Discusión*

---

Las dioxinas constituyen un grupo de compuestos químicos que son contaminantes ambientales persistentes. Las dioxinas se encuentran en el medio ambiente de todo el mundo y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en el tejido adiposo de los animales.

El nombre químico de la dioxina es 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD). El término «dioxinas» se utiliza a menudo para referirse a una familia de compuestos relacionados entre sí desde el punto de vista estructural y químico, constituida por las dibenzo-para-dioxinas policloradas (PCDD) y los dibenzofuranos policlorados (PCDF). Bajo esa designación también se incluyen algunos bifenilos policlorados (PCB) análogos a la dioxina que

## DISCUSIÓN

poseen propiedades tóxicas similares. Se han identificado unos 419 tipos de compuestos relacionados con la dioxina, pero se considera que sólo aproximadamente 30 de ellos poseen una toxicidad importante, siendo la TCDD la más tóxica.

La exposición breve del ser humano a altas concentraciones de dioxinas puede causar lesiones cutáneas, tales como acné clórico y manchas oscuras, así como alteraciones funcionales hepáticas. La exposición prolongada se ha relacionado con alteraciones inmunitarias, del sistema nervioso en desarrollo, del sistema endocrino y de la función reproductora. La exposición crónica de los animales a las dioxinas ha causado varios tipos de cáncer. El Centro Internacional OMS de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) realizó el 1997 una evaluación de la TCDD. De acuerdo con los datos de las investigaciones en animales y los datos epidemiológicos humanos, el CIIC ha clasificado la TCDD como «carcinógeno humano». Sin embargo, no afecta al material genético, y hay un nivel de exposición por debajo del cual el riesgo de cáncer podría ser insignificante.

Hasta hace unos años, se ha considerado a la dioxina como un débil estrógeno medioambiental, debido a que en algunos ensayos, la dioxina resultó de 10.000 a 100.000 veces menos potente que el estradiol (Welshons et al., 2003), utilizándose como afirmación común entre los diversos autores que la dioxina tiene una actividad estrogénica débil en sistemas *in vivo* e *in vitro* (Snyder et al., 2002). Sin embargo, estudios sobre mecanismos moleculares han revelado una variedad de rutas a través de las cuales la dioxina puede estimular una respuesta celular a muy bajas dosis (Welshons et al., 2006).

Los objetivos de nuestro trabajo han sido evaluar a la dioxina como agente alimentario y ambiental, en relación a su capacidad disruptora del sistema endocrino, a

## DISCUSIÓN

través de la evaluación de su cinética tanto en los tejidos animales como en el agua y analizando la información obtenida de diferentes biomarcadores como la proteína hepática VTG, así como la histopatología y morfometría gonadal.

En nuestro estudio hemos utilizado como modelo experimental al zebrafish, una especie de pequeño tamaño, de fácil manejo y bajo coste de mantenimiento, con una gran fertilidad durante toda la vida reproductiva. Los huevos y embriones son transparentes, lo que facilita el estudio del desarrollo de los órganos, y la incidencia de productos químicos en los sistemas orgánicos desde las primeras horas de vida, además de un genoma diploide similar al de los mamíferos con la ventaja que eso conlleva a la hora de realizar estudios genéticos y realizar extrapolaciones al ser humano. En la OECD y en otros organismos oficiales, podemos encontrar multitud de directrices relacionadas con el análisis de sustancias químicas con potencial estrogénico, donde recomiendan el uso del zebrafish como modelo experimental (OECD número 204, 210, 212), así como en el anexo I de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Las concentraciones de la dioxina utilizadas a través de un sistema de flujo continuo en el agua de los acuarios, 1, 10, 100 y 1000 µg/l de la dioxina, son muy similares a las que utilizaron diferentes autores en diversas especies de peces (Lindholm et al., 2000; Sohoni et al., 2001; Tabata et al., 2003; Van den Belt et al., 2003; Ishibashi et al., 2005; Mandich et al., 2007).

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio, encontramos que la dioxina se acumula en los tejidos de los peces, detectando unas concentraciones que van aumentando a medida que la concentración de la dioxina a la que han sido expuestos los peces es mayor. Nuestros valores oscilan desde  $0,0465 \pm 0,005 \mu\text{g/l}$  al ser expuestos a  $1 \mu\text{g/l}$  de la dioxina, hasta valores de  $29,5617 \pm 4,076 \mu\text{g/l}$  a dosis de  $1000 \mu\text{g/l}$  de la dioxina. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Mandich et al (2007) en su estudio en carpas, en el que utilizando las mismas dosis de la dioxina que nosotros obtuvieron unas concentraciones similares, con unos valores de  $0,23 \pm 0,032 \mu\text{g/l}$ ,  $1,79 \pm 0,68 \mu\text{g/l}$  y  $24,47 \pm 10,15 \mu\text{g/l}$ , al exponer a las carpas a dosis de 10, 100 y  $1000 \mu\text{g/l}$  respectivamente, siendo casi idénticas a las obtenidas en nuestro estudio, en zebrafish expuestos a  $1000 \mu\text{g/l}$  de la dioxina; y no llegando a detectar concentración alguna en las carpas expuestas a la dosis de  $1 \mu\text{g/l}$  de la dioxina.

Como ya hemos comentado, la VTG es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (anfibios, aves, peces y reptiles) durante el ciclo de maduración ovárica, bajo el control de regulación endocrina a través del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal, sintetizada por el hígado en respuesta a la circulación de estrógenos endógenos, principalmente el  $17\beta$ -estradiol. Por ello, un aumento de la inducción de VTG en las hembras de peces, así como la simple inducción de VTG en los machos, puede originar repercusiones directas sobre la capacidad reproductiva de los peces (disminución de la producción de gametos, disminución en el número y tamaño de los huevos, fallos en el desove) así como una anormal diferenciación sexual en las larvas de los peces (Kime y Nash, 1999) por ello se utiliza como biomarcador para medir los efectos estrogénicos de diversos compuestos químicos, entre ellos la dioxina (Lindhøst et al., 2000; Van den Belt et al., 2003).

## DISCUSIÓN

En nuestros resultados observamos un aumento de la concentración de VTG en ambos sexos a medida que incrementamos las concentraciones de la dioxina a las que exponemos a los peces, lo que indica una alta correlación entre los valores de VTG y la concentración de la dioxina.

En machos hemos detectado una inducción de VTG con respecto al control en los peces expuestos a dosis de 1 y 10 µg/l de la dioxina en sólo 2 semanas de exposición. Sumpter y Jobling (1995), ya observaron una inducción de VTG al exponer a un cultivo de hepatocitos de trucha arco iris a dosis medioambientales de la dioxina de 1, 5 y 10 µg/l durante sólo 2 días. En nuestros resultados, una gran inducción de VTG sólo la encontramos en machos expuestos a 100 y 1000 µg/l de la dioxina, obteniendo unos valores de 755.357,04 ng/g y 1.189.285,60 ng/g de VTG, respectivamente. Según la clasificación realizada por Mandich et al (2007), los peces que han sido expuestos a estas dos concentraciones serían definidos como vitelogénicos (>11.000 ng/g VTG), y muy vitelogénicos (>1.000.000 ng/g VTG) respectivamente.

En las hembras, los valores de VTG son muy superiores a los valores de los machos en todas las concentraciones de estudio, como cabría esperar, ya que como hemos comentado anteriormente, la VTG es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos. Varios autores han encontrado diferencias entre sexos en relación a la exposición de los peces a diferentes compuestos estrogénicos. Así, Kime y Nash (1999), expusieron durante 2 semanas a zebrafish adultos a diferentes concentraciones de 17-β etinilestradiol (EE2), encontrando que el nivel de inducción de la VTG fue tres veces más alto en las hembras que en los machos.

## DISCUSIÓN

Aunque los niveles de VTG pudieran ser esperados más altos en las hembras que en los machos, al tratar al zebrafish con diversas dosis de EE2, Van den Belt et al (2001) no encontraron ninguna diferencia significativa entre ambos sexos, aunque sí encontraron diferencias significativas al exponer a ambos sexos del zebrafish a 4-tert-octilfenol (OP).

En nuestro estudio, en las hembras, al igual que en los machos, encontramos un aumento de la inducción de VTG en todas las dosis de estudio con respecto al control, aunque sólo en la concentración más alta (1000 µg/l de dioxina), encontramos un gran incremento de los niveles de VTG (11.925.000 ng/g de VTG).

Diversos autores han evaluado el efecto estrogénico de la dioxina en diferentes especies de peces. Ishibashi et al (2005), expusieron a peces medaka (*Oryzias latipes*) machos a dosis de BPA durante 21 días. La exposición a 1000 µg/l de la dioxina provocó un aumentó significativo de las concentraciones de la VTG hepática con respecto al grupo control, coincidiendo con nuestros resultados, no así al exponerlos a dosis de 250 y 500 µg/l de la dioxina, en donde no encontraron un aumento significativo de las concentraciones de VTG en relación a los grupos control.

Lindholst et al (2000) observaron una inducción significativa de la síntesis de VTG en trucha arco iris expuestas a 500 µg/l de la dioxina durante 12 días. Sohoni et al (2001) utilizando un rango de dosis de BPA parecidas a las empleadas por nosotros aunque con un periodo de exposición mucho mayor, concluyeron que el BPA inducía la síntesis de VTG en machos de fathead minnow (*Pimephales promelas*) a concentraciones de 640 y 1280 µg/l después de 43 días y de 160 µg/l después de 71

## DISCUSIÓN

días. En medaka, Tabata et al (2003) observaron aumentos marcados en las concentraciones de VTG plasmática de los machos después de 5 semanas de exposición a 1000 µg/l de la dioxina.

Mandich et al (2007) en su estudio con la dioxina en carpas, encontraron valores de VTG similares a los nuestros al exponer a los peces a dosis de 1 y 10 µg/l de la dioxina, en cambio, observaron unos valores superiores de VTG en las carpas expuestas a las concentraciones de 100 y 1000 µg/l de la dioxina, partiendo de unos valores de VTG similares a los nuestros en los peces control.

En relación a estas diferencias entre especies, Van den Belt et al (2003), en su estudio comparativo entre machos de zebrafish y de trucha arco iris, expusieron a ambos a la acción de un compuesto estrogénico como es el OP durante 3 semanas, observando una inducción de VTG en trucha arco iris a concentraciones de 30 µg/l, mientras que los zebrafish macho son al menos 3 veces menos sensibles que las truchas arco iris, puesto que encontraron una respuesta significativa de VTG en trucha a un nivel de exposición de 30 µg/l de OP, mientras que para el zebrafish un nivel de exposición de 100 µg/l, la máxima dosis de OP a la que expuso a los peces, fue insuficiente para inducir la VTG. Lindholst et al (2003), estudiaron estos datos comparativos entre ambas especies observados por Van den Belt et al (2003), concluyendo que estas diferencias podían ser debidas a un metabolismo hepático más rápido, y por lo tanto, más efectivo en el zebrafish en comparación a la trucha arco iris.

Orn et al (2006) realizaron una comparación entre el zebrafish y el pez medaka exponiéndolos a diversas dosis del compuesto estrogénico sintético EE2. Comparado

## DISCUSIÓN

con los grupos control, la concentración de VTG media era perceptiblemente más alta en el zebrafish, después de la exposición a 10 ng/l de EE2, mientras que no se registró ningún aumento en medaka. La concentración media de VTG en zebrafish expuesto a 10 ng/l de EE2 era de 4.900 µg/g y en el pez medaka de 2,5 µg/g. La exposición del zebrafish a 100 ng/l EE2 dio lugar a la mortalidad del 100% de los peces, mientras que en el pez medaka ésta concentración causó un aumento significativo de VTG, con una concentración media de VTG de 1.400.000 ng/g. Por lo tanto en este estudio, el zebrafish presentó una sensibilidad mucho mayor que en medaka para producir VTG tras la exposición a 10 ng/l de EE2 durante 3 semanas.

Además de la dioxina, existen multitud de estudios en el zebrafish y en otras especies de peces relacionados con compuestos químicos con posible capacidad estrogénica.

Van den Belt et al (2001) expusieron a zebrafish machos y hembras, a la acción del EE2, a dosis de 5, 10 y 25 ng/l durante 3 semanas. Ya a la concentración más baja, se produjo una inducción de la VTG plasmática en los zebrafish macho con respecto al control, y el aumento de la concentración a 10 ng/l EE2 se tradujo en una máxima respuesta de inducción de VTG, superior a la encontrada al exponer a los peces a una dosis de 25 ng/l de EE2. En las hembras la máxima inducción de VTG también se produjo al exponerlas a una dosis de 10 ng/l EE2. Orn et al (2003) encontraron una inducción significativa de VTG en el zebrafish al exponerlo a dosis de 10 ng/l de EE2. Rose et al (2002) utilizando dosis más bajas, encontraron una inducción significativa de los valores de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero al exponer al zebrafish a dosis de sólo 3 ng/l de EE2 durante 8 días.

## DISCUSIÓN

En relación al 17 $\beta$ -estradiol (E2), un esteroide natural, Rose et al (2002), expusieron al zebrafish a diversas dosis de E2, observando una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero a una dosis de 21,4 ng/l de E2, y aumentando estos niveles al exponer a los peces a dosis mayores de E2. Resultados muy similares han sido encontrados por Van den Belt et al (2003), al exponer a zebrafish a dosis de 20 y 100 ng/l de E2, con una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero, desde la dosis más pequeña y aumentando estos valores al exponerlos a la dosis de 100 ng/l E2.

Otros compuestos ampliamente utilizados en la industria y considerados como disruptores endocrinos, son los alquilfenoles polietoxilados, como el OP y el 4-nonilfenol (NP). Estos alquilfenoles han sido ampliamente estudiados y su actividad estrogénica en diversas especies de peces ha sido demostrada por diferentes autores (Jobling et al., 1996; Routledge y Sumpter, 1997). Utilizando el zebrafish, Van den Belt et al (2003) también observaron un aumento significativo en la inducción de VTG plasmática en relación al control al exponer a los peces a una concentración de 500  $\mu$ g/l de NP, pero este aumento no fue observado a concentraciones inferiores, de 20 y 100  $\mu$ g/l. En cambio, Yang et al (2006) encontraron en el zebrafish un aumento significativo de la inducción de VTG a partir de una dosis de 100  $\mu$ g/l, obteniendo unos resultados muy similares a los de nuestro estudio si comparamos las mismas dosis aunque utilizando diferentes productos químicos (NP y BPA, respectivamente).

Actualmente encontramos en la literatura muy pocos datos acerca de estudios realizados sobre la morfología y estereología relacionados con la espermatogénesis y el desarrollo ovárico en el zebrafish.

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos incluido como biomarcador la histopatología gonadal del zebrafish, ya que está demostrado que esta histopatología gonadal responde con una gran sensibilidad a la exposición a compuestos estrogénicos, con alteraciones estructurales que se extienden desde la presentación de ovo-testículos, a malformaciones en los gametos de machos y hembras, alteraciones en el tejido del estroma o un aumento creciente de la presencia de oocitos atrésicos. En 2001, con motivo de la 4ª Reunión del Grupo de Trabajo relacionado con los Compuestos Disruptores Endocrinos de la OECD, fue comúnmente aceptado que la detección de VTG, junto con el aspecto macroscópico de las gónadas y la histopatología, son la base del análisis de compuestos estrogénicamente activos (Segner et al., 2003a).

En los ovarios de las hembras, encontramos en los dos primeros lotes (1 y 10 µg/l de la dioxina) los mismos tipos de folículos que hemos observado en el grupo control, todos ellos se observan con nitidez y mantienen la estructura y el tipo de células de revestimiento, siendo muy similares al grupo control. En los zebrafish expuestos a 100 µg/l de la dioxina encontramos alguna anomalía en los ovarios, como es la vacuolización del citoplasma de los folículos primordiales, los bordes anfractuosos del núcleo de los folículos en crecimiento y un aumento en el número de folículos atrésicos con respecto a los anteriores grupos. A dosis de 1000 µg/l de BPA observamos en todos los tipos de folículos ováricos una degradación de sus componentes celulares, donde podemos destacar una fibrosis intersticial caracterizada por la presencia de tejido conectivo fibroso en el interior del estroma ovárico, además de infiltraciones granulomatosas. También podemos observar un aumento en el

## DISCUSIÓN

número de folículos atrésicos en relación a los observados en el lote de peces expuestos a 100 µg/l de la dioxina.

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, no detectaron alteraciones y sólo en un 10% de las muestras encontraron oocitos en atresia en los ovarios de hembras expuestas a las 2 concentraciones inferiores de la dioxina (1 y 10 µg/l de la dioxina). A dosis superiores de 100 y 1000 µg/l de BPA, los ovarios mostraron alteraciones en el estroma conectivo, granulocitos eosinófilos e incremento de los oocitos atrésicos, alcanzando el 60% de las hembras afectadas en las concentraciones más altas.

En la directriz de la OECD del 2009, encontramos una serie de criterios diagnósticos en la histopatología gonadal de hembras en relación al análisis de la acción de compuestos potencialmente estrogénicos. Entre los objetivos primarios de diagnóstico encontramos el incremento de la atresia folicular como marcador del daño histopatológico gonadal por la acción de estos compuestos (OECD, 2009).

Se han descrito diversos factores en peces teleósteos como causantes de un aumento de la atresia folicular, tales como hipofisectomía, desnutrición, cambios de temperatura y tratamientos con compuestos estrogénicos (Guraya, 1986).

En nuestro estudio, hemos medido el porcentaje de folículos atrésicos en el ovario de las hembras a las diferentes concentraciones de exposición a la dioxina. En el control, encontramos un pequeño porcentaje de folículos atrésicos, un 1,8%. Como hemos mencionado la atresia folicular es un mecanismo fisiológico en el ovario de

## DISCUSIÓN

animales vertebrados. A medida que aumentamos las concentraciones de exposición, observamos un incremento en el porcentaje de folículos atrésicos. A las concentraciones de 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de BPA, observamos un gran aumento del porcentaje de folículos atrésicos con respecto al control, estando la atresia por encima del 10% del total de los folículos ováricos (14,4 y 18,7%, respectivamente), coincidiendo los resultados de la concentración más elevada con los datos aportados por Wolf et al (2004), que obtuvieron un porcentaje medio anormalmente alto del 18% de folículos atrésicos con respecto al control, tras exponer a fathead minnow a una dosis alta de 2.780 ng/l de E2. En los fathead minnow hay datos acerca de unos porcentajes normales de folículos atrésicos que van desde 1,6% (Mc Cormick et al., 1989), hasta el 5% ( Miles-Richardson et al., 1999b).

Varios autores coinciden con nuestros resultados al utilizar diversos compuestos estrogénicos a concentraciones similares, Weber et al (2002) expusieron a los zebrafish a una concentración de 100  $\mu\text{g/l}$  de NP observando un aumento en el porcentaje de folículos atrésicos con respecto al grupo control. Gray et al (1999) observaron una alta incidencia de atresia en hembras adultas de pez medaka expuestas a 100  $\mu\text{g/l}$  de OP durante 2 meses. Spano et al (2004) tras exponer a goldfish adultos a 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de atrazina durante 3 semanas observaron una mayor proporción de folículos atrésicos en estos lotes de exposición que en el control (20 y 25% de los folículos, respectivamente).

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, observaron desde la menor concentración de estudio (1  $\mu\text{g/l}$  de BPA), que un número amplio presentaban una organización alterada del espacio interalveolar, con un aumento de la matriz extracelular amorfa, así como la aparición de granulocitos

## DISCUSIÓN

eosinófilicos. En un menor número de testículos, también describió una reducción de folículos. En la dosis de 10 µg/l de la dioxina, la desorganización del espacio intersticial era más evidente, el diámetro de algunos folículos estaba disminuído.

Bottero et al (2005), observaron unas lesiones similares a las encontradas por nosotros y por Mandich en los ovarios de carpas adultas al exponerlas durante 14 días a diferentes dosis del estrógeno sintético EE2 (1, 4, 16 y 64 ng/l de EE2) mostrando estos testículos una clara evidencia de haber sido sometidos a una acción disruptora (reducción del número de folículos, reducción de la media del diámetro).

Rey et al (2009) expusieron a peces *Cichlasoma dimerus* al OP a unas concentraciones de 30, 150 y 300 µg/l durante 60 días. La histología de los gonadas reveló progresivos efectos adversos en la estructura ovarica tras la exposición a concentraciones de OP. Los ovarios expuestos a 30 µg/l eran similares a los del control. En cambio, en los peces expuestos a 150 µg/l de OP, se observaron multitud de lesiones, la mayoría similares a las encontradas en nuestro estudio. Los ovarios preservaban la estructura folicular pero se observó una incrementada fibrosis intersticial. También pudieron identificar gránulos eosinófilicos. El tejido gonadal de tratados con 300 µg/l de OP reveló un desorden de la estructura folicular así como una ausencia de envueltas. La mayoría de los ovarios aparecían como sacos de tejido fibroso intersticial llenos de esperma.

A diferencia de nosotros, los ovarios de hembras tratadas con OP, no difirieron histológicamente demasiado de los ovarios control, ni siquiera en las hembras expuestas a las concentraciones más altas.

## DISCUSIÓN

Kinnberg et al (2000) expusieron a peces *Xiphophorus maculatus* a diferentes concentraciones del alquilfenol NP (80, 640, 960 y 1280 µg/l). En los ovarios apreciaron un descenso en el número de folículos, un gran número de gonocitos hipertrofiadas sin incluir dentro del epitelio a la que estuvieron expuestos los peces era mayor.

Kinnberg et al (2000) también expusieron a *Xiphophorus maculatus* a una dosis de 96 µg/l de EE2, encontrando efectos sobre la estructura del ovular similar a las observadas en los peces expuestos a altas concentraciones de NP. En algunos de los ovarios los efectos eran aún más pronunciados.

Zha et al (2007), al igual que Kinnberg et al (2000) realizaron un estudio donde expusieron a diversas dosis de EE2 (0, 1, 5 y 25 ng/l) y NP (3, 10 y 30 µg/l) durante 28 días a *Gobyociprus rarus*. Los ovarios observados en las hembras en las exposiciones a 3, 10, y 30 µg/l de NP y 1 y 5 ng/l de EE2 eran similares a los del grupo control a los 28 días. Sin embargo, los ovarios estaban seriamente degenerados cuando fueron expuestos a 25 ng/l de EE2.

La exposición a compuestos estrogénicamente activos ha dado lugar en diversos estudios a un aumento en el tamaño (hipertrofia) de los gonocitos, con o sin aumento del número de éstas (Miles-Richardson et al., 1999b; Kinnberg et al., 2000; Kinnberg y Toft, 2003; van der Ven et al., 2003). En nuestro estudio hemos medido el diámetro medio de las células de los folículos en los diferentes lotes de zebrafish macho expuestos a la dioxina, observando un aumento del diámetro medio de estas células a medida que incrementamos la concentración de la dioxina a la que exponemos a los zebrafish, observándose diferencias estadísticamente significativas

## DISCUSIÓN

( $p < 0,05$ ) entre los 3 lotes de mayor concentración (10, 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de BPA) y el control.

Miles-Richardson et al (1999b), expusieron a peces fathead minnow a NP a concentraciones inferiores a las nuestras (1,1 y 3,4  $\mu\text{g/l}$ ), observando un aumento en el tamaño de las gonocitos con respecto al control. Estas presentaban un citoplasma distendido por la presencia de cuerpos residuales y figuras de mielina, así como una proliferación en el número de estas células. Kinnberg et al (2000), expusieron a peces *Xiphoporus maculatus* durante 28 días al NP, a unas concentraciones dentro del rango de las utilizadas por nosotros (320 y 960  $\mu\text{g/l}$  de NP), observando un incremento en el número de los gonocitos hipertrofiados con respecto al control al exponer a los peces a ambas concentraciones. Kinnberg y Toft (2003), al exponer a peces guppy (*Poecilia reticulata*) a concentraciones de 1  $\mu\text{g/l}$  de EE y 900  $\mu\text{g/l}$  de OP, observaron la hipertrofia de los gonocitos. van der Ven et al (2003) también pudieron observar la hipertrofia de las células de Sertoli en los testículos de zebrafish machos adultos tras exponerlos a la acción del estrógeno sintético metildihidrotestosterona.

## ***Conclusiones***

---

### ***Primera***

- En los estudios realizados fundamentalmente en el grupo control, hemos diferenciado y descrito tanto al microscopio óptico como electrónico todos los tipos de folículos ováricos.

## Segunda

- Se produce una acumulación de la dioxina en los tejidos de los peces expuestos durante 14 días a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/l en el agua, existiendo una correlación entre los niveles de dioxina determinados en los peces, y la concentración de dioxina a la que estuvieron expuestos, existiendo diferencias estadísticamente significativas al comparar el último lote de estudio (1000 µg/l) con respecto al control y al resto de lotes.

## Tercera

- Fundamentalmente en los grupos control y 1º, se evidencia escasa atresia folicular, en todas las fases foliculares, considerándolas como atresias fisiológicas.

## Cuarta

- En los diferentes tratamientos que hemos realizado con las dioxinas, se alteran los componentes de los folículos ováricos.

## Quinta

- La exposición a la dioxina provoca alteraciones en el desarrollo folicular en las hembras, lo que da lugar a un aumento en el porcentaje de folículos atrésicos en los ovarios del zebrafish. Este aumento en el porcentaje de folículos es mayor conforme incrementamos la concentración de la dioxina a la que están expuestos los peces.

## Sexta

- El aumento excesivo de la atresia folicular, conlleva a una disminución en la producción de óvulos maduras, de forma similar a lo que acontece en el testículo con la drástica disminución del número de espermatozoides.

-

## ***Resumen***

Existe una gran inquietud social por los riesgos que conlleva la exposición a las dioxinas como disruptor endocrino en los seres humanos, así como la repercusión que esta sustancia química pueda tener en el medioambiente. En este estudio se evalúan los efectos a nivel gonadal de las dioxinas a corto plazo, a través de diferentes biomarcadores, en un organismo modelo animal que se encuentra en auge, el zebrafish (*Danio rerio*). Para ello se utilizaron 70 zebrafish hembras de unas 16 semanas de edad, a los cuales se les expuso durante 14 días (siguiendo las directrices de la OCDE, nº 204) en los acuarios a las concentraciones de dioxinas de 1, 10, 100 y 1000 µg/l, además de un lote control. Tras el periodo de exposición, los zebrafish fueron sacrificados y se tomaron muestras, para el estudio histopatológico, mediante microscopía óptica y electrónica, y análisis morfométrico. Durante los 14 días de exposición se

## RESUMEN

tomaron muestras de agua de los acuarios para analizar los niveles de dioxinas. La concentración de dioxinas en los peces y del agua se realizó mediante LC-MS/MS.

Las gónadas de los zebrafish expuestos a la dioxinas aparecieron con un aspecto externo normal así como sin variaciones en el tamaño o en el peso corporal de los peces. Se produjo un acúmulo de dioxinas en los tejidos del zebrafish, que fue en aumento a medida que se incrementó la concentración de dioxinas a la que se expusieron los peces. En el estudio histopatológico y morfométrico, se observaron múltiples alteraciones en los ovarios de los zebrafish. Destacando la vacuolización del citoplasma folicular, una gran degeneración de todos los componentes celulares y un gran aumento en el porcentaje de folículos atrésicos a partir de las concentraciones de 100 y 1000 µg/l de dioxina, comprobadas mediante morfometría.

### **Abstract**

The morphological consequences of long-term exposition to low doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the ovaries were investigated in 50 adult female zebrafish at structural and ultrastructural levels. Animals were exposed to graded concentrations of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (10, 40, 100 and 270 ppb) for 21 days, then zebrafish were sacrificed by an overdose of anaesthetic solution tricaine methanesulfonate and immediately samples were taken out for the morphological evaluation. At lower concentrations of exposure there were no evidences of morphological modifications, while at higher concentrations (100 and 270 ppb) were frequent the images of degeneration and inflammation. An increase of follicular atresia was observed, showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between all the study groups. These results indicate that long-term exposition to low doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are able to induce morphological damage on the ovaries which could produce adverse effects on fish reproductive health.

## ***Bibliografia***

---

Adachi, T., Yasuda, K., Mori, C., Yoshinaga, M., Aoki, N., Tsujimoto, G., Tsuda, K. Food and Chemical Toxicology 43 (5): 713-719 (2005).

Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. Endocrinology 145 (2): 592-603 (2004).

Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., Dorn, P. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: acute aquatic toxicity. Environmental Toxicology Chemical 7: 19-26 (1988).

Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., Elbetieha, A.M. Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. European Journal of Oral Sciences 112 (3): 267-272 (2004).

Aloisi, A.M., Della Seta, D., Rendo, C., Ceccarelli, I., Scaramuzzino, A., Farabollini, F. Exposure to the estrogenic pollutant 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. Brain Research 937 (1-2): 1-7 (2002).

## BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquié, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. Plos One 3 (4): 2069 (2008).

Alonso-Magdalena, P., Laribi, O., Ropero, A.B., Fuentes, E., Ripoll, C., Soria, B. Low doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and diethylstilbestrol impair Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> signals in pancreatic alpha cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. Environmental Health Perspectives 113: 969-977 (2005).

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. Environmental Health Perspectives 114: 106-112 (2006).

Amaral, J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge. Food and Chemical Toxicology 40: 781-788 (2002).

Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L., Petersen, G.I. Effects of exposure to 17alpha-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry Physiology C. Toxicology and Pharmacology 134 (3): 365-374 (2003).

Ankley, G.T., Johnson, R.D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. ILAR Journal 45 (4): 469-483 (2004).

Arakawa, C., Fujimaki, K., Yoshinaga, J., Imai, H., Serizawa, S., Shiraishi, H. Daily urinary excretion of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Environmental Health Preventive Medicine 9: 22-26 (2004).

Arenholt- Bindsely, D. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. Clinical Oral Investigation 3: 120-125 (1999).

Asbhy, J. Validation of in vitro and in vivo methods for assessing endocrine disrupting chemicals. Toxicologic Pathology 28 (3): 432-437 (2000).

Ashby, J., Tinwell, H., Haseman, J. Lack of effects for low dose levels of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. Regulatory Toxicology and Pharmacology 30: 156-166 (1999).

## BIBLIOGRAFÍA

Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S. Endocrine disrupting alkylphenols and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollution Bulletin* 48: 1145-1167 (2004).

Behnisch, P.A., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I., Sakai, S. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere* 43: 977-984 (2001).

Benachour, N., Aris, A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241 (3): 322-328 (2009).

Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R., Brandebourg, T.D. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304: 49-54 (2009).

Berg, G., Halldin, K., Brunstrom, B. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology Chemical* 20: 2836-2840 (2001).

Bergeron, R.M., Thompson, T.B., Leonard, L.S., Pluta, L., Gaido, K.W. Estrogenicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a human endometrial carcinoma cell line. *Molecular Cellular Endocrinology* 150 (1-2): 179-187 (1999).

Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., Kanki, J.P. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* 39 (2): 227-237 (2005).

Bibbo, M., Gill, W.B., Azizi, F., Blough, R., Fang, V.S., Rosenfield, R.L., Schumacher, G.F., Sleeper, K., Sonek, M.G., Wied, G.L. Follow-up study of male and female offspring of DES exposed mothers. *Obstetrics and Gynecology* 49: 1-18 (1977).

Biddinger, S.B., Kahn, C.R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annual Review of Physiology* 68: 123-158 (2006).

Biello, D. Plastic (not) fantastic: Food containers leach a potentially harmful chemical». *Scientific American* 2 (2008).

## BIBLIOGRAFÍA

Billard, R., Fostier, A., Weil, G., Breton, B. The endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal Fish Aquatic Science* 39: 65-79 (1982).

Bishop, PL. *Pollution Prevention: Fundamentals and Practice*. Boston, McGraw-Hill (2000).

Bisphenol A. In: J.J. Mcketta (ed.), *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. vol. 4, 406-428. New York: Marcel Dekker (1977).

Bjerregaard, L.B., Madsen, AH., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. *Ecotoxicology* 15 (3): 315-327 (2006).

Bjorksten, B. Environment and infant immunity. *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 729-732 (1999).

Bottero, S., Monteverde, M., Pedemonte, F., Pedemonte, R., Bertolotti, L., Viganò, A., Manidich, A., Massari, A. In vivo and in vitro exposures of carp and tissues to graded concentrations of endocrine disrupting chemicals. *Annual New York Academy of Sciences* 1040: 234-238 (2005).

Brede, C., Fjeldal, P., Skjevraak, I., Herikstad, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants*, 20: 684-689 (2003).

Bresch, H., Beck, H., Ehlermann, D., Schlaszus, H., Urbanek, M. A long-term toxicity test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloroaniline. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19 (3): 419-427 (1990).

Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68 (3): 193-217 (2004).

Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal Histochemistry and Cytochemistry* 53: 1087-1097 (2005).

## BIBLIOGRAFÍA

Burr, M., Butland, B., King, S., Vaughan-Williams, E. Changes in asthmatic prevalence: Two surveys 15 years apart. *Archives of Disease in Childhood* 64: 1452-1456 (1989).

Burstein, H.J., Abbas, A.K. In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 177 (2): 457-463 (1993).

Buysch, HJ. Bisphenols. *Industrials organic chemicals*, vol. 6: 3768-3774. Weinheim, Germany (1999).

Cagen, S.Z., Waechter, Jr., J.M., Dimond, S.S., Breslin, W.J., Butala, J.H., Jekat, F.W., Joiner, R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E., Harris, L.R. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Toxicology Science* 50: 36-44 (1999).

Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., Caicedo, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 2334-2339 (2006).

Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., Needham, L.L. Urinary concentrations of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives* 113: 391-395 (2005).

Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., Hauser, R. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental Health Perspectives* 117 (4): 639-644 (2009).

Campbell, P.M., Hutchinson, T.H. Wildlife and endocrine disrupters: requirements for hazard identification. *Environmental Contamination and Toxicology* 17: 127-135 (1998).

Cao, X.L., Corriveau, J. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal Agriculture Food Chemical* 56 (15): 6378-6381 (2008).

## BIBLIOGRAFÍA

Cao, X.L., Dufresne, G., Belisle, S., Clement, G., Falicki, M., Beraldin, F., Rulibikiye, A. Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *Journal Agriculture Food Chemical* 56 (17): 7919-7924 (2008).

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years. *Brain Medicine Journal* 305: 609-612 (1992).

Carvan, M.J. 3rd., Gallagher, E.P., Goksøyr, A., Hahn, M.E., Larsson, D.G. Fish models in toxicology. *Zebrafish* 4 (1): 9-20 (2007).

*Chemical Week* Sep. 24, Issue 33, 165, 41 (2003).

Cheng, S.Y. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinology and Metabolism* 16 (4): 176-82 (2005).

Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P. K.C. Induction of oxidative stress by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the epididymal sperm rats. *Toxicology* 185: 119-127 (2003).

Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101: 378-384 (1993).

Cooke, P.S., Zhao, Y., Hansen, L.G. Neonatal polychlorinated byphenil treatment increases adult testis size and sperm production in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 136: 112-117 (1996).

Coors, A., Jones, P.D., Giesy, J.P., Ratte, H.T. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environmental Science Technology* 37: 3430-3434 (2003).

Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D. A multimedia assessment of the environmental fate of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Human and Ecological Risk Assessment* 8 (5): 1107-1135 (2002)

## BIBLIOGRAFÍA

Crain, D.A., Guillette Jr, L.J. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Animal Reproduction Sciences* 53: 77-86 (1998).

Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., Leblanc, G.A., Guillette Jr, L.J. An ecological assessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24: 225-239 (2007).

Crisp, T.M., Clegg, E.D., Cooper, R.L., Wood, W.P., Anderson, D.G., Baetcke, K.P., Hoffman, J.L., Morrow, M.S., Rodier, D.J., Schaeffer, J.E., Tovart, L.W., Zeeman, M.G., Patel, Y.M. Environmental endocrine disruption: an effect assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives* 106 (1): 11-56 (1998).

Davis, D.L., Bradlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D.G., Anton-Culver, H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives* 101: 372-377 (1993).

Dekant, W., Volkel, W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228: 114-134 (2008).

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

Domoradzki, J.Y., Pottenger, L.H., Thornton, C.M., Hansen, S.C., Card, T.L., Markham, D.A., Dryzga, M.D., Shiotsuka, R.N., Waechter, J.M. Jr. Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicology Science* 76 (1): 21-24 (2003).

Dorgan, J.F., Brock, J.W., Rothman, N., Needham, L.L., Miller, R., Stephenson Jr., H.E., Schussler, N., Taylor, P.R. Serum organochlorine pesticides and PCBs and

## BIBLIOGRAFÍA

breast cancer risk: results from a prospective analysis. *Cancer Causes Control* 10: 1-11 (1999).

Drastichova, J., Svoboda, Z., Groenland, M., Dobsikova, R., Zlabek, V., Weissova, D. Effect of exposure to bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol on the sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Acta Veterinaria Brno* 74: 287-291 (2005).

Dussault, J.H., Ruel, J. Thyroid hormones and brain development. *Annual Review Physiology* 49: 321-334 (1987).

Edginton, A.N., Ritter, L. Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environmental Health Perspectives* 117: 645-652 (2009).

Edwards, T.M., Moore, B.C., Guillette Jr, L.J. Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *International Journal of Andrology* 29 (1): 109-121 (2006).

Ehlert, K.A., Beumer, C.W., Groot, M.C. Migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Additives and Contaminant* 25 (7): 904-910 (2008).

Elbrecht, A., Smith, R.B. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255: 467-470 (1992).

Elo, B., Villano, C.M., Govorko, D., White, L.A. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *Journal of Molecular Endocrinology* 38 (4): 433-440 (2007).

Elsby, R., Ashby, J., Sumpter, J.P., Brooks, A.N., Pennie, W.D., Maggs, J.L., Lefevre, P.A., Odum, J., Beresford, N., Paton, D., Park, B.K. Obstacles to the prediction of estrogenicity from chemical structure: assay-mediated metabolic transformation and the apparent promiscuous nature of the estrogen receptor. *Biochemical Pharmacology* 60 (10): 1519-1530 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

Elsby, R., Maggs, J.L., Ashby, J., Park, B.K. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297: 103-113 (2001).

Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T., Harazono, A. Rat two-generation reproductive toxicity study of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Reproductive Toxicology* 15: 505-523 (2001).

Environment Canada. Screening Assessment for The Challenge Phenol, 4,4' - (1-methylethylidene)bis- (Bisphenol A) Chemical Abstracts Service Registry Number 80-05-7 (2008).

Erler, C., Novak, J. Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *Journal of Pediatric Nursing* 25 (5): 400-407 (2010).

European Union Risk Assessment report: Bisphenol A. Ispra, Italy: European Comission (2003).

European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2, 2-Bis(4-Hydroxyphenyl) propane (2006).

Facciolo, R.M., Alo, R., Madeo, M., Canonaco, M., Dessi-Fulgheri, F. Early cerebral activities of the environmental estrogen 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin appear to act via the somatostatin receptor subtype sst2. *Environmental Health Perspectives* 110 (3): 397-402 (2002).

Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., Dessi-Fulgheri, F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environmental Health Perspectives* 3: 409-14 (2002).

Federal Drug Administration (2008).

Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (5): 1088-1098 (2005).

## BIBLIOGRAFÍA

Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R. Fate of <sup>14</sup>Cbisphenol A in soils. *Chemosphere* 51: 735-746 (2003).

Fernandez, M.F., Arrebola, J.P., Taoufiki, J., Navalon, A., Ballesteros, O., Pulgar, R. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology* 24: 259-264 (2007).

Fiegue, H., Heinz-Werner, V., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y. F., Buysch, H.J., Garbe, D., Paulus, W. Phenol Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH (2002).

Filho, I.D.N., von Mühlen, C., Schossler, P., Caramao, E.B. Identification of some plasticizers compounds landfill leachate. *Chemosphere* 50: 657-663 (2003).

Fish, H., Goluboff, E.T., Olson, J.H., Feldshuh, J., Broder, S.J., Barad, D.H. Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertility and Sterility* 65: 1009-1014 (1996).

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, DA., Enblom, J. 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: 1096-101 (1996).

Forman, D., Moller, H. Testicular cancer. *Cancer survey* 19-20: 223-341 (1994).

Fujimaki, H., Nohara, O., Ichinose, T., Watanabe, N., Saito, S. IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particles and antigen. *Toxicology* 92: 261-268 (1994).

Fung, E.Y.K., Ewoldsen, N.O., St Germain, H.A. Jr, Marx, D.B., Miaw, C.L., Siew, C., Chou, H.N., Gruninger, S.E., Meyer, D.M. Pharmacokinetics of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin released from a dental sealant. *Journal of American Dental Association* 131: 51-58 (2000).

Furhacker, M. Bisphenol-A: emissions from point sources. *Chemosphere* 41: 751-756 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

German MAK Commission Critical Data Evaluation for MAK Values and Classification of Carcinogens, vol. 13: 50-87. Weinheim, Germany: WILEY-VCH (1996).

Gill, W.B., Schumacher, G.F., Bibbo, M., Straus, F.H., Schoenberg, H.W. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *Journal of Urology* 122: 36-39 (1979)

Giusti, R.M., Iwamoto, K., Hatch, E.E. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Annals of Internal Medicine* 122: 778-788 (1995).

Goodson, A., Summerfield, V., Cooper, I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Additives and Contaminants* 19: 796-802 (2002).

Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., Cooper, I. Migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from can coatings--effects of damage, storage conditions and heating. *Food Additives and Contaminants* 21 (10): 1015-1026 (2004).

Gray, M. A., Metcalfe, C. D. (1997). Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to *p*-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1082-1086.

Groof, T. Bisphenol A: invisible pollution. *Current Opinion in Pediatrics* 22 (4): 524-529 (2010).

**Guillette Jr, L.J.** Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth hormone and IGF research* 10 (B): 45-50 (2000).

Guraya, S.S. Follicular (or oocyte) atresia. *The Cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis*: 169-180 (1986).

Guttes, S., Failing, K., Neuman, K., Kleinstein, J., Georgii, S., Brunn, H. Chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls in breast tissue of women with benign and malignant breast disease. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 140-147 (1998).

## BIBLIOGRAFÍA

Guzelian, P.S. Comparative toxicology of chlorodecone (Kepone) in humans and experimental animals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22: 89-113 (1982).

Hakkola, J., Pelkonen, O., Pasanen, M., Raunio, H. Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: Role in intrauterine toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 28: 35-72 (1998).

Han, D., Denison, M.S., Tachibana, H., Yamada, K. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25 (10): 1263-1267 (2002).

Haubruge, E., Petit, F., Gage, M.J. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol. *Annual Proceedings Biological Science* 1459: 2333-2337 (2000).

Helzlsouer, K.J., Alberg, A.J., Huang, H.Y., Hoffman, S.C., Strickland, P.T., Brock, J.W., Burse, V.W., Needham, L.L., Bell, D.A., Lavigne, J.A., Yager, J.D., Comstock, G.W. Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive* 8: 525-532 (1999).

Henderson, B.E., Benton, B., Cosgrove, M., Baptista, J., Aldrich, J., Townsend, D., Hart, W., Mack, T.M. Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. *Pediatrics* 58: 505-507 (1976).

Hess, R.A., Cooke, P.S. Symposium overview-endocrine modulation of reproduction. *Fundamental and Applied Toxicology* 29: 1-17 (1996).

**Hill, R.L. Jr., Janz, D.M.** Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology* 63 (4): 417-429 (2003).

**Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E.** Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86 (1): 6-19 (2005).

Ho, S.M., Tang, W.Y., Belmonte de Frausto, J., Prins, G.S. Developmental exposure to estradiol and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research* 66: 5624-5632 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

**Holbech, H., Kinnberg, K., Petersen, G.I., Jackson, P., Hylland, K., Norrgren, L., Bjerregaard, P.** Detection of endocrine disrupters: evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative Biochemistry and Physiology C. Toxicology and Pharmacology* 144 (1): 57-66 (2006).

Holdstock, G., Chastenay, B.F., Krawitt, E.L. Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clinical and Experimental Immunology* 47 (2): 449-456 (1982).

Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T. Low dose effect of *in utero* exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive and Toxicology* 16: 117-22 (2002).

Houart, C. Zebrafish as an experimental organism. *Encyclopedia of Life Sciences* (2001).

Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenberg, J.G., vom Saal, F.S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764 (1999).

Howdeshell, K.L., Peterman, P.H., Judy, B.M., Taylor, J.A., Orazio, C.E., Ruhlen, R.L., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environmental Health Perspectives* 111 (9): 1180-1187 (2003).

Hoyer, A.P., Grandjean, P., Jorgensen, T., Brock, J.W., Hartyig, H.B. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352: 1816-1820 (1998).

Hoyer, A.P., Jorgensen, T., Brock, J.W., Grandjean, P. Organochlorine exposure and breast cancer survival. *Journal Clinical and Epidemiology* 53: 323-330 (2000).

**Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F., Hassold, T.J.** a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology* 13 (7): 546-553 (2003).

## BIBLIOGRAFÍA

Hunter, D.J., Hankinson, S.E., Laden, F., Colditz, G., Munson, J.E., Willett, W.C., Speizer, F.E., Wolff, M.S. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 337: 1253-1258 (1997).

Ike, M., Chen, M.Y., Danzl, E., Sei, K., Fujita, M. Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Science Technology* 53 (6): 153-159 (2000).

Inoue, K., Kawaguchi, M., Funakoshi, Y., Nakazawa, H. Size exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 798: 17-23 (2003).

Ishido, M., Masuo, Y., Kunimoto, M., Oka, S., Morita, M. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Journal of Neuroscience Research* 76: 423–433 (2004).

Ishibashi, H., Watanabe, N., Matsumura, N., Hirano, M., Nagao Y., Shiratsuchi H., Kohra, S., Yoshihara, S., Arizono K. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sciences* 77: 2643-2655 (2005).

Iwamuro, S., Yamada, M., Kato, M., Kikuyama, S. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Science* 79 (23): 2165-2171 (2006).

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 194-202 (1996).

Jolanki, R., Kanerva, L., Estlander, T. Occupational allergic contact dermatitis caused by epoxy diacrylate in ultraviolet-lightcured paint, and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in dental composite resin. *Contact dermatitis* 33: 94-99 (1995).

## BIBLIOGRAFÍA

Joskow, R., Barr, D.B., Barr, J.R., Calafat, A.M., Needham, L.L., Rubin, C. Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from bis-glycidylmethacrylate-based dental sealants. *Journal of American Dental Association* 137: 353-362 (2006).

Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori, T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Science* 74: 2931-2940 (2004).

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 116: 1784-1792 (2006).

Kamrin, MA. A scientific evaluation. *Medscape General Medicine* 6 (3) (2004).

Kanerva, L., Jolanki, R., Estlander, T., Henriks-Eckerman, M., Tuomi, M., Tarvainen, K. Airborne occupational allergic contact dermatitis from triglycidyl-*p*-aminophenol and tetraglycidyl-4,4-methylene dianiline in preimpregnated epoxy products in the aircraft industry. *Dermatology* 201: 29-22 (2000).

Kanerva, L., Pelttari, M., Jolanki, R., Alanko, K., Estlander, T., Suhonen, R. Occupational contact urticaria from diglycidyl ether of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin epoxy resin. *Allergy* 57: 1205-1207 (2002).

Kang, J.H., Kondo, F. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 43: 265-269 (2002a).

Kang, J.H., Kondo, F. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in river water. *Chemosphere* 49: 493-498 (2002b).

Kang, J.H., Kito, K., Kondo, F. Factors influencing the migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from cans. *Journal of Food Protection* 66: 1444-1447 (2003).

Kang, J.H., Kondo, F. Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater. *Chemosphere* 60: 1288-1292 (2005).

## BIBLIOGRAFÍA

Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. Human exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Toxicology* 226: 79-89 (2006)

Kato, H., Furuhashi, T., Tanaka, M., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., Iguchi, T. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reproductive Toxicology* 22 (1): 20-29 (2006).

Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Saito, K., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. *Journal Chromatography B* 820: 49-57 (2005).

Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., Suzuki, A. Endocrine disrupter nonylphenol and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin contamination in Okinawa and Ishigaki islands. *Chemosphere* 55: 1519-1527 (2004).

Kawai, K., Takehiro, N., Nishikata, H., Aou, S., Takii, M., Kubo, C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Environmental Health Perspectives* 111: 175-178 (2003).

Kawamura, Y., Sano, H., Yamada, T. Migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from can coatings to drinks. *Journal Food Hygienic Society of Japan* 40: 158-165 (1999).

Kawamura, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Yamada, T., Maitani, T. Causes of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin migration from cans for drinks and assessment of improved cans. *Journal Food Hygienic Society of Japan* 42: 13-17 (2001).

Kavlock, R.J., Daston, G.P., De Rosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S. 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 (14): 715-740 (1996).

Keller-Byrne, J.E., Khuder, S.A., Schaub, E.A. Meta analyses of prostate cancer and farming. *American Journal of Industrial Medicine* 31: 580-586 (1997).

## BIBLIOGRAFÍA

Ketzenellebongen, B.S., Korach, K.S. A new actor in the estrogen receptor drama. *Endocrinology* 138: 861-862 (1997).

Kime, D.E., Nash, J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Science Total Environment* 233: 123-129 (1999).

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* 203 (3): 253-310 (1995).

Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A. Effects of nonhylphenol and 17 $\beta$ -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 171-181 (2000).

Kinnberg, K., Toft., G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (1): 16-24 (2003).

Kitada, M., Kamataki, T., Itahashi, K., Rikihisa, T., Kanakubo, Y. P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers, is the 16 $\beta$ -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 262: 13534-13537 (1987).

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicology Science* 84: 249-259 (2005).

Klevcka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environmental Toxicology Chemical* 20: 2725-2735 (2001).

Knaak, J.B., Sullivan, L.J. Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 8 (2): 175-184 (1966).

Knouff, C., Auwerx, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-  $\gamma$  calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocrinology Review* 25: 899-918 (2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams. *Environmental Science Technology* 36: 1202-1211 (2003)

Koulish, S., Kramer, C.R., Grier, H.J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *Journal of morphology* 254: 292-311 (2002).

Krieger, N., Wolff, M.S., Hiatt, R.A., Rivera, M., Vogelman, J., Orantreich, N. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women. *Journal Natural Cancer Institute* 86: 589-599 (1994).

Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132 (6): 2279-2286 (1993).

Kruger, T., Long, M., Bonefeld-Jorgensen, E.C. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246: 112-123 (2008).

Krysko, D.V., Diez-Fraile, A., Criel, G., Svistunov, A.A., Vandenabeele, P., D'Herde, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 13 (9): 1065-1087 (2008).

Kuiper, G.G.J.M., Carlson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity transcript tissue distribution of oestrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-870 (1997).

Kurebayashi, H., Betsui, H., Ohno, Y. Disposition of a low dose of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicology Science* 73 (1): 17-25 (2003).

Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., Taketani, Y. The activity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocrine Journal* 49 (4): 465-471 (2002)

## BIBLIOGRAFÍA

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletz, M., Weismann, T. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology* 75: 213-224 (2005).

Laws, S. C., Carey, S. A. (1997). Comparison of the estrogenic activity of 4-tert-octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in Long Evans female rats. *Toxicologist* 36: 359 (1997).

Le, H.H., Carlson, E.M., Chua, J.P., Belcher, S.M. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters* 176 (2): 149-156 (2008).

Lee, H.B., Peart, T.E. Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *JAOAC International* 83 (2): 290-297 (2000).

Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.Y., Ahn, R.S., Lee, K. Antiandrogenic effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and nonilphenol on the function of androgen receptor. *Toxicology Science* 75: 40-46 (2003).

Lee, C.K., Kim, S.H., Moon, D.H., Kim, J.H., Son, B.C., Kim, D.H., Lee, C.H., Kim, H.D., Kim, J.W., Kim, J.E., Lee, C.U. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the placental function and reproduction in rats. *Journal Preventive of Medicine Public Health* 38: 330-336 (2005).

Lee, Y.J., Ryu, H-Y., Kim, H-K., Min, C.S., Lee, JH., Kim, E. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reproductive Toxicology* 25: 413-419 (2008).

Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Richelsen, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews* 6: 13-21 (2005).

Liljegren, G., Hardell, L., Lindstrom, G., Dahl, P., Magnuson, A. Case-control study on breast cancer and adipose tissue concentrations of congener specific polychlorinated biphenyls, DDE and hexachlorobenzene. *European Journal of Cancer Prevention* 7: 135-140 (1998).

Lindholst, C., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 48 (2-3): 87-94 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

Lindholm, C., Wynne, P.M., Marriott, P., Pedersen, S.N., Bjerregaard, P. Metabolism of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response.. *Comparative Biochemical Physiology C and Toxicology Pharmacology* 135 (2):169-77 (2003).

Liu, Z. et al. Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *Journal Chromatography B* 819: 155-159 (2005).

López-Cervantes, M., Torres-Sánchez, L., Tobías, A., López-Carrillo, L. Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Environmental Health Perspectives* 112: 207-214 (2004).

Lyons, G. Bisphenol A: A known endocrine disruptor. Godalming (Surrey). WWF European Toxics Programme 37 (2000)

Mackay, D., Di Guardo, A., Patterson, S. Assessing the fate a new and existing chemicals: a five-stage process. *Environment Toxicology Chemical* 15: 1618-1626 (1996)

Mackay, D. Multimedia models: the fugacity approach, second edition (2001)

McCormick, J. M., Stokes, G. N., Hermanutz, R. O. Oocyte atresia and reproductive success in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to acidified hardwater environments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 207-14 (1989).

Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular Cellular Endocrinology* 254-255: 179-186 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., Massari, A., Pedemonte, F., Vigano, L. In vivo exposure of carps to graded concentrations of bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 153: 15-24 (2007).

Maragou, N.C., Makri, A., Lampi, E.N., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. Migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Additives and Contaminants* 25 (3): 373-383 (2008).

Markey, C.M., Luque, E.H., Muñoz De Toro, M., Sonnenschein, C., Soto, A.M. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biological of Reproduction* 65: 1123-1215 (2001).

Markey, C.M., Coombs, M.A., Sonnenschein, C., Soto, A.M. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evolution and Development* (1): 67-75 (2003).

Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the female mouse genital tract. *Biological Reproduction* (2005).

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.Y., Hirose, M. Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Archives of Toxicology* 78 (4): 232-240 (2004).

Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G.L. Bisphenol A levels in human urine. *Environmental Health Perspectives* 111: 101-104 (2003).

Matta, S.L., Vilela, D.A., Godinho, H.P., França, L.R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143 (3): 970-978 (2002).

Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chemical Research in Toxicology* 14 (2): 149-157 (2001).

## BIBLIOGRAFÍA

Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der Burg, B., Brouwer, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives* 109 (4): 399-407 (2001).

Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *Plos One* 5 (1): 8673 (2010).

Mielke, H., Gundert-Remy, U. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin levels in blood depend on age and exposure. *Toxicology Letters* 190 (1): 32-40 (2009).

Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999a). Effects of waterborne exposure of 17 $\beta$  estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 47: 129-145.

Miles-Richardson, S. R., Pierens, S., Nichols, K. M., Kramer, V. J., Snyder, E. M., Snyder, S. A., Render, J. A., Fitzgerald, S. D., Giesy, J. P. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environment Resolution* 80: 122-137 (1999b).

Miyakoda, H., Tabata, M., Onodera, S., Takeda, K. Passage of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin into the fetus of the pregnant rat. *Journal Health Science* 45: 318-323 (1999).

Miyakoda, H., Tabata, M., Onodera, S., Takeda, K. Comparison of conjugative activity, conversion of bisphenol A to bisphenol A glucuronide in fetal and mature rat. *Journal Health Science* 46: 269-274 (2000).

Miyamoto, K., Kotake, M. Estimation of daily bisphenol a intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environmental Science* 13 (1): 15-29 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

Mondel, M. Adsorption/desorption of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on four different soils. Final report by Staatliche-Lehr –und Forschungsanstalt 71 (2001a)

Mondel, M. Degradation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on four different soils under aerobic conditions. Final report by Staatliche-Lehr –und Forschungsanstalt 71 (2001b).

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K. Thyroid hormone action is disrupted by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 5185-5190 (2002):

Moysich, K.B., Ambrosone, C.B., Vena, J.E., Shields, P.G., Mendola, P., Kostyniak, P., Greizerstein, H., Graham, S., Marshall, J.R., Schisterman, E.F., Freudenheim, J.L. Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventive* 7: 181-188 (1998).

Munguía- López, E.M, Soto-Valdez, H. Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings. *Journal of Agriculture and Food Chemical* 49 (8): 3366-3371 (2001).

Munguía-López, E.M., Peralta, E., Gonzalez-Leon, A., Vargas-Requena, C., Soto-Valdez, H. Migration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from epoxy can coatings to Jalapeño and acid food simulant. *Journal of Agriculture and Food Chemical* 50 (25): 7299-7302 (2002).

Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146: 4138-4147 (2005).

Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., Ropero, A.B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular Cellular Endocrinology* 304 (1-2): 63-68 (2009).

Nagel, R., Bresch, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Markert, M., Munk, R., Scholz, N., ter Höfte, B.B. Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21 (2): 157-164 (1991).

## BIBLIOGRAFÍA

Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M., Welshons, W. V. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environmental Health Perspectives*. 105: 70-76 (1997).

Nakagawa, Y., Tayama, S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology* 74: 99-105 (2000).

Nakagawa, Y., Suzuki, T. Metabolism of bisphenol A in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cells. *Xenobiotica* 31: 113-123 (2001).

Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., Fushiki, S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Neuroscience Research* 84 (6): 1197-205 (2006).

Nakari, T., Erkomaa, K. Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration test. *Environmental Pollution* 123 (2): 267-273 (2003).

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health perspectives* 112 (17): 1725-1733 (2004).

National Toxicology Program CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A (2007).

Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental Health Perspectives* 112 (11): 1159-64 (2004).

Nel, A. E., Diaz-Sanchez, D., Nag, D., Hiura, T., Saxon, A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 539-554 (1998).

Newbold, R. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives* 103: 83-87 (1995).

## BIBLIOGRAFÍA

Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproduction Toxicology* 18: 803-811 (2004).

Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H. Placental Transfer of Conjugated 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environmental Health Perspectives* 118 (9): 1196-1203 (2010).

Núñez, A.A., Kannan, K., Giesy, J.P., Fang, J., Clemens, L.G. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42 (8): 917-922 (2001).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Fish, Early Life Stage Toxicity Test, Section 2, Guideline 210. Paris, France (1992).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day-Study, Section 2, Guideline 204. Paris, France (1993).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, Section 2, Guideline 212. Paris, France (1998).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. Fish Expert Consultation Meeting. London, Paris, France (1999).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads. Paris, France (2009).

Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. Estrogenicity of resin-based composites

## BIBLIOGRAFÍA

and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 104: 298-305 (1996).

Orn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L., Petersen, G.I. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65 (4): 397-411 (2003).

Orn, S. Yamani, S., Norrgren, L. Comparison of vitellogenin Induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese Medaka after exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -trenbolone. *Archives of Environmental Toxicology Contamination* 51: 237-243 (2006).

Paavonen, T., Andersson, L.C., Adlercreutz, H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *Journal of Experimental Medicine* 154 (6): 1935-1945 (1981).

Paulsen, C.A., Berman, N.G., Wang, C. Data from man in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertility and Sterility* 65: 1015-1020 (1996).

Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., Olea, N. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environmental Health Perspectives* 106 (3): 167-174 (1998).

Piferrer, F., Blázquez, M. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 31 (2-3): 215-226 (2005).

Pottenger, L.H., Domoradzky, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., Waechter, J.M. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicology Science* 54: 3-18 (2000).

Pritchett, J.J., Kuester, R.K., Sipes, I.G. Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metabolism and Disposition* 30 (11): 1180-1185 (2002).

Ramakrishnan, S., Wayne, N.L. Impact of bisphenol-A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reproductive and Toxicology* 25: 177-183 (2008).

## BIBLIOGRAFÍA

Rey, G., Meijide, F.J., Da, Cuña R.H., Lo Nostro, F.L., Piazza, I.G., Babay P.A., Trudeau, V.L., Maggese, M.C., Guerrero, G.A. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 150: 298-306 (2009).

Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S. In vivo effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory rodent studies. *Reproductive and Toxicology* 24 (2): 199-224 (2007).

Ring, J. A., Ghabriel, H., Ching, M. S., Smallwood, R. A., Morgan, D. J. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacology and Therapeutics* 84: 429-445 (1999).

Ritchie, S.A., Connell, J.M. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease* 17: 319-326 (2007).

Rose, J., Holbeck, H., Lindholm, C., Nørum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. Vitellogenin induction by 17  $\beta$ -estradiol and 17  $\mu$ -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and Physiology C. Toxicology and Pharmacology* 131 (4): 531-539 (2002).

Routledge, E.J., Sumpter, J.P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogen activity. *Journal Biology and Chemistry* 272: 3280-3288 (1997).

Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *Journal of Biological Chemistry* 275: 35986-35993 (2000).

Rubin, B.S., Soto, A.M. Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. It reviews mechanisms by which 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin may influence body weight. *Molecular Cellular Endocrinology* 304: 55-62 (2009).

Saidapur, S.K. Follicular atresia in ovaries of non-mammalian vertebrates. *International Review of Cytology* 54: 225-244 (1978).

## BIBLIOGRAFÍA

Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational Health* 43: 185-90 (2001).

Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinyloestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 70 (9): 768-779 (2007).

Schechter, A., Toniolo, P., Dai, L.C., Thuy, L.T., Wolff, M.S. Blood levels of DDT and breast cancer risk among woman living in the north of Vietnam. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33: 453-456 (1997).

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., Chahoud, I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives* 110: 703-707 (2002).

Serini, V. Polycarbonates. In: E.S. Wilks (ed.), *Industrial Polymers Handbook*, 291-304, Weinheim, Germany (2001).

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3): 302-314 (2003a).

Segner, H., Navas, J.M., Schäfers, C., Wenzel, A. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3): 315-322 (2003b).

Segner, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative biochemistry and physiology C. Toxicology and Pharmacology* 149 (2): 187-195 (2009).

Segura, J.J., Jimenez-Rubio, A., Pulgar, R., Olea, N., Guerrero, J.M., Calvo, J.R. In vitro effect of the resin component 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on substrate adherence capacity of macrophages. *Journal of Endodontics* 25 (5): 341-344 (1999).

Seiwa, C., Nakahara, J., Komiyama, T., Katsu, Y., Iguchi, T., Asou, H. Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells. *Neuroendocrinology* 80 (1): 21-30 (2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Setchel, B.P. The movement of fluids and substances in the testis. *Australian Journal of Biological Sciences* 39 (2): 193-207 (1986).

Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* 341: 1392-1395 (1993).

Siesser, W.B., Cheng, S.Y., McDonald, M.P. Hyperactivity, impaired learning on a vigilance task, and a differential response to methylphenidate in the TR\_PV knock-in mouse. *Psychopharmacology* 181: 653-663 (2005).

Singer, P.L. Occupational oligospermia. *Journal of the American Medical Association* 140: 149 (1949).

Singleton, D.W., Feng, Y., Chen, Y., Busch, S.J., Lee, A.V., Puga, A., Khan, S.A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and estradiol exert novel gene regulation in human MCF-7 derived breast cancer cells. *Molecular Cellular Endocrinology* 221: 47-55 (2004).

Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C.J., Fennell, T.R. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 168: 225-234 (2000).

Snyder, J. Styrene Not a Human Carcinogen, Does Not Contain BPA. Styrene Information and Research Center (SIRC) (2009).

Sohoni, P.C.R.T., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science Technology* 35: 2917-2925 (2001).

Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A. Perinatal exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters early adipogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 117: 1549-1555 (2009).

Soto, A.M., Maffini, M.V., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C. Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 20: 15-33 (2006).

Spano, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma

## BIBLIOGRAFÍA

vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology* 66: 369-379 (2004).

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological review of the Cambridge Philosophical Society* 83 (1): 13-34 (2008).

Spitsbergen, J.M., Kent, M.L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology* 31: 62-87 (2003).

Stahlhut, R.W., Welshons, W.V., Swan, S.H. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environmental Health Perspectives* 117 (5): 784-789 (2009).

Staples, C.A., Dorn, F.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., Harrys, L.N. A review of the environmental fate, effects, and exposures of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Chemosphere* 36 (10): 2149-2173 (1998).

Steinmetz, R., Brown, N. G., Allen, D. L., Bigsby, R. M., Ben-Jonathan, N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 138: 1780-1786 (1997).

Stillman, R.J. In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. *Am. J. Obstetrics and Gynecology* 142: 905-921 (1982).

Stoker, C., Rey, F., Rodríguez, H., Ramos, J.G., Sirosky P., Larriera, A. Sex reversal effects of *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *General Comparative Endocrinology* 133: 287-296 (2003).

Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., Suzumori, K.M. Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is associated with recurrent miscarriage. *Human Reproduction* 20: 2325-2329 (2005).

Sumpter, J.P., Jobling, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103 (7): 173-178 (1995).

## BIBLIOGRAFÍA

Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedicine Chromatography* 18 (8): 501-517 (2004).

Tabata, A., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., Itoh, M., Yamada, T., Kamei, T., Magara, Y. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Science and Technology* 47 (9): 51-57 (2003).

Takahashi, O., Oishi, S. Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ) in pregnant rats and placental transfer to fetuses. *Environmental Health Perspectives* 108: 931-935 (2000).

Takeuchi, T., Tsutsumi, O. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 291 (1): 76-78 (2002).

Takano, H., Yoshikawa, T., Ichinose, T., Miyabara, Y., Imaoka, K., Sugai, M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 36-42 (1997).

Takao, Y., Lee, C.H., Yasuhiro, I., Kohra, S., Tominaga, N., Arizono, K. Fast screening method for bisphenol A in environmental water and in food by solid-phase microextraction (SPEM). *Journal Health Science* 45: 39 (1999).

Takao, Y., Lee, H.C., Kohra, S., Arizono, K. Release of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin from food can lining upon heating. *Journal Health Science* 48: 31-334 (2002).

Talsness, C., Fialkowski, O., Gericke, C., Merker, H.J., Chahoud, I. The effects of low and high doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the reproductive system of female and male rat offspring. *Congen. Anomal.* 40: 94-107 (2000).

Tarvainen, K., Kanerva, L. Occupational dermatoses from plastic composites. *J. Environmental Medicine* 1: 3-17 (1999).

Taylor, J.A., Welshons, W.V., vom Saal, F.S. No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin throughout

## BIBLIOGRAFÍA

24h after administration in neonatal female mice. *Reproductive and Toxicology* 25 (2): 169-176 (2008).

Tian, X., Takamoto, M., Sugane, K. Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132: 240-247 (2003).

Trasande, L., Cronk, C., Durkin, M. Environment and obesity in the National Children's study. *Environmental Health Perspectives* 117: 159-166 (2009).

Trautmann, N. The dose makes the poison—or does it? *ActionBioscience.org*. <http://www.actionbioscience.org/environment/trautmann.html>. (2005).

Trujillo, M.E., Scherer, P.E. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 257: 167-175 (2005).

Tsao, T.S., Tomas, E., Murrey, H.E., Hug, C., Lee, D.H., Ruderman, N.B., Heuser, J.E., Lodish, H.F. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry* 278: 50810-50817 (2003).

Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D., Waechter, J.M. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicology Sciences* 68 (1): 121-146 (2002).

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical reviews in Toxicology* 28 (4): 319-361 (1998).

Toppari, J., Larse, J.C., Christiansen, P., Giwereman, A., Grandjea, N., Gillette, L.J., Jegon, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meze, O., Muller, E., Raiper De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebaek, N. *Male Reproductive Health and Environmental Chemicals with Estrogenic Effects*. Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen (1995).

Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Maekawa, M., Ito, C., Toshimori, K. Adverse effects of bisphenol A in mice and rats. *Archives of Histology and Cytology* 67: 373-381 (2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Twomey, K. Bisphenol A: Uterotropic assay in immature rats (subcutaneous dosing). Report to the 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Global Industry Group from Central Toxicology Laboratory, Cheshire, U. K. (1998a).

Twomey, K. Bisphenol A: Uterotropic assay in immature rats (oral dosing). Report to the 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Global Industry Group from Central Toxicology Laboratory, Cheshire, U. K. (1998b).

Ueno, M., Carvalheira, J.B., Tambascia, R.C., Bezerra, R.M., Amaral, M.E., Carneiro, E.M., Folli, F., Franchini, K.G., Saad, M.J. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* 48: 506-518 (2005).

Uglea, C.V., Negulescu, I. Synthesis and Characterization of Oligomers. CRC Press 103 (2005)

Upmeier, A., Degen, G.H., Diel, P., Michna, H., Bolt, H.M. Toxicokinetics of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Archives of Toxicology* 74: 431-436 (2000).

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Toxics Release Inventory (TRI) Explorer Report (2005).

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 41 (4): 458-467 (2001).

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 271-281 (2003).

Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V. Human exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Reproductive Toxicology* 24: 139-177 (2007).

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M. Bisphenol-A and the great divide. A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews* 30: 75-95 (2009).

## BIBLIOGRAFÍA

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J., Schoenfelder, G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 118 (8): 1055-1070 (2010).

van der Ven, L.T., Wester, P.W., Vos, J.G. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (4): 908-913 (2003).

van der Ven, L.T., van den Brandhof, E.J., Vos, J.H., Wester, P.W. Effects of the estrogen agonist 17beta-estradiol and antagonist tamoxifen in a partial life-cycle assay with zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology Chemistry* 26 (1): 92-99 (2007).

Van't Veer, P., Lobbezoo, I.E., Martín-Moreno, J.M., Guallar, E., Gómez-Aracena, J., Kardinaal, A.F.M., Kohlmeier, L., Martin, B.C., Strain, J.J., Thamm, M., Van Zoonen, P., Baumann, B.A., Huttunen, J.K., Kok, F.J. DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: case control study. *Brain Journal Medicine* 315: 81-85 (1997).

Vermeirssen, E.L., Burki, R., Joris, C., Peter, A., Segner, H., Suter, M.J. Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology Chemical* 24: 2226-2233 (2005).

Vermiglio, F., Lo Presti, V.P., Moleti, M., Sidoti, M., Tortorella, G., Scaffidi, G., Castagna, M.G., Mattina, F., Violi, M.A., Crisa, A., Artemisia, A., Trimarchi, F. Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 6054-6060 (2004).

Vigano, L., Mandich, A., Benfenati, E., Bertolotti, R., Botero, S., Porazzi, E. Investigating the estrogenic risk along the river Po and its intermediate section. *Arch Environmental Contamination and Toxicology* 51: 641-651 (2006).

Vivacqua, A., Recchia, A.G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M.L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A., Maggiolini, M. The food contaminants 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* 22 (3): 275-284 (2003).

Völkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G., Dekant, W. Metabolism and Kinetics of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Humans at Low Doses Following Oral Administration. *Chemical Research Toxicology* 15: 1281-1287 (2002).

## BIBLIOGRAFÍA

Völkel, W., Bittner, N., Dekant, W. Quantitation of bisphenol A and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug and Metabolism Disposition* 33 (11): 1748-1755 (2005).

vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., Welshons, W.V. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings Natural Academic Science* 94: 2056-2061 (1997)

vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S., Welshons, W. V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health* 14: 239-260 (1998).

vom Saal, F.S., Richter, C.A., Ruhlen, R.R., Nagel, S.C., Timms, B.G., Welshons, W.V. The importance of appropriate controls, animals feed, and animal models in interpreting results from low-dose studies of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin . *Clinical Molecular Teratology*, 73:140-145 (2005).

vom Saal, F.S, Hughes, C. An extensive new literature concerning low-dose effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*: 113: 926-933 (2005).

vom Saal, F.S., Welshons, W.V. Large effects from small exposures.II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research* 100: 50-76 (2006).

vom Saal, F.S., Myers, J.P. Bisphenol A and a risk of metabolic disorders. *JAMA* 300 (11): 1353-1355 (2008).

von Mutius, E. (2000). The environmental predictors of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 9-19 (2000).

Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Criticals reviews in Toxicology* 30 (1): 71-133 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

Wang, Z.V., Schraw, T.D., Kim, J.Y., Khan, T., Rajala, M.W., Follenzi, A., Scherer, P.E. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Molecular Cellular Biology* 27: 3716-3731 (2007).

Weber, L. P., Hill, R.L., Janz, D.M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquatic Toxicology* 63: 431-446 (2003).

Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives* 111 (8): 994-1006 (2003).

Welshons, W.V., Nagel, S.C., vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin at levels of human exposure. *Endocrinology* 147 (6): 56-69 (2006).

Wen-Tien, T. Human health risk on environmental exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : A review. *Journal of environmental Science and Health, part C*, 24 (2) : 225-255 (2006).

Wetherill, Y.B., Petre, C.E., Monk, K.R., Puga, A., Knudsen, K.E. The xenoestrogen 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapy* 1: 515-524 (2002).

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C. In vitro molecular mechanisms of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin action. *Reproductive and Toxicology* 24 (2): 178-198 (2007).

Wilson, N.K., Chuang, J.C., Lyu, C. Levels of persistent pollutants in several child day care centers. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 11: 449-458 (2001a).

Wilson, N.K., Chuang, J.C., Lyu, C., Menton, R., Morgan, M.K. Aggregate exposures of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care at home. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 13: 187-202 (2001b).

## BIBLIOGRAFÍA

Wilson, N.K., Chuang, J.C., Morgan, M.K., Lordo, R.A., Sheldon, L.S. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environmental Research* 103 (1): 9-20 (2007).

Wixon J. *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17: 225-231 (2000).

Wolf, J.C., Dietrich, D.R., Friedrich, U., Caunter, J., Brown, A.R. Qualitative and quantitative histomorphologic assessment of fathead minnow *Pimephales promelas* gonads as an endpoint for evaluating endocrine-active compounds: A pilot methodology study. *Toxicologic Pathology* 32: 600-612 (2004).

Wright, H.M., Clish, C.B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C.N., Spiegelman, B.M., 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *Journal of Biology and Chemistry* 275: 1873-1877 (2000).

Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., Wang, X.R. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216 (2-3): 197-203 (2005).

Yamada, K., Uruse, T., Matsuo, T., Suzuki, N. Constituents of organic pollutants in leachates from different types of landfill sites and their fate in the treatment processes. *Journal of the Japan Society for Water and Environmental Engineering* 22: 40-45 (1999).

Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42: 415-418 (2001).

Yang, M., Kim, S.Y., Lee, S.M., Chang, S.S., Kawamoto, T., Jang, J.Y., Ahn, Y.O. Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 546-551 (2003).

Yang, F.X., Xu, Z., Hui, Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology part C* 142: 77-84 (2006).

Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383: 638-644 (2005).

## BIBLIOGRAFÍA

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates — a review. *Environ. Int.* 28: 215-226 (2002).

Ying, G.G., Kookana R.S. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environmental Science Technology* 37: 1256-1260 (2003).

Yoder, J.A., Nielsen, M.E., Amemiya, C.T., Litman, G.W. Zebrafish as an immunological model system. *Microbes and infection* 4 (14): 1469:1478 (2002).

Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., Yuasa, A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochemical Journal* 340: 405-409 (1999).

Yoo, S.D., Shin, B.S., Kwack, S.J., Lee, B.M., Park, K.L., Han, S.Y., Kim, H.S. Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *Journal Toxicology and Environmental Health A* 61 (2): 131-139 (2000).

Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H. Determination of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* 18: 69-75 (2001).

Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., Ohta, S. Potent estrogenic metabolites of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicology Science* 78 (1): 50-59 (2004).

Youn, J.Y., Park, H.Y., Lee, J.W., Jung, I.O., Choi, K.H., Kim, K., Cho, K.H. Evaluation of the immune response following exposure of mice to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Archives of Pharmacology Research* 25 (6): 946-953 (2002).

Yurino, H., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Ito, T., Ueha, S., Inadera, H., Matsushima, K. Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicology Science* 81 (1): 139-147 (2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., Cravedi, J.P. Biotransformations of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environmental Health Perspectives* 111 (3): 309-319 (2003).

Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146: 607-612 (2005).

Zha, J., Wang, Z., Wang, N., Ingersoll, C. Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere* 66: 488-495 (2007).

Zincke, T. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium der Universitat Marburg. *Justus Leibigs Annals Chemie*, vol. 343: 75-99 (1905).