



*MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD
ESTROGÉNICA PRESENTES EN PESCADO FRESCO OBTENIDO EN DIFERENTES
PUNTOS DE UNA PLAZA DE MERCADO DE GIRARDOT*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ, 2020



*MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD
ESTROGÉNICA PRESENTES EN PESCADO FRESCO OBTENIDO EN DIFERENTES
PUNTOS DE UNA PLAZA DE MERCADO DE GIRARDOT*

Trabajo de grado requisito para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

JOHANA KATHERINE MORA YANQUEN

ASESORA INTERNA

MSc. PATRICIA CIFUENTES PRIETO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ, 2020

DEDICATORIA

A ti abuelo que siempre has creído en mí y me has amado con eternidad, a tus sabios consejos fruto de tu experiencia, al cariño que nos une y la sinceridad de nuestra amistad.

A ti Samuel David que me enseñaste a conocer el amor y el dolor, a romperme y renacer, a nunca dejar de luchar aunque las posibilidades sean mínimas. A creer en mí y en mi potencial. A reconocer que puede existir fuerza incluso en la fragilidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por acompañarme en el recorrido y culminación de este sueño que sin duda me ha enseñado a traspasar los límites de mi pensamiento y comprender que la felicidad se encuentra detrás de nuestros miedos y obtenerla es solo cuestión de decisión.

A mi madre que con paciencia y amor me apoyó.

A mi abuela que sin entender el porqué de mis angustias siempre me tranquilizó.

A mis hermanas por hacer mis días más llevaderos.

A mis compañeros y amigos por sus consejos.

A mis profesores, especialmente a la profesora Patricia Cifuentes Prieto por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y corregirme cuando se hizo necesario y al profesor Alejandro Castaño Vásquez cuyos consejos fueron cruciales para la culminación de este proyecto.

A la ciencia por impulsar mi corazón a continuar.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	18
3. ANTECEDENTES	19
4. MARCO TEÓRICO.....	25
4.1 Compuestos de Disrupción Endocrina	25
4.1.1 ESTRÓGENOS	27
4.2 XENOESTRÓGENOS ASOCIADOS A LOS PECES Y SUS EFECTOS DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR	35
4.2.1 ESTEROIDOGÉNESIS EN PECES.	37
4.2.2 EFECTOS GENÓMICOS DE LOS EDs SOBRE LA SALUD REPRODUCTIVA DE PECES.....	41
4.3 PRESENCIA DE SUSTANCIAS DISRUPTORAS ENDOCRINAS EN EL AMBIENTE.	44
4.3.1 Principales compuestos químicos con actividad estrogénica en el medio acuático.....	46
4.4 SITUACIÓN DE PESCA EN COLOMBIA.....	48
4.4.1 Contaminación río Magdalena.....	50
4.5 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA EN PECES.....	53
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	57
5.1 Tipo de investigación	57
5.2 Población de estudio.....	57
5.3 Muestra.....	57
5.4 Hipótesis y Variables	57
5.4.1 Hipótesis	57
5.4.2 Variables independientes	58
5.4.3 Variables dependientes	58
5.5 Indicadores	58
6. MATERIALES Y MÉTODOS	59
6.1 Toma de muestras.....	59
6.1.1 Preparación de las muestras.....	59
6.2 MONTAJE E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA.....	61
6.2.1 Reconstitución de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61

6.2.2 Implementación de la Técnica YES	61
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	65
8. CONCLUSIONES.	74
9. RECOMENDACIONES.	75
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Biosíntesis de estrógenos.....	28
Figura 2. Estructura de los receptores de estrógenos alfa y beta.	32
Figura 3. Ilustración esquemática de los mecanismos de señalización de los ER.	34
Figura 4. Proceso de estimulación hormonal en peces eje hipotálamo-hipófisis gonadal.....	36
Figura 5. Esteroidogénesis.....	38
Figura 6. Regulación hormonal de la maduración de oocitos en peces.....	41
Figura 7. Biosíntesis de proteínas ovogénicas estimuladas por compuestos estrogénicos.	43
Figura 8. Medios de exposición a los estrógenos.	45
Figura 9. Perfil del Río Magdalena.....	50
Figura 10. Esquema del sistema de expresión inducible por estrógenos en levadura	56
Figura 11. Montaje placa de ensayo.	63
Figura 12. Curva patron 17 β -estradiol placa n° 1	65
Figura 13. Placa n°2 de microtitulación exhibiendo la respuesta de la técnica YES frente a EDs presentes en pescado.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Disruptores endocrinos comunes en el medio acuático.	47
Tabla 2. Principales departamentos, fuentes y actividades humanas que afectan al río Magdalena.	52
Tabla 3. Promedio de las D.O corregidas de los últimos 20 ensayos.	61
Tabla 4. Resultados de actividad estrogénica obtenidos con las muestras de pescado.	66
Tabla 5. Características químicas de los disolventes.	70

LISTA DE ABREVIATURAS.

Ampc	Adenosín monofosfato cíclico
AP1	Factor de transcripción 1
CBP	CREB binding protein
CCI	Corporación Colombiana Internacional
COPS	Contaminantes orgánico persistentes
CPRG	Clorofenol Rojo Beta D-Galactopiranósido
DBD	Dominio de unión al ADN
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DDE	Diclorodietiniltricloroetano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTH	Dihidrotestosterona
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EDs	Disruptores endocrinos
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FSH	Hormona folículo estimulante

GC MS/MS	Gas Chromatograph/Mass Spectrometer/Tandem Mass Spectrometry
GC/MS	Gas Chromatograph/Mass Spectrometer
GF	Growth Factor
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
IH	Inmunohistoquímica
LAC-Z	operon lac
LBD	Dominio de unión al ligando
LC/MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LH	Hormona luteinizante
MIS	Maturation Inducing Steroid
P450ssc	Cholesterol side-chain cleavage
PCB	Bifenilos policlorados
PCDD	Dibenzodioxinas policloradas
PCDF	Dibenzofuranos policlorados
PVC	Policloruro de vinilo
RE	Receptores estrogénicos
RIA	Radioimmunoassay
RIPS	Receptor Interacting Proteins
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SERMS	Modulador selectivo de los receptores estrogénicos
SRC1	Steroid receptor coactivator-1
StAr	Steroidogenic acute regulatory protein
TF	Transcription factor
Vtg	Vitelogenina
YES	Yeast estrogen screen
Zrp	Proteína de zona radiada

RESUMEN

El Río Magdalena representa la principal actividad de pesca en Colombia siendo una de las fuentes fundamentales de abastecimiento para consumo humano. Los productos que masivamente han mostrado incremento en el consumo a nivel nacional son: Bocachico y Bagre. Sin embargo, algunas especies de peces se han visto afectadas por compuestos de disrupción endocrina capaces de generar desequilibrio hormonal y como consecuencia desencadenar una serie de patologías que terminan afectando órganos diana donde ejercen sus efectos, además de perjudicar indirectamente al ser humano que lo consume. Dichas sustancias son producto de la contaminación a la que diariamente el Río Magdalena se ve expuesto, al ser una desembocadura para vertimientos de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas que impactan negativamente sobre sus características fisico-químicas y determinan su perfil eco toxicológico.

Por tal razón en el presente trabajo se propuso evaluar la presencia de sustancias de tipo estrogénico en pescado fresco: Bocachico y Bagre, obtenidos de diferentes puntos de una plaza de mercado del municipio de Girardot provenientes del río Magdalena, mediante la técnica Yeast Estrogen Screen empleando dos tipos de solventes diferentes para su extracción: n- Hexano y etanol absoluto. De acuerdo a los resultados obtenidos solo una muestra correspondiente a extracción con etanol absoluto, presentó sustancias con actividad estrogénica exhibiendo una concentración de 6 ng/L en equivalentes de 17 β -estradiol (EEQ).

Estos resultados permitieron concluir que la técnica YES es sensible, específica y rápida para la determinación de EDs en pescados cuando se trabaja bajo condiciones específicas de prueba.

Palabras clave: Disruptores endocrinos, Yeast Estrogen Screen, Río Magdalena, Contaminantes orgánico persistentes, Pescado fresco.

1. INTRODUCCIÓN

Años después de la revolución industrial donde inició la generación de productos industriales para solventar las llamadas “necesidades humanas”; se desarrollaron una serie de enfermedades sin causa aparente; debida a su alta incidencia, en la segunda mitad del siglo XX se empezaron a llevar a cabo investigaciones para determinar nuevas aproximaciones en la etiología de la enfermedad¹. La producción deliberada de sustancias químicas introducidas al medio ambiente aumentó significativamente, al mismo tiempo que se correlacionaba con un aumento de la incidencia de enfermedades Hormono-dependientes en personas con mayores niveles de exposición. Posteriormente se identificaron alteraciones en varias especies acuáticas y terrestres principalmente a nivel del sistema reproductor^{2,3}.

La tesis patogénica subyacente explica que existen varias sustancias químicas capaces de funcionar como hormonas produciendo un desequilibrio en la homeostasis hormonal. Dichos compuestos exógenos o Xenobióticos actúan como agonistas o antagonistas hormonales imitando o bloqueando su acción natural, gracias a la condición que les confiere su estructura química capaz de unirse al receptor de estrógenos, por lo cual se les atribuye el término de Disruptores Endocrinos (EDs)^{5,6}.

El término Compuesto de Disrupción Endocrino (Endocrine Disrupting Chemicals / EDCs) define un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos exógenos, capaces de alterar la síntesis, liberación, transporte, metabolismo, enlace, acción o eliminación de las hormonas naturales en el organismo. Estas sustancias se conocen por su capacidad de actuar alterando la síntesis de hormonas, vías metabólicas, modificando el aclaramiento plasmático o actuando directamente sobre la expresión génica mediante modificaciones genéticas sin cambiar las secuencias nucleotídicas provocando daños neurológicos, reproductivos, metabólicos, inmunológicos entre otros; correlacionados con la interferencia de sustancias no pertenecientes al organismo de animales o humanos, con la afinidad entre su naturaleza química y una célula diana capaz de reconocerla⁷.

Los contaminantes orgánicos persistentes o COPS constituyen el grupo de compuestos de Disruptores endocrinos (EDs) mayormente implicados en los daños provocados a la salud y el medio ambiente. Se conocen por persistir en el medio ambiente, bioacumularse y

transportarse a largas distancias gracias a su estabilidad. Actualmente, se habla de compuestos que fácilmente interactúan en la vida cotidiana de humanos y animales integrando la composición de productos químicos que va desde Bifenilos policlorados y Ftalatos presentes en materiales plastificantes hasta plaguicidas empleados en el control de plagas en la agroindustria ^{7,8}.

La creciente e inevitable sobreproducción de estos químicos ha causado un desequilibrio ambiental ya que no se eliminan con la misma celeridad con la que se producen, como consecuencia se encuentran contaminando las masas de aire y los cuerpos de agua; ambientes indispensables para la vida terrestre y acuática ^{8,9}.

Las especies más afectadas son las especies acuáticas lo cual se explica por ser los cuerpos de agua puntos claves para confluir la mayor parte de residuos domésticos e industriales; los peces empleados para el abastecimiento del comercio resultan preocupantes. Grandes series de estudios alrededor del mundo han reportado cambios morfofisiológicos, principalmente a nivel de sistema reproductivo tales como: hermafroditismo, disminución del éxito de eclosión, hiposex, disminución del recuento espermático, esterilidad, vitellogenesis en pez macho, infertilidad, desfeminización entre otras ⁹. Patrones claves que determinan la presencia de EDs en animales de gran importancia comercial, que si no se regulan pueden suponer cambios drásticos en la producción e inocuidad de los alimentos, suponiendo no solo un daño a nivel industrial sino un costo específico a nivel de Salud Pública, por el aumento de casos de enfermedades hormono-dependientes que se producen por consumo de especies contaminadas con sustancias químicas sin regulación estatal.

Sin embargo, esta problemática no es netamente atribuible a los COPS, ya que a éstos se suman los metales pesados siendo fuentes importantes de contaminación de los cuerpos de agua colombianos, como consecuencia de la minería ilegal. La macrocuenca del río Magdalena supone una de las fuentes fluviales más afectadas y el mercurio se encuentra entre los hallazgos toxicológicos en peces más frecuentes.

Teniendo en cuenta el grado de contaminación de las aguas superficiales de Colombia, haciendo énfasis en el río Magdalena, los patrones de contaminación de uso de compuestos químicos en el país y las especies susceptibles; se expone la necesidad de determinar la

presencia de sustancias con capacidad disruptora endocrina en pescado fresco proveniente del río Magdalena, obtenido de diferentes puntos de una plaza de mercado del municipio de Girardot que pueden afectar directamente a peces e indirectamente a humanos cuando estos lo consumen. El presente trabajo dispone de un protocolo de actividades desarrolladas para su determinación, cuantificación y análisis a partir de la implementación de la Técnica Yeast Estrogen Screen (YES).

2. OBJETIVOS

- **General**

Determinar la presencia de sustancias con actividad estrogénica en pescado fresco, Bagre y Bocachico, obtenido en diferentes puntos de una plaza de mercado de Girardot.

- **Específicos**

- Detectar la presencia de sustancias de tipo estrogénico en los dos tipos de pescado de mayor consumo en el municipio de Girardot provenientes del río Magdalena mediante la técnica *Yeast Estrogen Screen*.

- Contrastar dos métodos de extracción diferentes para la obtención de sustancias con actividad estrogénica en pescado fresco, que permitan su posterior determinación mediante la técnica *Yeast Estrogen Screen*.

3. ANTECEDENTES

Los Disruptores Endocrinos (EDs) han retomado importancia desde la presentación del libro Primavera silenciosa (Silent spring) de Carson, el cual fue publicado el 27 de septiembre de 1962, en este libro se resalta la importancia del ambiente y cómo afecta directamente la salud, advierte de los efectos perjudiciales de los pesticidas en el medio ambiente, tanto en animales como en humanos y culpa a la industria química de la creciente contaminación¹. Además, infiere que “*gracias a las acciones del hombre en su afán de controlar todo tipo de insectos, hongos y plantas de malezas, hoy las personas están siendo envenenadas en una escala infame, dichos productos químicos capaces de inducir cáncer permanecen como residuos en prácticamente todo lo que comemos y bebemos*”². Estos nuevos conceptos fueron rechazados por algunos científicos que los definieron como argumentos carentes de sentido³. Sin embargo, se convirtió en la primera alerta que dio conocimiento sobre la contaminación ambiental y modelo para generar conciencia ecológica.

A partir de este momento, el libro se convirtió en una inspiración para llevar a cabo una movilización ecológica, la cual consiguió que el departamento de agricultura revisara su política sobre pesticidas, donde se logró que el Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) un compuesto organoclorado principal, se prohibiera. Posteriormente, se creó la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (1970), EPA⁴, con lo que se logró después de 23 años que varios países incluyendo Colombia, desarrollaran sistemas de protección ambiental cuyas normas y directrices protegieran el patrimonio ambiental de cada país.⁵

Vale la pena establecer que el término disruptor endocrino fue acuñado por primera vez en 1991 en una conferencia de Racine, Wisconsin impartida por Theo Colborn, entonces miembro del World Wildlife Fund y de la W. Alton Jones Foundation. Aparece por primera vez en la literatura científica en un artículo de 1993 la Teoría de la disrupción endocrina⁶ mediante la cual se define que varias sustancias presentes en el ambiente impiden la homeostasis hormonal, bloqueando al sistema endocrino de su acción fisiológica y una exposición a largo plazo puede provocar efectos irreversibles⁷.

Desde antes de 1995 hasta hoy estudios han reportado la presencia de EDs en los cuerpos acuíferos; la gran diversidad y número de estas sustancias ha dificultado la capacidad de las investigaciones para determinar el tipo de compuestos que se ven implicados y su procedencia. Autores afirman que la contaminación de los ríos se presenta principalmente por los indebidos procesos de tratamiento de las aguas residuales e industriales, que muchas veces son omitidos y como consecuencia desembocan en los cuerpos de agua: ríos, lagos y mares; produciendo su contaminación y por lo tanto alterando la fisiología normal de las especies acuáticas que lo integran. En respuesta a este problema se han estudiado nuevos modelos biológicos para identificar la presencia de disruptores endocrinos en cuerpos acuíferos ⁸ ya que; muchos de estos químicos pueden perturbar el desarrollo del sistema endocrino y de los órganos que responden a las señales hormonales en organismos expuestos indirectamente durante la vida prenatal y/o postnatal temprana. Los efectos de la exposición durante el desarrollo son permanentes e irreversibles⁹.

Los peces son las especies acuáticas más empleadas en los estudios de determinación de disruptores endocrinos. Los reportes realizados concuerdan con que estas sustancias interactúan principalmente con el sistema reproductor masculino y femenino a nivel del eje hipotálamo-hipofisis-gonadas, produciendo diferentes respuestas que implican cambios sexuales en las diferentes especies ¹⁰. Sumpter J. fue uno de los primeros investigadores en interesarse sobre el funcionamiento de los estrógenos ambientales y los efectos que producía en peces. Inicialmente basó sus estudios en entender el por qué este tipo de animales varía en el número y tamaño de los huevos que produce. Trabajó en la determinación de niveles de vitelogenina en plasma de peces hembra y macho; estudio a partir del cual formuló la hipótesis de que la producción irregular de dicho analito en peces macho, podía ser causa de la presencia de píldoras anticonceptivas o sustancias químicas en los efluentes; ¹¹ que estimulan su producción por su actuación a través de receptores específicos de estrógeno que se encuentran presentes en grandes concentraciones en el hígado ^{12,13}.

Como resultado de las alteraciones encontradas en peces macho y basado en reportes anteriores donde afirmaban el aumento de desfeminización de esta especie y otros animales, como por ejemplo los caimanes macho; nace la hipótesis de la teoría de los disruptores endocrinos: *“la disminución de la salud reproductiva masculina y la posible disminución de la fertilidad, pueden estar relacionadas con la presencia en el entorno de compuestos*

químicos que imitan o alteran los estrógenos (las hormonas sexuales femeninas) o los andrógenos (las hormonas masculinas)”¹¹.

Sumpter y su equipo iniciaron investigaciones sobre el proceso de feminización de los peces y llevaron a cabo la determinación de químicos estrogénicos más prevalentes en los efluentes de aguas residuales, encontrándose así que nueve de veinte contaminantes químicos eran capaces de unirse al receptor de estrógenos y producir su activación comprobando la teoría de la disrupción endocrina ¹¹.

Por estas razones, las enfermedades producidas por EDs en peces, han sido sustentadas por diferentes estudios en los cuales se ha coincidido con el desarrollo de una enfermedad en particular; obteniéndose como resultado una visión general de las alteraciones sobre la salud más frecuentes, asociados a la exposición de sustancias químicas de síntesis en peces incluyendo enfermedades hormono-dependientes, incluso si los EDs se encuentran en cantidades limitadas, pues se les atribuye la capacidad de acumulación y persistencia en el organismo¹⁴.

Así pues, debido a la problemática global de EDs persistentes en el ambiente, se han llevado a cabo investigaciones para determinar la capacidad de estas sustancias de interferir en la fisiología normal de especies acuáticas, las cuales se describen a continuación en orden cronológico.

Suiza 2002: reporte de disminución en la captura de más del 50% de peces en lagos y ríos desde 1985-1999; siendo la trucha la especie más afectada, presencia de niveles elevados de vitelogenina en peces macho, malformación gonadal, actividad estrogénica elevada aguas abajo de la salida de los efluentes y aguas residuales¹⁵.

Determinación de vitelogenina sérica como marcador biológico posterior a la exposición de peces a compuestos químicos estrogénicos como: estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, octilfenol y bisfenol A; empleados de manera individual y conjunta, cuyo estudio demostró resultados insignificantes de producción de vitelogenina cuando actúan solos y un aumento en los niveles de vitelogenina mayor al 50% cuando actúan de manera aditiva¹⁶.

Efectos morfológicos como aumento en el tamaño de los peces, desfeminización, disminución del tamaño testicular, del recuento espermático, esterilidad, hipertrofia de las células de sertoli y disminución en el número de células espermáticas de los peces guppy (*Poecilia reticulata*), cuando son expuestos a concentraciones elevadas de 17-etinilestradiol (200 ng/L) desde su nacimiento hasta la edad adulta¹⁷.

En Alemania un estudio llevado a cabo con peces Besugo del río Elba demostró la correlación entre la disminución de la actividad aromatasa, enzima implicada en los procesos de biosíntesis de estrógenos, con la disminución en la producción de estradiol (E2) y 11-Ketosterona, definiendo así a los EDs como inhibidores de la síntesis final de estrógenos y andrógenos; los cuales, además se relacionan con procesos como la regulación de la proliferación neuronal y la sinaptogénesis en los mamíferos¹⁸.

En Trondheim, Noruega determinaron los efectos de los EDs sobre los peces salmónidos y la capacidad de inducir la transcripción de genes implicados en la esteroidogénesis encontrando variación en la regulación transcripcional de las expresiones de los genes StAR, P450_{scc} y CYP11 β en el cerebro del salmón y en la corteza suprarrenal. La interrupción de la proteína StAR y la sobreexpresión del P450_{scc} producen un desequilibrio neuronal ya que grandes cantidades de esta proteína induce la producción de sustancias bioactivas tóxicas y como consecuencia interfiere en el funcionamiento del cerebro¹⁹.

Reporte de EDs como responsables del desequilibrio en la homeostasis inmune en teleósteos: El efecto inmunomodulador de los EDs sobre el sistema inmune se explica por la amplia distribución de los receptores estrogénicos en los tejidos inmunes; órganos diana para esteroides sexuales. Esta relación puede explicar la sensibilidad a las enfermedades infecciosas durante la gametogénesis, como consecuencia de la inmunosupresión por esteroides sexuales y se ilustra por el impacto de sus EDs relacionados en la inmunidad de los peces²⁰.

Deformidades esqueléticas como anomalías en espinas, arcos vertebrales y mandíbulas en poblaciones de *Aphanius fasciatus* recogidas en la costa Tunecina se reportaron al mismo tiempo que el nivel de contaminación de los peces con metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).²¹

Como resultado de la exposición inadvertida de los humanos y animales a sustancias disruptoras endocrinas entre ellas pesticidas, nacen dos leyes mediante las cuales se busca regular la producción de químicos persistentes en el ambiente capaces de interrumpir la fisiología humana; Ley 1252 de 2008 “Por medio de la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos”²² y Ley 1196 de 2008 “Por medio de la cual se aprueba el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPS)”²³.

Los compuestos organoclorados son COPS que se encuentran con mayor frecuencia presentes en el medio ambiente y en la cadena alimentaria humana. Estos compuestos se han encontrado de manera diversa en peces y otros animales de vida acuática, cuya relación directa en su concentración está dada por la cantidad de materia grasa presente en los animales que permiten una mayor captación de los contaminantes y, de esta manera facilitar su incorporación en el cuerpo humano mediante la dieta. COPS implicados: DDT y DDE; metoxicloro; clordano dicofol; dieldrina; endosulfán; lindano; heptacloro hexaclorobenceno, Ácidos 2,4-dicloro y 2,4,5-tricloro-fenoxiacético; Bifenilos policlorados (PCB), Dibenzodioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranospoliclorados (PCDF)²⁴.

Hay evidencia concluyente que muestra que, en general, el pescado en la dieta humana contribuye con una proporción significativa de la ingesta total de COPs, particularmente pescado con niveles más altos de grasa²⁴. Estudios comparativos realizados en diferentes partes del mundo se llevaron a cabo midiendo el plasma y leche materna de personas que basan su dieta principalmente en fuentes marinas, comparado con iguales muestras biológicas de personas que rara vez optan por este tipo de dieta (población control), los resultados de las diferentes investigaciones concertaron en que los niveles de COPS estaban considerablemente más altos en personas expuestas comparadas con la población control^{24,25}.

Como consecuencia de la acumulación de EDs en humanos se describen enfermedades importantes que muestran un panorama puntual de sus efectos frente al sistema endocrino humano, cuyas consecuencias se relacionan con las presentadas en los peces ya que estos comparten características morfo-fisiológicas. A continuación se nombran las enfermedades relacionadas con la presencia a EDs en el ambiente: Niveles hormonales en sangre anormales,

reducción de la fertilidad, alteración del comportamiento sexual , modificación del sistema inmunológico , masculinización de hembras , feminización de machos (reducción del tamaño de testículos y pene) ,criptorquidia (no descenso testicular) , cánceres en órganos reproductores femeninos y masculinos , malformaciones de trompas de Falopio, útero y cérvix,alteraciones de la densidad y estructura ósea. ^{26,27}

Como resultado de los efectos confirmados como consecuencia de la exposición inadvertida de los EDs en animales y humanos, se han realizado investigaciones para reportar el grado de contaminación al que diariamente se está expuesto. Estudiantes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca han reportado la presencia de EDs en la superficie de alimentos para consumo en fresco procedentes de varias centrales de venta de Bogotá²⁸, en la fresa (*fragaria sp*)²⁹ y en los cuerpos de agua cuenca alta del río Bogotá relacionados con descargas de aguas residuales, industriales y domésticas³⁰

4. MARCO TEÓRICO

Las hormonas son mensajeros bioquímicos que dirigen las funciones de los órganos del cuerpo y otros tejidos. Estos productos químicos ordenan a las células a nivel sistémico. El cerebro coordina la liberación de hormonas y envía a estos mensajeros mediante el torrente sanguíneo a un órgano diana cuando se requiere mediar una actividad específica. Actualmente existen químicos industriales y contaminantes que pueden imitarlos; una vez ingresan al cuerpo pueden alterar el sistema de señalización hormonal definiendo cuándo, cómo y dónde actuar en el cuerpo.

En toxicología, los científicos que estudian los efectos de productos tóxicos y venenosos sobre el organismo, se refieren a estos imitadores de hormonas como COMPUESTOS DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA (CDEs)³⁴.

4.1 Compuestos de Disrupción Endocrina

A partir de la Conferencia de Wingspread celebrada en Wisconsin, USA, en 1991 fundamentada en el principio de precaución, se acuña por primera vez el término de disruptor endocrino ED para referirse a un grupo de sustancias químicas exógenas al organismo que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo³¹.

Los EDs pueden ser naturales como la estrona (E1), el estradiol (E2) y el estriol (E3) producidos de forma natural en el organismo a partir del colesterol; o sintéticos (xenoestrógenos) presentes en el medio ambiente capaces de desencadenar una respuesta estrogénica por imitar la acción del 17- β -estradiol (E2) endógeno, mediante su estructura química que les confiere la capacidad de unirse a receptores alfa o beta estrógenos y ejercer su acción³⁵. Los xenoestrógenos se caracterizan por encontrarse de manera persistente en el ambiente, estar presentes en concentraciones elevadas y ser bioacumulables en los órganos y tejidos tanto de animales y humanos gracias a la naturaleza lipofílica que poseen³⁶.

Actualmente, las sustancias que se conocen con potencial estrogénico presentes en el medio ambiente son numerosas. Hacen parte de xenoestrógenos de gran importancia gracias a su persistencia, bioacumulación y química órganohalógena sustancias como: plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), sustancias químicas industriales, productos sintéticos y metales pesados ³⁷.

Los EDs se basan en cuatro principales mecanismos de acción para interferir en la señalización y regulación natural del sistema endocrino en el cuerpo: 1) mimetizan la acción de los estrógenos naturales. 2) Antagonizan la acción de las hormonas. 3) Alteran el patrón de síntesis y metabolismo de las hormonas naturales modificando sus niveles fisiológicos. 4) Modulan los niveles de receptores hormonales ³⁷.

Al ser sustancias que no integran el sistema fisiológico y regulatorio del cuerpo, ejercen efectos tóxicos dependientes del tiempo de exposición y la concentración en la que se encuentren disponibles en el ambiente ³⁸.

La complejidad de los EDs, sus mecanismos de acción y la variabilidad de sus efectos impiden condicionar la relación de causalidad entre exposición y enfermedad ya que poseen características particulares que difieren distintivamente de otros tóxicos. No todos los xenoestrógenos ejercen el mismo mecanismo y producen siempre la misma enfermedad. Los efectos son adversos y no existe la máxima de causa-efecto; razón por la cual se le atribuyen características particulares de toxicidad. 1) La fase de desarrollo concebida como el momento de exposición (embrión, feto, organismo, perinatal, adulto) es decisiva para determinar la gravedad del efecto y su posterior evolución. 2) Los efectos no aparecen en el momento en que se da la exposición. 3) No hay una dosis umbral que demuestre un efecto tóxico del compuesto. 4) Los EDs tienen la facultad de actuar conjuntamente produciendo un efecto sinérgico, antagónico o aditivo ³⁸.

Los mecanismos de acción se desarrollan como consecuencia principal de la interacción directa de los EDs con receptores nucleares como: estrógenos, andrógenos, progesterona, tiroideos, entre otros. Sin embargo hoy, diferentes investigaciones confirman que ejercen su efecto a un nivel más amplio y complejo; además de alterar la señalización de los receptores

nucleares, los EDs actúan vía receptores no nucleares de hormona esteroidea, receptores esteroideos (receptores neurotransmisores como el de serotonina, dopamina, norepinefrina) coactivadores transcripcionales, vías enzimáticas relacionadas con la biosíntesis y/o metabolismo de los esteroides. Además son capaces de actuar sobre los genes y producir cambios epigenéticos con principal susceptibilidad de las especies en etapas prematuras de desarrollo, generando cambios en la expresión del fenotipo y como consecuencia conllevar a la herencia transgeneracional de la enfermedad^{39,40}.

4.1.1 ESTRÓGENOS

Según su naturaleza química las hormonas se clasifican en aminas, péptidos y esteroides. Las hormonas esteroideas se generan a partir del colesterol y son sintetizadas por diferentes glándulas endocrinas como gónadas, corteza adrenal y placenta. Estas se clasifican a la vez en estrógenos y andrógenos, hormonas implicadas en la determinación, diferenciación y desarrollo sexual³³. El estradiol, la estrona y el estriol son los principales estrógenos naturales producidos por los mamíferos, mientras los principales andrógenos son la testosterona y el 5-alfa -dihidrotestosterona. Tanto los esteroides naturales como los sintéticos se emplean actualmente en la clínica cuando existen deficiencias endocrinas relacionadas con producción de estrógenos; en la anticoncepción, terapia de reemplazo hormonal y cánceres metastásicos como el cáncer de próstata⁴¹.

La regulación de la secreción de estrógenos está coordinada por el eje hipotálamo-hipófisis. En el hipotálamo se sintetiza el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), que estimula la liberación de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) en la adenohipófisis que estimula la síntesis de estrógenos. Se regulan mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa según sean las necesidades del organismo en condiciones fisiológicas normales.

Las hormonas esteroideas son productos derivados del metabolismo del colesterol. La biosíntesis de estrógenos a partir del colesterol se lleva a cabo siguiendo la ruta metabólica desde colesterol y teniendo como intermediario común a la pregnenolona que, después de algunas biotransformaciones, conduce a la producción de androstenediona o testosterona que

pueden aromatizarse a E2 o E1 respectivamente. La acción de una 16-alfa-hidroxilasa sobre estos productos podrá generar E3, que es el metabolito más abundante de E2 y la 16-alfa-hidroxiestrona ⁴².

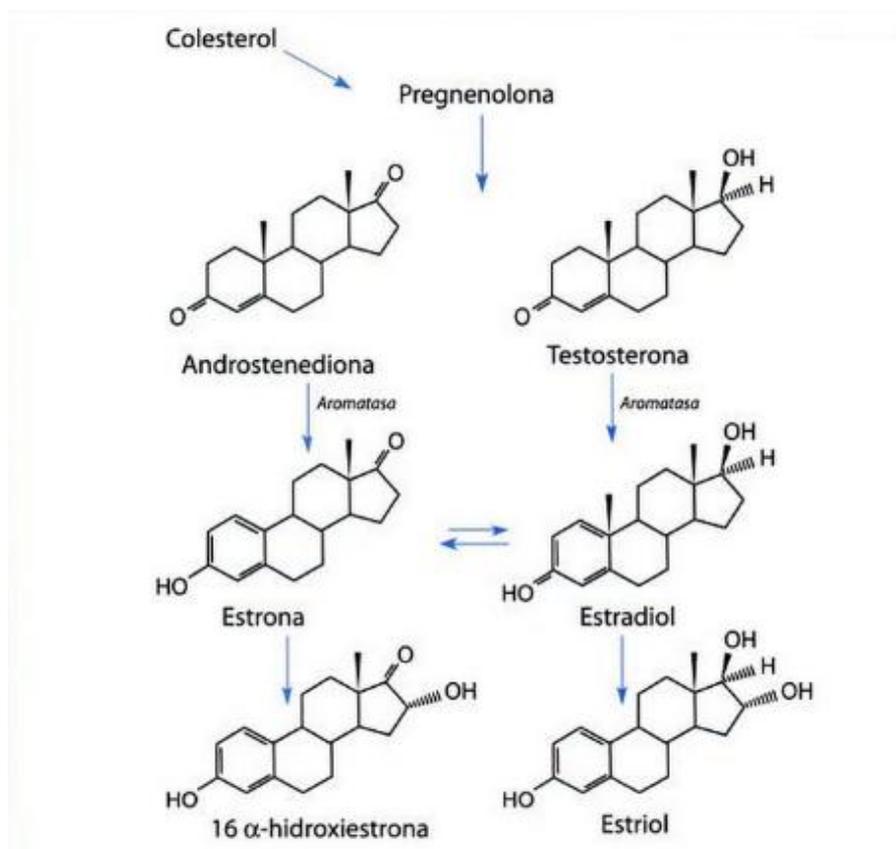


Figura 1. Biosíntesis de estrógenos. Tomado de: [/books.google.com.co/books?id.Estrógenos](https://books.google.com.co/books?id=Estrógenos).

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17 beta-estradiol, seguido por la E1 y el E3. Cada uno de estos metabolitos, es un esteroide de 18 carbonos, compuestos por un anillo A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo b-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural que le confiere a este tipo de moléculas la capacidad de unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos ⁴³.

Los estrógenos son sintetizados principalmente por el ovario y la placenta, sin embargo también son secretados en pequeñas proporciones por los testículos. Para dar inicio a la síntesis de E2 es necesaria la acción conjunta de las gonadotropinas (LH) y (FSH); esta

molécula es capaz de fijarse con gran afinidad a la globulina fijadora de 17B-estradiol presente en el plasma circulante, característica que difiere de la E1 y el E3 por fijarse débilmente a la proteína transportadora.

De esta manera E2 presenta un complejo metabolismo a nivel de tejidos periféricos y el hígado, en este último se oxida a E1, que posteriormente puede ser hidratado a E3^{43,44}. Estos tres estrógenos aparecen después en la orina como glucurónidos o sulfatos, la determinación cuantitativa de estos productos son de importancia clínica al estimar la velocidad de recambio de las hormonas esteroideas, siendo útiles en el diagnóstico de determinadas patologías⁴⁴.

Los estrógenos son hormonas implicadas en llevar a cabo el correcto funcionamiento de diversos tejidos y órganos del cuerpo. Actúan a nivel de sistema reproductor tanto femenino como masculino, al mismo tiempo que son capaces de generar efectos sobre el sistema oseo, nervioso y cardiovascular. El amplio espectro en el que las hormonas esteroideas se desarrollan a nivel de la fisiología humana y animal, puede desencadenar diversas patologías por una sobreproducción o inhibición en las concentraciones, ya que se requieren cantidades correspondientes con la demanda fisiológica natural.

Los estrógenos son considerados principalmente hormonas feminizantes, debido a la diversidad de efectos que ejercen sobre las funciones reproductivas de la hembra. Dichas hormonas se ven implicadas en la generación de cambios en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento mamario, la estimulación de la proliferación celular del epitelio vaginal, útero y trompas de falopio, la maduración de los ovarios y la continua producción de hormonas esteroides durante la fase luteal del embarazo. También son responsables de mantener el control de la conducta sexual femenina a nivel del sistema nervioso central. Así mismo mantienen el equilibrio hidroeléctrico y de la masa ósea, además de participar en la fisiología vascular como factores cardioprotectores⁴⁵.

En los machos inhiben la secreción de testosterona al ejercer feedback negativo sobre la hormona luteinizante en la glándula pituitaria, que estimula su producción, lo cual genera una disminución en la producción de Dihidrotestosterona (DHT). Además se relaciona con la conducta sexual y pautas conductuales como la erección y monta ya que se requieren de la presencia tanto de andrógenos como estrógenos a nivel de sistema nervioso central. Otros

efectos no menos importantes se dan en el desarrollo y la función testicular, reabsorción de fluidos a nivel del epidídimo y acciones directas e indirectas en el desarrollo y función de la glándula prostática ^{45,46}.

La E1 por su parte es un estrógeno ovárico débil. En las mujeres postmenopáusicas, es el estrógeno plasmático dominante y se forma en su mayoría por la conversión de androstenediona corticosuprarrenal en los tejidos periféricos, principalmente en el hígado y tejido adiposo. El E3 no es secretado por el ovario, se forma en pequeñas cantidades en el hígado a partir del E2 y la E1. Durante el embarazo se secretan en grandes cantidades cuando es producido por la placenta, lo cual permite ser empleado como parámetro para evaluar la función fetoplacentaria en el embarazo ⁴⁷.

- **Receptores estrogénicos.**

La mayor parte de los efectos de los estrógenos en sus órganos blanco se deben a la cadena de eventos celulares conocida como “señalización estrogénica”, la cual es una vía de transducción celular que inicia con la activación de los receptores estrogénicos (RE). Los RE son moléculas de naturaleza proteica capaces de desencadenar procesos que inician la síntesis de ARN por lo cual se catalogan como factores de transcripción clasificados dentro de la clase II de la superfamilia de receptores nucleares a hormonas esteroideas ⁴⁵.

En general, este tipo de receptores están conformados por seis dominios denotados de la A a la F, codificados por 8-9 exones (Fig. 2). Ambos tienen un dominio central de unión al DNA (DBD) muy conservado que mediante dos “dedos de zinc”, se une a secuencias específicas en el promotor o a los sitios “enhancer” de genes regulados por estrógenos. La región carboxilo-terminal del receptor constituye el dominio de unión a ligando (LBD) el cual reconoce a los estrógenos naturales como 17β -estradiol (E2) y a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del ER), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. Adicionalmente, el LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homodimerización y un dominio de transactivación denominado AF-2, el cual es dependiente de ligando. La interacción con E2

activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización, localización nuclear y una superficie sobre la región AF-2 que promueve su interacción con coactivadores transcripcionales. Entre el DBD y el LBD existe una región variable denominada bisagra la cual participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 que en ausencia de ligando inactivan los RE manteniendo una conformación que oculta sus péptidos de señal de localización nuclear ⁴⁵. La región amino-terminal es la más variable entre los miembros de la familia, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos, y contiene una región de transactivación denominada AF-1, la cual es ligando-independiente. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor. Por último, en la región N-terminal existen diversos sitios de fosforilación regulados por una variedad de proteínas cinasas ⁴⁸.

Existen dos subtipos de proteínas de estrógenos denominados RE alfa y RE beta respectivamente. Hasta en 1986 en que se secuenció el receptor estrogénico, se pensaba que era la única molécula capaz de mediar los efectos de los estrógenos en los tejidos blanco. Sin embargo, en 1996 se descubrió un segundo receptor capaz de ejercer el mismo efecto, denominándose RE Beta (RE- β) para diferenciarlo de su predecesor al que se le denominó RE- α .

A nivel estructural de RE- α como RE- β existe una gran homología entre los dominios de unión al ADN (región C) y el ligando (región E) correspondiéndose 96% y 58% respectivamente, las cuales difieren de las regiones D y F al no estar bien conservadas. Los genes de ambos receptores son codificados por 8 exones y se localizan en diferentes cromosomas. El RE- α en el brazo largo del cromosoma 6 y el RE- β en el brazo largo del cromosoma 14 confirmando que cada receptor es el producto de genes independientes. La expresión de estos genes determinada por los niveles de RNAm y por su afinidad de unión a ligandos, varía en cada tejido blanco, lo que sugiere que cada receptor tiene un papel biológico distinto ⁴⁹. ER α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata ⁵⁰.

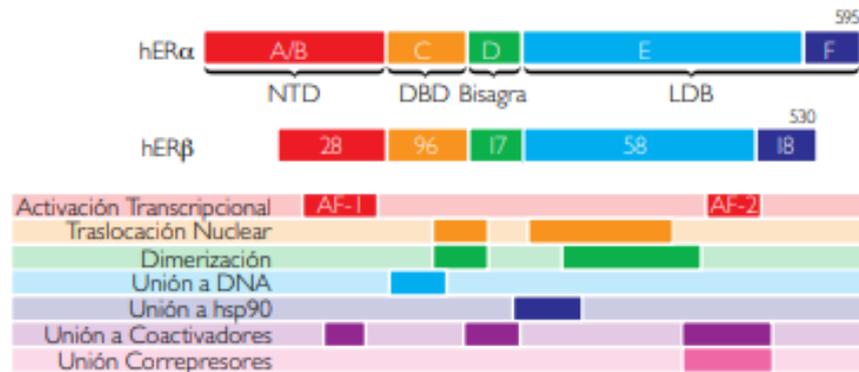


Figura 2. Estructura de los receptores de estrógenos alfa y beta. Tomado de: <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/2019/12/05/receptor-de-estrogenos/>

- **Efectos Genómicos.**

Los ERs se comportan de acuerdo a la teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas por la cual median los efectos biológicos de los estrógenos; implica su actuación como factores de transcripción dependientes del ligando. Dicho mecanismo comprende la unión del estrógeno específico, en este caso 17β-estradiol al receptor del núcleo, después el receptor sufre un cambio conformacional originando una homo o heterodimerización (dos RE-a o un RE-a se heterodimeriza con un ER-b) que permite la unión del complejo hormona-receptor a elementos de respuesta específicos (EREs) localizados en los promotores de los genes ⁵¹. Esta secuencia consiste en un palíndromo invertido de 15 pares de bases sobre el cual el complejo ER-estrógeno se sitúa y regula la maquinaria de transcripción, bien sea a través de una interacción directa o por medio de otros factores de transcripción ⁵².

En consecuencia el ER dimerizado se une a proteínas coactivadoras como SRC1 y CBP-P300 que forman el complejo de iniciación de la transcripción conformado por la unión de Receptor-ligando a co-activadores, represores y proteínas reguladoras de la transcripción, dando paso a la síntesis de ARN. Dependiendo del tejido donde ocurre la transcripción estimulada por ERs, actúan de manera específica dependiendo de la composición del complejo de iniciación de la transcripción ⁵¹.

El proceso de transcripción va a estar regulado por el complejo de preiniciación que incluye la interacción de factores transcripcionales basales con el complejo hormona receptor junto con la unión de proteínas co-reguladoras denominadas: proteínas de interacción con receptores o RIPS (Receptor Interacting Proteins), las cuales son capaces de activar (co-activadores) o represar (co-represores) la transcripción. La inducción de la síntesis de ARN con consiguiente producción de proteínas, es un proceso que precisa un tiempo de por lo menos 1-2 horas después de que el ligando se une a su respectivo receptor⁵¹.

- **Efectos no genómicos**

Además del mecanismo clásico de unión a los RNs (receptores nucleares) (efectos genómicos); los estrógenos han demostrado la capacidad de desarrollar respuestas rápidas actuando por medio de mecanismos alternativos a la transcripción génica (efectos no genómicos). Dichos efectos se producen en cuestión de minutos o segundos al no requerir los procesos de transcripción y síntesis de proteínas para poder producir su efecto primario ya que el complejo hormona- receptor que se encuentra relacionado con las respuestas no genómicas de esteroides, se encuentra situado en las membranas plasmáticas. De este modo los esteroides, actúan mediante los mecanismos clásicos de los receptores asociados a las mismas, a través de segundos mensajeros⁵².

Los efectos no genómicos de los estrógenos incluyen: flujo de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras, estimulación de la adenilato ciclasa y síntesis de AMPc, activación de quinasas MAP, activación de receptores tirosin-quinasa y activación de proteínas G, las cuales desencadenan respuestas biológicas específicas del tipo celular donde se encuentre⁵³.

Por otra parte existen acciones genómicas- no genómicas de los ERs en donde las respuestas no genómicas de los estrógenos van actuar en la regulación de factores de transcripción. El mecanismo por el cual es posible una respuesta tipo genómica se da por la regulación de factores de transcripción a través de fosforilaciones mediadas por quinasas(22), como es el caso de la inducción de AP-1 por el 17B-estradiol en donde se produce la activación de una

quinasa MAP por unión al estrógeno específico, que a su vez estimula la unión de AP1 al DNA induciendo la transcripción génica ⁵³.

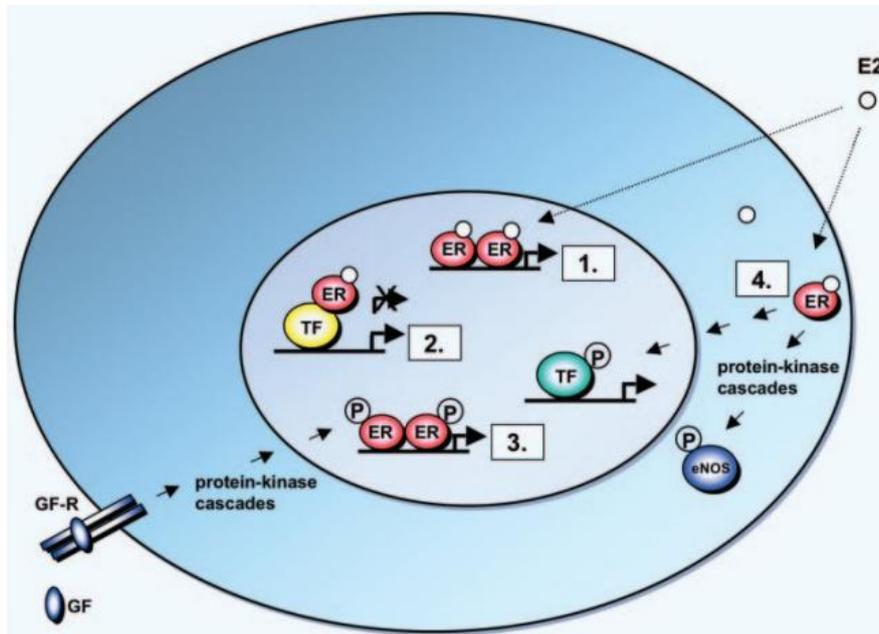


Figura 3. Ilustración esquemática de los mecanismos de señalización de los ER. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695368>

1. Los E2-ER nucleares se unen directamente a ERE en promotores de genes diana. 2. ERE- acciones genómicas independientes. Los complejos nucleares E2-ER están unidos mediante interacciones proteína-proteína a un complejo de factor de transcripción (TF) que contacta con el promotor del gen diana. 3. Acciones genómicas independientes del ligando. Los factores de crecimiento (GF) activan las cascadas de proteína quinasa, lo que conduce a la fosforilación (P) y la activación de ER nucleares en ERE. 4. Acciones no genómicas. Los complejos de membrana E2-ER activan las cascadas de proteína-quinasa, lo que conduce a funciones alteradas de las proteínas en el citoplasma, por ejemplo: activación de óxido nítrico sintetasa endotelial (Enos), o para la regulación de la expresión génica a través de la fosforilación (P) y la activación de un TF.”

4.2 XENOESTRÓGENOS ASOCIADOS A LOS PECES Y SUS EFECTOS DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR

En peces, los estrógenos son hormonas efectoras que regulan funciones clave en la diferenciación sexual, en el metabolismo de los ácidos grasos y en la síntesis de vitelogenina en el hígado. Los peces han sido uno de las principales especies acuáticas estudiadas para la determinación de EDs como consecuencia de la continua contaminación de cuerpos de agua superficiales. Gran cantidad de investigaciones se han centrado en los efectos directos de los disruptores endocrinos a nivel del sistema reproductor de peces, ya que son los principales órganos blanco donde actúan, provocando la inadecuada regularización y homeostasis fisiológica de las hormonas implicadas en el proceso reproductivo.

- **Fisiología reproductiva del pez hembra: Eje hipotálamo hipófisis gonadal**

En peces al igual que en humanos, la reproducción está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal; las hormonas gonadales controlan procesos reproductivos como desove, espermatogénesis y ovogénesis. El ciclo reproductivo se sucede por la acción del hipotálamo tras la síntesis y liberación de la GnRHs que tiene como fin estimular la liberación de hormonas gonadotropinas (GtH) en la hipófisis, facilitando la reproducción en peces mediante un sistema dual (GTH): FSH y LH.⁵⁴

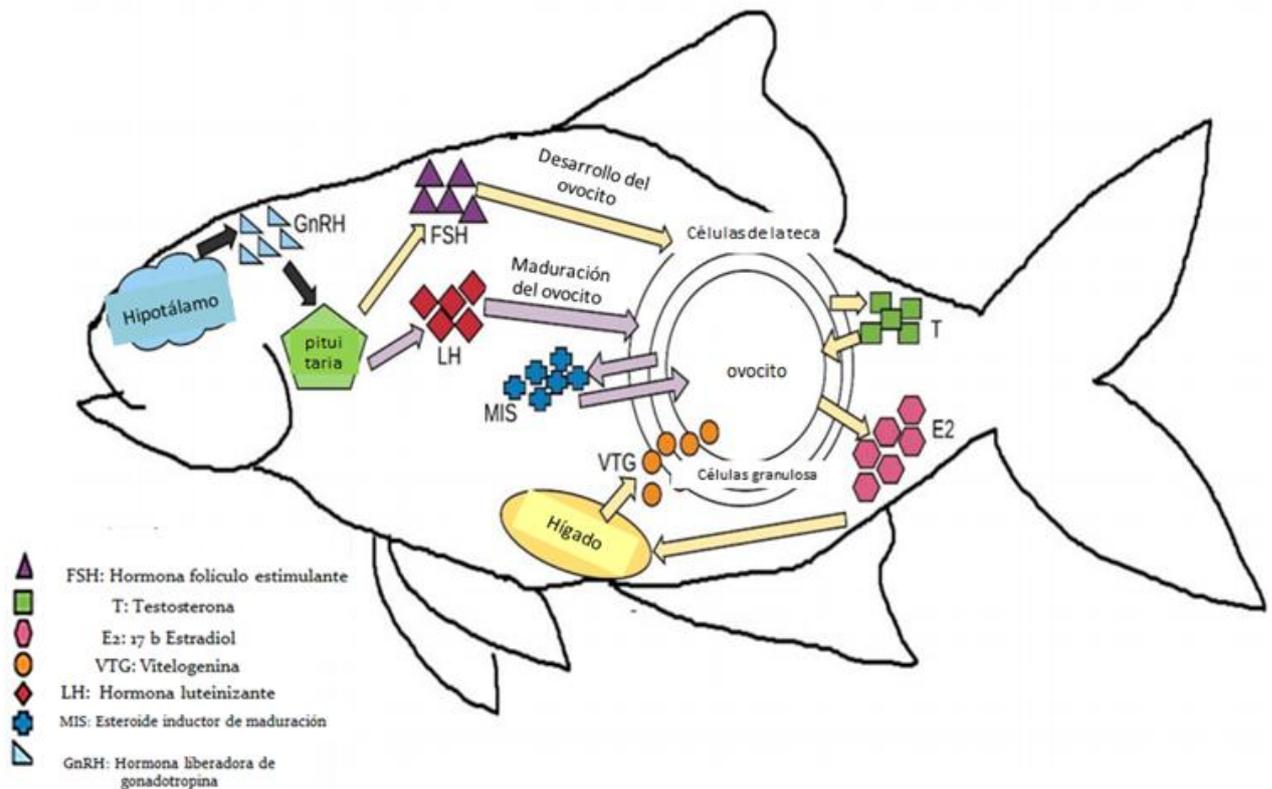


Figura 4. Proceso de estimulación hormonal en peces eje hipotálamo-hipófisis gonadal Tomado de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-Characterization-of-the-Mummichog-Ovarian-Kan>

Las hormonas gonadales se liberan al torrente sanguíneo con posterior unión a los respectivos receptores sanguíneos ováricos de la superficie celular FSHr y LHR. La activación de LHR estimula las funciones gonadales incluida la síntesis y liberación de hormonas esteroideas implicadas en la reproducción. La FSH se encuentra implicada principalmente en la regulación de la esteroidogénesis gonadal en el ovario en las etapas de desarrollo temprano, especialmente durante la vitelogénesis. La vitelogenina (Vtg) como las proteínas de zona radiada (Zrp) son los principales componentes del huevo, estas se sintetizan en el hígado de hembras bajo regulación endocrina y son transportados por vía circulatoria para la toma posterior por el oocito. La Vtg es una fosfolípido-glicoproteína sérica precursora de la formación de la yema del huevo. Su síntesis se da como consecuencia de la estimulación de los receptores estrogénicos hepáticos por acción de la hormona 17- α -estradiol (E2). Tanto los peces hembra y machos poseen receptores estrogénicos en el hígado; sin embargo solo las hembras se encuentran expuestas normalmente a los estrógenos⁵⁵; por lo tanto la Vtg es una proteína específica de peces hembra.

Por otra parte la función principal de la LH es regular las etapas finales del desarrollo ovárico y el desove, como consecuencia de su capacidad de estimulación de $17\alpha, 20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha, 20\beta$ -P), o esteroide inductor de maduración (MIS), producidas a partir de la capa de células granulosas del folículo ovárico. El $17\alpha, 20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha, 20\beta$ -P) es el esteroide más efectivo en la inducción de la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) que ocurre cuando un folículo ya ha completado su maduración. MIS actúa a nivel de la membrana del oocito induciendo su maduración final⁵⁶.

- **Receptores estrogénicos**

Los receptores de estrógenos nucleares son los principales mediadores de la actividad de E2, sin embargo, la esteroidogénesis puede ser activada tanto por receptores nucleares como de membrana. En peces se han identificado dos tipos de receptores implicados: ER α y ER β .

4.2.1 ESTEROIDOGÉNESIS EN PECES.

La esteroidogénesis es el proceso mediante el cual se producen las hormonas esteroideas a partir del colesterol, el cual está mediado por diversos intermediarios y conversiones enzimáticas anteriores a su liberación en las gónadas. La síntesis de los diferentes tipos de esteroides es dependiente de la cantidad de colesterol y su suministro para servir como sustrato de 3 enzimas pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450 quienes efectúan su conversión. En principio el proceso se inicia con el transporte del colesterol a las mitocondrias mediante la proteína reguladora esteroidogénica (StAR) la cual es una proteína transportadora de esteroides. La ruptura de la cadena lateral del citocromo P450 se presenta en la membrana mitocondrial interna y convierte el colesterol en pregnenolona. Al ser un esteroide basal, la pregnenolona actúa como sustrato para el citocromo P450 C17 el cual cataliza su hidroxilación a 17α -hidroxiprogesterona (17α -HP) y luego a androstenediona la cual se convierte en testosterona por la acción de la enzima 17β -HSD (HSD: hidroxisteroide deshidrogenasa), con posterior conversión a 11-cetotestosterona (11-KT) en los hombres. La síntesis de estrógenos es dependiente de la aromatasa P450 (P450arom), que se vale de la T

como sustrato para producir E2. Durante la maduración de los ovocitos, los folículos post-vitelogénicos tienen que sintetizar una gran cantidad de MIS. MIS se produce a partir de la conversión de 17 α -hidroxiprogesterona a 17 α , 20 β -P, con la enzima 20 β -HSD, que se cree que se inicia con un aumento en la producción de LH ⁵⁷.

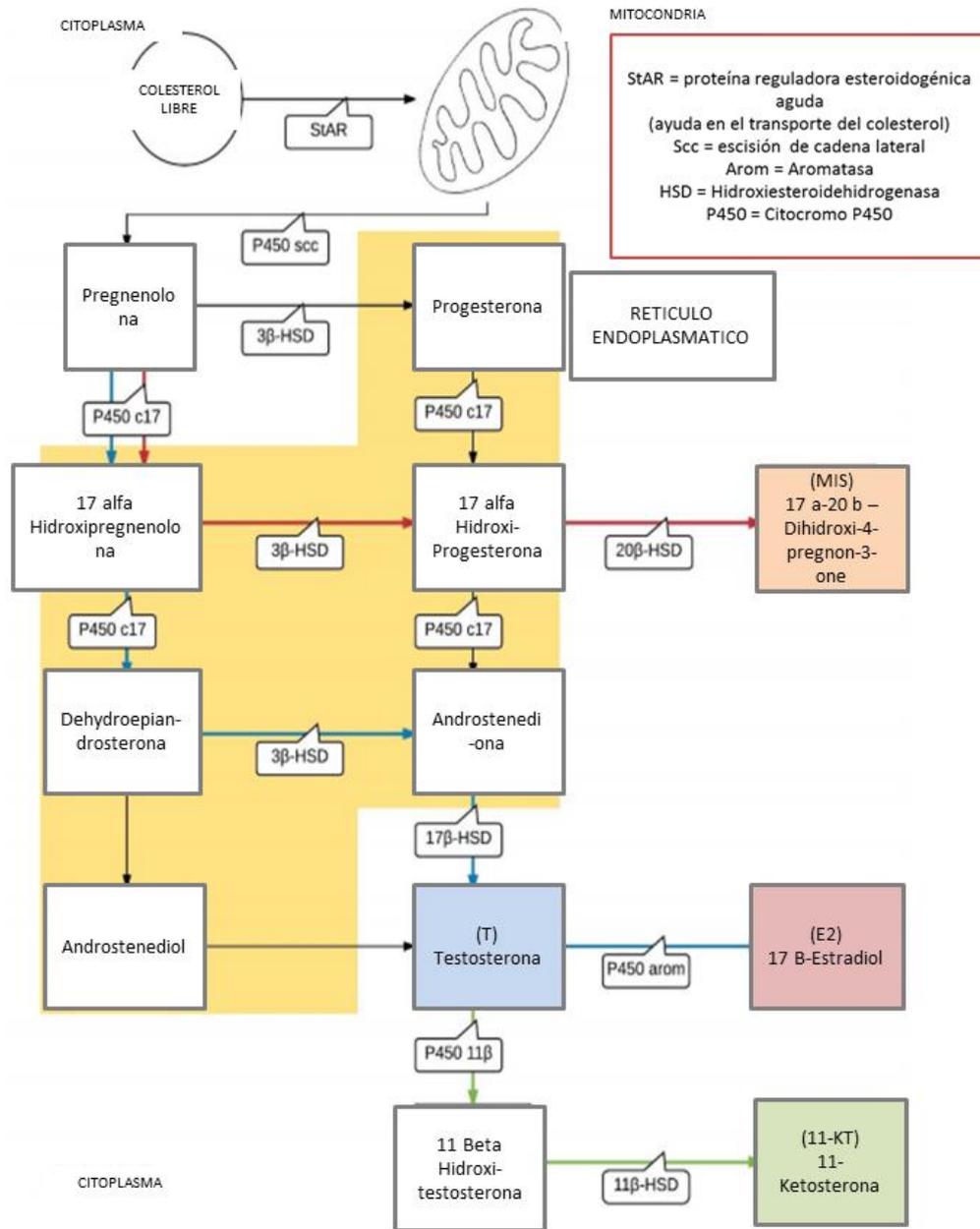


Figura 5. Esteroidogénesis. Tomado de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-Characterization-of-the-Mummichog-Ovarian-Kan>

- **Ovogénesis**

La ovogénesis se define como el proceso de formación de las células sexuales femeninas; que implica la conversión de las células germinales primordiales (PGC) en óvulos maduros listos para ser fertilizados. El ciclo del desarrollo ovárico se basa en 6 principales pasos: 1. formación de PGC (línea de segregación germinal) , 2.transformación de PGC en oogonia (diferenciación sexual), 3. transformación de oogonia en ovocitos (inicio de meiosis), 4. crecimiento de ovocitos mientras se encuentra en cese meiótico, 5. reanudación de la meiosis (maduración) y 6. expulsión del óvulo de su folículo (ovulación).

El epitelio germinativo es el principal componente de los ovarios de las hembras sexualmente inmaduras, las células germinales primordiales que integran dicho tejido se diferencian en oogonias durante la época de diferenciación sexual ⁵⁹. Una vez alcanzada la madurez sexual se da lugar la ovogénesis la cual parte con una etapa de proliferación oogonial en el que las oogonias presentes en el ovario sufre dos divisiones mitóticas y una meiótica que cesa al llegar a la profase, transformándose en oocitos primario ⁶⁰.

En la primera de las dos detenciones meioticas durante la ovogénesis en la profase, se da inicio a una primera etapa de crecimiento denominada pre vitelogénesis, tiempo en el cual el diámetro del folículo ovárico aumenta en más de un orden de magnitud y se da un incremento de la síntesis de ARN producidos por nucléolos ubicados en la periferia de la vesícula germinal o núcleo de los oocitos ²⁸. En esta etapa los ovocitos se caracterizan por tener un gran núcleo rodeado por numerosos nucleolos, además de un citoplasma que integra un corpúsculo de balbini formado por varios organelos que le permitirán servir de centro metabólico y de formación de organelos dentro del ovocito ³⁰. El folículo ovárico, que rodea a cada ovocito, consta de dos capas celulares principales: una capa celular tejal externa y una capa celular de granulosa interna. A medida que crecen los ovocitos, las células foliculares se multiplican y forman una capa folicular continua (capa de células de la granulosa); la capa folicular cambia para apoyar, nutrir y regular el desarrollo de los ovocitos de manera continua ⁵⁷.

La siguiente fase es la vitelogénesis que comprende la incorporación de vitelo a su citoplasma, material formado por: proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos que sirven como fuente de energía durante el desarrollo embrionario ⁶⁰.

- **Vitelogénesis.**

La inducción natural de vitelogenina se da por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal con la producción de gonadotropinas que inducen la síntesis de estradiol-17 β (E2) con posterior liberación al torrente sanguíneo y estimulación de la vitelogénesis hepática por activación de receptores de estrógenos específicos. Una vez producida, vía hematógena atraviesa el folículo ovárico y se adhiere a receptores de vitelogenina ubicados en la superficie del ovocito siendo incorporada al citoplasma por macropinocitosis ³⁰. Cuando se incorpora sufre proteólisis dando lugar a dos principales proteínas de la yema del huevo, lipovitelina Lv y fosfovítina Pv. El producto Vg más grande es Lv es un nutriente con importante fuente de aminoácidos y lípidos que apoyan el desarrollo embrionario. La fosvitina Pv entrega los minerales necesarios al desarrollar embriones para el desarrollo esquelético y metabólico ⁵⁸.

Los oocitos post-vitelogénesis han crecido y desarrollado bajo la acción de la FSH y E2, sin embargo son fisiológicamente inmaduros por lo que no pueden ser fertilizados. El proceso de maduración se da como consecuencia de la disminución de la producción de E2 en las células teca y un significativo incremento de producción de MIS, proceso estimulado por la acción de la LH en las células de la granulosa necesario para conseguir la completa maduración de los ovocitos y su posterior liberación para ser fertilizados ⁶¹.

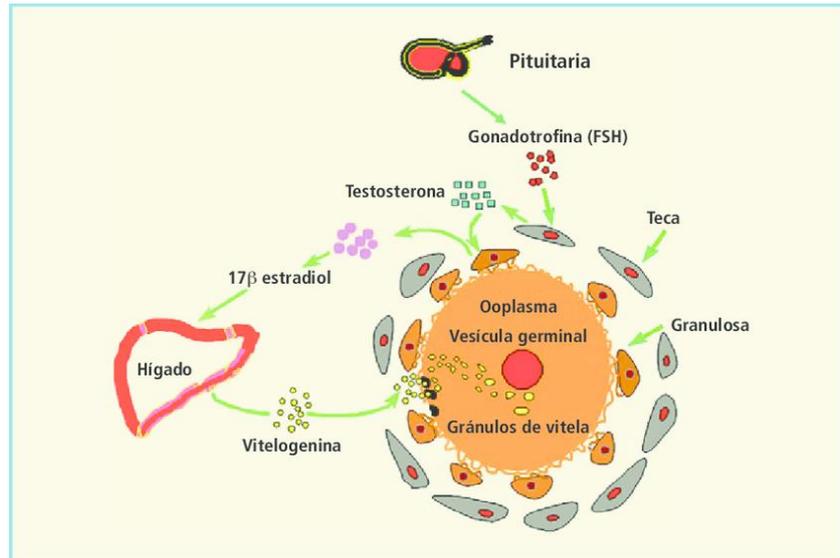


Figura 6. Regulación hormonal de la maduración de oocitos en peces. Tomado de: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-12-Control-hormonal-de-la-vitelogenesis>.

4.2.2 EFECTOS GENÓMICOS DE LOS EDs SOBRE LA SALUD REPRODUCTIVA DE PECES.

En general, tanto vertebrados mamíferos como no mamíferos poseen una fisiología reproductiva similar en estructura y función; al igual que las vías de biosíntesis de hormonas se conservan en las dos especies. Sin embargo, algunos aspectos de la fisiología reproductiva que poseen los peces permite que estos respondan de una manera diferente a los EDs, ya que un cambio en la estimulación y secreción de hormonas sexuales se ve influenciado por señales en respuesta al ambiente.

De igual manera, la expresión de genes, durante la etapa de diferenciación sexual está regulada por factores epigenéticos dependientes de la dotación cromosómica de cada especie. Los peces poseen un número reducido de cromosomas generalmente homomorficos y se han determinado genes maestros asociados con el desarrollo sexual, como es el caso del gen *dmy* equivalente al gen *sry* reportado para mamíferos, sin embargo la expresión de estos genes se ve modificada por cambios de temperatura y factores ambientales, repercutiendo en la diferenciación gonadal y de estructuras sexuales secundarias en etapas de desarrollo.

Los estudios en peces enfocados principalmente en aquellos que se encuentran expuestos a ambientes no favorables debido a la gran contaminación de aguas superficiales, han demostrado la relación que existe entre las características fenotípicas de los peces y la exposición a EDs. Los desórdenes frecuentemente hallados son: inhibición en el desarrollo y maduración de los oocitos, incremento en atresia folicular, depósito anormal y formación de yema en los oocitos, alta mortalidad, machos con ovotestis, intersexos, disminución en el crecimiento del testículo, reducción del índice gonadosomal y esterilidad, histología gonadal alterada, maduración y producción anormal de huevos, desfeminización de hembras, feminización de machos, hipertrofia de las células de sertoli y disminución en el número de células espermáticas en etapas tempranas y aumento en la cantidad de células intersticiales en los conductos eferentes, entre otras ¹⁷.

Dichos desórdenes se relacionan principalmente con la capacidad de los EDs para inducir o inhibir la expresión de genes que regulan el ciclo sexual en peces. Uno de los más importantes y el que se encuentra implicado como causante de la mayoría de las alteraciones fenotípicas al encontrarse con mayor frecuencia, es la inducción de la expresión del gen de los estrógenos naturales, activando receptores estrogénicos nucleares a nivel del hígado con posterior inducción de la síntesis de vitelogenina, provocando un aumento anormal de las concentraciones en plasma (la vtg se incrementa hasta un millón de veces en plasma) en peces de ambos sexos; sin embargo se considera marcador biológico de exposición de peces a EDs por generarse en peces macho, ya que en condiciones fisiológicas normales no es producido en concentraciones detectables⁶².

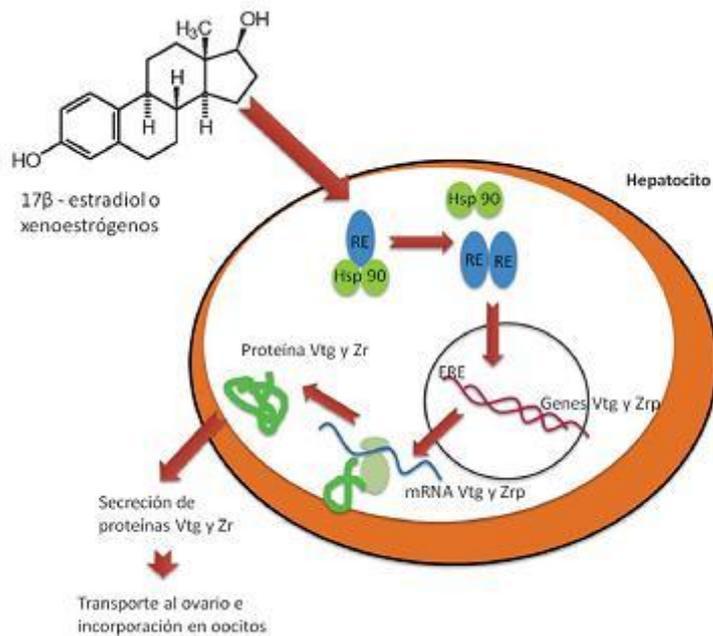


Figura 7. Biosíntesis de proteínas ovogénicas estimuladas por compuestos estrogénicos. Tomado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid

Por otra parte, los Xenoestrógenos se relacionan con la capacidad de inducción e inhibición de la transcripción de genes implicados en el inicio de la esteroidogénesis produciéndose una variación en la regulación transcripcional dependiente del tiempo y la concentración, de las expresiones de los genes StAR y P450scc. Como consecuencia en una interrupción de la proteína StAR y la expresión de P450scc se explican los eventos relacionados con la producción de toxicidad inducida por xenoestrógenos y alteraciones transmisibles a nivel de todo el organismo incluyendo la disminución de fertilidad en peces ¹⁹.

Así mismo, los EDs pueden actuar como inhibidores de la transcripción de genes implicados en el desarrollo de la síntesis final de estrógenos. Un estudio llevado a cabo en Alemania con peces Besugo del río Elba, demostró una correlación entre la disminución de la actividad Aromatasa con la disminución en la producción de E2 y 11-Ketosterona implicadas en el desarrollo de caracteres sexuales en peces ¹⁸.

Por último la exposición continua a EDs, a nivel de activación de receptores estrogénicos nucleares puede generar cambios en la expresión del gen P53 (proteína supresora de tumores) esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo

celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer. Estudios en el pez hermafrodita *Kryptolebias marmoratus* sugiere que el gen Km-p53 estaría involucrado en el mecanismo de defensa celular en la etapa temprana de exposición a EDs y la exposición a largo plazo puede suprimir su expresión lo que explica la generación de cánceres a nivel sistémico incluyendo órganos reproductivos ⁶³.

4.3 PRESENCIA DE SUSTANCIAS DISRUPTORAS ENDOCRINAS EN EL AMBIENTE.

La presencia de estrógenos en el ambiente es de origen natural y antropogénico. Como fuente natural se conoce hormonas sintetizadas y excretadas a diario por el cuerpo humano como el E1, E2 y el E3; los cuales varían en sus concentraciones dependiendo de quien provenga. En hombres se estima una excreción diaria de (1.6, 3.9, 1.5 μg), mientras que en mujeres se aumenta (3.5, 8, 4.8 μg), siendo la etapa de embarazo el periodo donde la excreción de estriol puede llegar hasta 6000 μg ⁶⁴.

Como fuente antropogénica se le ha atribuido la presencia de estrógenos en el ambiente relacionada con la masa total manufacturada, prescrita o adquirida para terapias hormonales tanto para humanos como para animales; sin embargo, hoy por hoy se sabe que no es la única fuente antropogénica de la cual proviene ya que se conocen una variedad de productos industriales de uso doméstico que a diario entran en contacto con los seres humanos y que actúan como EDs gracias a la naturaleza química que poseen. Entre ellas se encuentran sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalógenas como algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), sustancias químicas industriales, productos sintéticos y metales pesados entre otros ⁶⁵.

Los EDs representan un gran riesgo ambiental por su alto potencial de persistir en los ecosistemas y la gran capacidad de bioacumulación y toxicidad en los seres vivos. Dichas sustancias se han encontrado tanto en aguas tratadas como superficiales cuyas principales

fuentes son las aguas residuales municipales que una vez incorporadas ejercen una actividad estrogénica en los cuerpos receptores ⁶⁵.

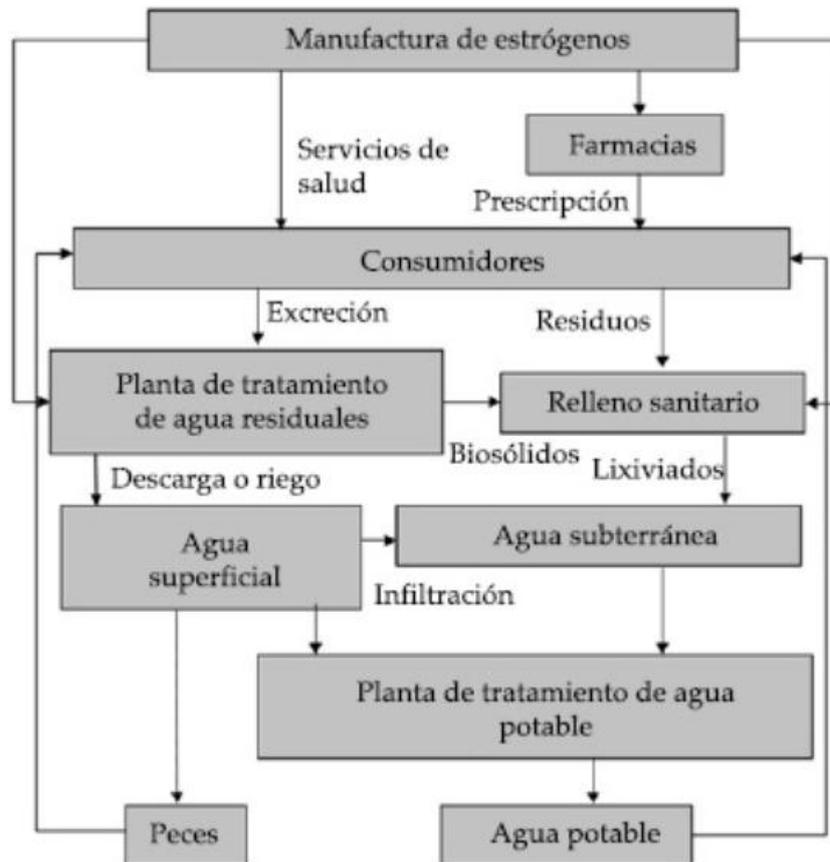


Figura 8. Medios de exposición a los estrógenos. Tomado de : http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007-242220150005000032

El agua ha sido el mayor blanco de contaminación y lugar de acopio del cual se valen los EDs para incorporarse y persistir en el ambiente siendo las especies acuáticas las mayores afectadas y con principales repercusiones reportadas a nivel sistémico.

4.3.1 Principales compuestos químicos con actividad estrogénica en el medio acuático.

Disruptores endocrinos comunes en el medio acuático		
Compuestos	Usos y vías de exposición	Características
DDT y sus metabolitos. o,p-DDT pp-DDT o,p-DDD P,P-DDE	Pesticida: DDT fue prohibido en 1972, pero este producto, así como sus metabolitos, aparece aun hoy en día en el ambiente.	Denominados compuestos químicos organoclorados quienes integran el mayor grupo de contaminantes emergentes presentes en comida marina. Se relacionan con la interferencia en la homeostasis de la hormona tiroidea, así como desórdenes en sistema reproductor masculino y femenino actuando como sustancias estrogénicas o antiandrogénicas ⁶⁶ .
PCB	Transformadores eléctricos prohibidos en 1970	
Dioxinas y furanos PCDD PCDF	Metabolitos productos de la combustión de compuestos clorados	
Dieldrin	Pesticida prohibido en Estados Unidos en 1974	
Clordecona	Pesticida prohibido en Estados Unidos en 1977	
Endosulfan y compuestos relacionados Alfa-sulfan Beta-sulfan Endosulfan/éter Endosulfan-diol Toxafeno Metoxicloro	Pesticidas actualmente en uso	
Alquilfenoles	Surfactantes industriales presentes en detergentes; componentes de plástico con propiedades antioxidantes y/o maliables	
Ftalatos	Plastificantes de PVC	Son solubles en grasas, se acumulan en tejido adiposo ⁶⁷ .
Bisfenol A	Precusores de resina epoxi; subproductos de plástico tras digestión microbiana	
Esteroides estrogénicos Biológicos 17 b- estradiol		

<p>Estrona Estriol</p> <p>Antropogénicos</p> <p>17-α-etinil-estradiol</p>	<p>Ingrediente activo de la pildora anticonceptiva, uso en terapias de reemplazamiento estrogénico y tratamiento de cáncer de pecho</p>	<p>Se excreta por heces y orina en forma de metabolitos conjugados como glucoronidos o sulfatos, los cuales pueden sufrir desconjugación durante los procesos de tratamiento de aguas residuales y confluir en los cuerpos de agua en forma activa⁶⁸. La potencia disruptora endocrina del 17-α-etinil-estradiol es 10 a 50 veces más elevada que la de otros estrógenos naturales dado que posee una larga vida media de 92 días y una alta tendencia a bioconcentrarse⁶⁹.</p>
<p>Metales pesados : Mercurio orgánico Metilmercurio Etilmercurio fenilmercurio</p>	<p>Producto de la minería y desechos industriales</p>	<p>El metilmercurio es el principal compuesto relacionado con la contaminación de agua y acumulación en organismos aumentando su concentración en las cadenas alimentarias, especialmente en la cadena alimentaria acuática en peces y mamíferos marinos siendo ingeridos por los humanos a través de los productos del mar. Tiene efectos neurotóxicos, facilidad para traspasar la barrera hematoencefálica y transplacentaria^{70,71,72}.</p>

DDD:diclorodifenildicloroetano. DDE: diclorodietimildicloroetano. DDT: clofenotano; PCB: bifenilos policlorados;PVC:cloruro de polivenilo.PCDD:policlorodibenzodioxinas; PCDF:policlorodibenzofuranos.

Tabla 1. Disruptores endocrinos comunes en el medio acuático. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983271>

La contaminación de lagos, ríos, vías navegables y mares por compuestos organoclorados, PCBs, y sustancias químicas relacionadas se da por la disolución de estas sustancias presentes en la atmósfera a partir de la quema de residuos, en suelos, rellenos sanitarios por lluvia, y por incontroladas descargas de efluentes industriales y cloacales contaminados. A pesar de la poca solubilidad de este tipo de compuestos especialmente en agua de mar, su carácter lipofílico permite a los peces e invertebrados absorber, retener y concentrarlos principalmente en tejidos grasos ⁶⁶.

Los químicos son adsorbidos en partículas y sedimentos submarinos, esto se traduce en una fuente disponible para la ingesta de animales, adicionalmente la perturbación de los sedimentos, especialmente de compuestos químicos organoclorados, pueden liberar más contaminantes. Su distribución en los ambientes acuáticos y absorción por las especies acuáticas es dinámica, compleja y está sujeto a variaciones estacionales y condiciones locales ⁶⁶.

4.4 SITUACIÓN DE PESCA EN COLOMBIA

Colombia es un país rico en peces, al contar con una gran variedad de ecosistemas acuáticos marinos y dulces permite desarrollar innumerables cantidades de vida. Hace tres décadas se clasificó a Colombia como el cuarto país con mayor riqueza hídrica, al contar con el 44% del territorio nacional marino (919.376 Km²), distribuido en el mar Caribe y en el Océano Pacífico: más 309 zonas hidrográficas; 1800 lagunas y embalses; 5.300.000 hectáreas de sabanas y selvas inundables (Orinoquia y Amazonia) y 5.600.000 hectáreas de ciénagas principalmente en los departamentos de Bolívar y Magdalena ⁷³.

A pesar de contar con áreas pesqueras muy amplias: Océano Pacífico, Mar Caribe y áreas continentales, los volúmenes de captura se han reducido en las tres presentando una tendencia decreciente que se ha venido acelerando en los últimos años. Existen causas directas que explican este fenómeno como: la colmatación y disminución de la profundidad de los lechos de los ríos ocasionada principalmente por la deforestación en sus nacimientos y a lo largo de sus riberas, lo cual impide la adecuada migración de los peces; la desecación de muchos de los cuerpos de agua que conforman las cuencas disminuye así las áreas de larvicultura, la contaminación con metales pesados procedentes de explotaciones mineras, las aguas servidas

de los asentamientos humanos ribereños y la pesca de forma inadecuada por realización de capturas en épocas de reproducción, irrespeto de las tallas mínimas de captura establecidas y el uso de artes de pesca no selectivos, han producido que el país descienda al puesto número 28 en poseer la mayor riqueza hídrica con la correspondiente reducción de sus productos pesqueros ⁷⁴.

El Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia, ha definido que existen cerca de 2000 especies de peces marinos y 1435 de agua dulce habitando el territorio, lo cual equivale a que más del 25% de los peces del mundo se encuentran en Colombia; constituyen importantes recursos pesqueros, fuentes de alimentos e ingresos económicos para miles de pescadores.

La pesca continental está representada principalmente por la actividad en la cuenca del río Magdalena el cual posee una longitud de 1,540 km y un área de 199,294 Km² equivalentes al 17% del territorio colombiano y alberga aproximadamente la mitad de la población del País. La cuenca cuenta con una alta riqueza íctica y se reportan un total de 146 especies, entre las cuales se reconocen 40 de interés para la pesca ⁷⁴.

La cuenca del río Magdalena registró una captura anual promedio de 47 000 toneladas en la década de los 80 del siglo pasado, alcanzando un máximo de captura de 60.180 toneladas en 1987, mientras que en 2010 solamente se registraron 8.753 toneladas y en 2011, 15.262 toneladas, según los estimativos de Instituto Colombiano de desarrollo rural (Incoder) y de Corporación Colombia Internacional (CCI) ⁷³.

De acuerdo con los registros multianuales, la cuenca presenta un ciclo hidrológico con cuatro períodos, que se denominan según los movimientos de los peces migradores (reofilicos o potamodromos) asociados a éstos, como subienda (diciembre a marzo), bajanza (abril a junio), mitaca (julio a agosto) y bajanza de mitaca (septiembre a noviembre) los cuales varían anualmente; estos períodos determinan en buena proporción las dinámicas biológicas y pesqueras de la cuenca ⁷⁴.

Estratégicamente la cuenca del Magdalena está dividida en tres grandes regiones que son: alto, medio y bajo Magdalena. El alto Magdalena tiene sus orígenes en el departamento del

Huila y se extiende hasta el municipio de Honda, con una superficie estimada de 300 Km²; el Magdalena Medio abarca todo el sur del Cesar con un área aproximada de 551 km² y finalmente el Bajo Magdalena es la ampliación de los valles inundables hasta la desembocadura del río Magdalena.

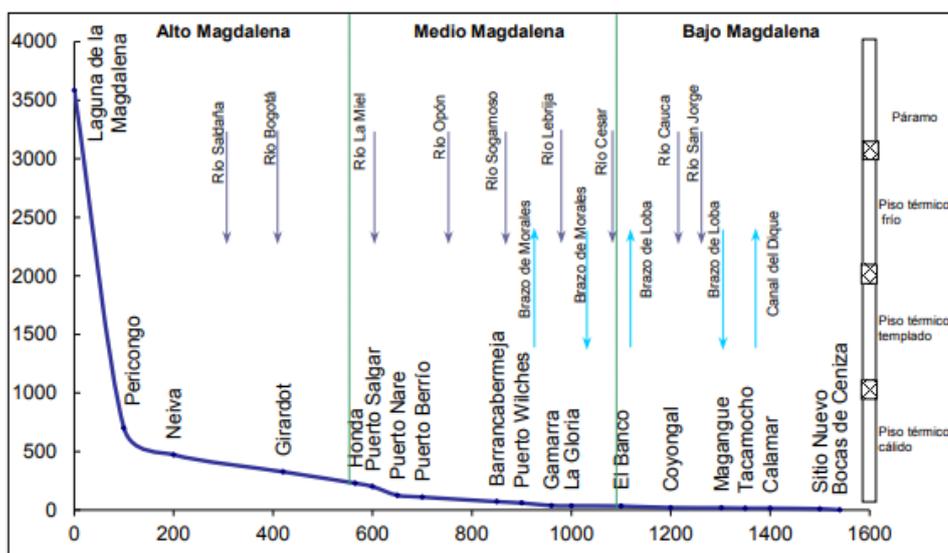


Figura 9. Perfil del Río Magdalena. Tomado de: http://sepec.aunap.gov.co/archivos/aunap/produccion_pesquera-cuenca_del_rio_magdalena.

El Bocachico, *Prochilodus magdalenae*, es la especie más abundante y representa el 53% de la producción histórica de la cuenca. Junto con el Bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*), son los recursos emblemáticos de la cuenca del Magdalena ⁷⁴.

4.4.1 Contaminación río Magdalena.

La contaminación del río Magdalena procede principalmente de tres tipos de agua residuales: urbanas, industriales y agrícolas, las cuales contribuyen en el aumento de sustancias perjudiciales para la biomasa presente y la vida de los seres humanos que se abastecen de agua y peces de las diferentes cuencas del río Magdalena para suplir sus necesidades. Este tipo de contaminación se conoce como fuente de riesgo inducida por la actividad humana la cual posee potencial para causar daños, dada las características ambientales y la gran masa contaminante, el riesgo y la peligrosidad de estas sustancias aumentan en la medida que el

ambiente disminuye su capacidad para asimilar, procesar, dispersar, diluir o filtrar los residuos o efluentes que se incorporen al medio físico ⁷⁵.

Las aguas residuales urbanas ejercen gran presión sobre el ambiente. Los residuos líquidos domésticos, son las aguas de abastecimiento que después de ser utilizadas en las actividades domésticas (consumo humano, cocimiento de alimentos, aseo personal y local, lavado, etc.) se descargan como aguas servidas, aguas grises o de lavado al alcantarillado o directamente al ambiente, representando una fuente importante de materia orgánica, detergentes, sólidos, nutrientes inorgánicos, microorganismos de origen fecal y que aumentan la demanda biológica de oxígeno (DBO) en las mismas, debido a las inadecuadas prácticas de uso, el escaso ahorro de agua y los volúmenes de efluentes; debido al escaso, inadecuado o nulo tratamiento que reciben antes del vertimiento final impactan al ecosistema, flora y fauna asociada. El río Magdalena es susceptible de este tipo de contaminación ya que cuenta con la propiedad de ser desembocadura de diferentes ríos del país a lo largo de su cauce; siendo el río Bogotá una de las principales fuentes de contaminación urbana ⁷⁵.

La diversidad de propiedades que poseen las aguas residuales industriales se deben a los diferentes procesos de los cuales proceden, y en función de ellos puede tener una composición relativamente constante o puede estar sujeta a variaciones cuantitativas y/o cualitativas considerables, según los horarios de funcionamiento de las industrias, la demanda del mercado o la posible influencia estacional en la producción. Este tipo de agua contribuye con el aporte de efluentes puntuales como productos minerales no metálicos, productos químicos, petróleo y sus derivados, metales pesados como consecuencia de la minería ilegal siendo el mercurio el mayor contaminante encontrado en especies acuáticas ⁷⁶.

Por otra parte las aguas residuales agrícolas están constituidas por una mezcla de aguas domésticas de la población, acompañadas por las aguas de riego y las del manejo de ganado y cultivos. En búsqueda por mejorar la productividad agrícola se ha llegado a implementar nuevas sustancias que por una parte aportan beneficios, por la otra parte causan un daño de forma indirecta, ya que los fertilizantes poseen unos agregados como los nitritos, fosfatos y compuestos de amonio que resultan contaminando ríos, lagos y mares, alterando el equilibrio de las especies acuáticas; al igual que los plaguicidas ejercen efectos tóxicos sobre la población expuesta.

Por otra parte se evidencia que estas aguas residuales recogen los residuos del ganado que están muy cargados de materia fecal afectando los afluentes de donde se hace la captación de agua para su distribución a los hogares ⁷⁵.

Departamento	Fuentes, actividades humanas y tributarios	Residuos y contaminantes de importancia
Magdalena	Cuatro asentamientos humanos costeros (Santa Marta, ciénaga, Sitio Nuevo, Pueblo Viejo), actividad marítima y portuaria, transporte de carbón, transporte y manejo de hidrocarburos, agricultura (banano), actividad turística y hotelera, emisario submarino, relleno sanitario, ríos Manzanares, Gaira, Córdoba, Toribio, Buritaca, Don Diego, Guachaca, Piedras y Mendihuaca, además del sistema lagunar de la Ciénaga Grande de Santa Marta.	Materia orgánica, residuos sólidos, aguas residuales municipales, residuos de carbón, hidrocarburos, aceites lubricantes, microorganismos, sólidos en suspensión y disueltos agroquímicos.
Atlántico	Cinco asentamientos humanos costeros (Barranquilla, Puerto Colombia, Juan de Acosta, Pijó, Tubará), plantas de tratamiento de ARD, puerto fluvial, y marítimo, alcantarillado, relleno sanitario, aguas residuales domésticas, zona industrial vía 40 (metalúrgicas, químicas, farmacéuticos, cementeras, curtiembres, agroquímicos, procesadoras de alimentos y bebidas, textiles, etc), zona Franca, El río Magdalena recoge más del 70% de los desechos del país, con un alto arrastre de sedimentos y sustancias contaminantes. Las ciénagas de Mallorquín, Balboa y del Totumo son los principales cuerpos de agua de la zona costera del departamento.	Materia orgánica, residuos sólidos, nutrientes, desechos industriales, hidrocarburos, microorganismos, aceites lubricantes, sólidos en suspensión y disueltos agroquímicos.
Bolívar	Dos asentamientos humanos costeros (Cartagena y Santa Catalina), plantas de tratamiento de ARD, emisarios de emergencia, relleno sanitario, sector industrial de Mamonal y zona comercial de El Bosque, actividad marítima y portuaria, refinería, manejo de hidrocarburos, aportes de Canal del Dique.	Residuos sólidos, aguas residuales municipales, materia orgánica, arrastre de sedimentos, nutrientes, sólidos disueltos y en suspensión, hidrocarburos, residuos oleosos, aceites y grasas, metales pesados, microorganismos, desechos industriales.
Antioquia	Cuatro asentamientos humanos costeros (Arboletes, San Juan de Urabá, Turbo y Necoclí), lagunas de oxidación, Residuos sólidos, aguas residuales domésticas, actividad portuaria en Turbo, cultivo de banano, aportes por corrientes naturales (Río Atrato), minería de oro, aportes de los ríos Caimán, Turbo, León y Atrato.	Materia orgánica, nutrientes, agroquímicos, plaguicidas, sólidos suspendidos, microorganismos, hidrocarburos, mercurio, sedimentos, residuos líquidos y sólidos

Tabla 2. . Principales departamentos, fuentes y actividades humanas que afectan al río Magdalena. Tomado de : http://www.invemmar.org.co/documents/10182/14479/Informe_REDCAM_2009.pdf

4.5 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA EN PECES.

Se define como biomarcadores de disrupción endocrina a una serie de cambios que sufre un organismo a nivel molecular, celular, histopatológico como consecuencia de la exposición a xenobióticos.

Según la Organización Mundial de Salud, existen tres subdivisiones de biomarcadores, a saber: 1) Biomarcadores de exposición los cuales incluyen la detección y medición de una sustancia exógena o sus metabolitos, o producto de una interacción entre una sustancia química y una célula diana. 2) Biomarcadores de efecto los cuales se basan en mediciones bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones presentes en tejidos o líquidos corporales de un organismo, asociados a deterioro de salud o enfermedad. y 3) Biomarcadores de susceptibilidad: determinan la susceptibilidad hereditaria o adquirida de un organismo para responder al ambiente en presencia de xenobióticos los cuales incluyen expresión de genes específicos y cambios en los receptores que pueden incrementar la susceptibilidad de un organismo en exposición ⁷⁷.

La exposición a un contaminante ambiental y la determinación de sus efectos en peces en ecosistemas acuáticos, puede examinarse utilizando biomarcadores como: enzimas de biotransformación como la citocromo P-450; parámetros de estrés oxidativo a partir de la medición de la actividad de enzimas como Glutación peroxidasa y catalasa; parámetros hematológicos; inmunológicos; reproductivos y endocrinos. Así como, parámetros genotóxicos, neuromusculares, e histomorfológicos.

Los principales biomarcadores de efecto de EDs en tejidos empleados en peces han sido principalmente histopatológicos, en los cuales se determina una serie de características cuando se expone a un organismo por periodos crónicos a una sustancia xenobiótica. Estos ensayos permiten medir características como: índice gonadal, disminución o ausencia de células de Sertoli característico de infertilidad, evidencia en la falta de desarrollo del conducto gonadal, lo que impide el transporte de gametos y por ende su fertilidad, entre otros.

Además, si se exponen los peces a EDs en etapa de diferenciación sexual se pueden evidenciar características como reversión sexual, intersexo, infertilidad, entre otras o puede que la histología gonadal no muestre un impacto adverso en el individuo, pero este efecto individual podría significar o alertar sobre la existencia de un efecto adverso en la población⁷⁷.

Existen diversas técnicas desarrolladas para medir la expresión de proteínas oogénicas en peces dependiendo de los tejidos u órganos blanco a evaluar; las cuales incluyen: radioinmunoensayo (RIA), ELISA, e inmuno histopatología (IH) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales.

La inducción de vitelogenina es el principal biomarcador de efecto bioquímico que permite determinar dicha proteína en plasma cuando los peces han sido expuestos a cantidades determinadas de contaminantes químicos por períodos de tiempo cortos o prolongados, posee diferentes ventajas entre las que se enmarcan: su especificidad para los estrógenos, la sensibilidad y la magnitud de la respuesta posible que hacen que la concentración de Vtg puede incrementarse hasta un millón de veces en plasma; sin embargo, es una prueba limitada ya que emplea determinadas cantidades de plasma para identificar el analito y muchas veces impiden su obtención en peces pequeños⁷⁷.

Actualmente, se ha incrementado el uso de técnicas como RT-PCR (Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción reversa), la cual evalúa de una manera efectiva la expresión génica por ejemplo ARN mensajero de vitelogenina. Esta prueba expresa mayor sensibilidad comparada con pruebas que utilizan anticuerpos policlonales para su detección ya que es capaz de detectar niveles muy bajos de expresión génica (menores a 1 ng/mL), además posee una especificidad que no brindan otras técnicas como los inmunoensayos ya que pueden presentar reacciones cruzadas con Vtg de otras especies⁷⁷.

Por otra parte las técnicas cromatográficas se enfocan principalmente en la determinación de las concentraciones de un analito en específico, por lo cual puede ser empleada con el fin de identificar cada uno de los Disruptores endocrinos presentes en la Biota y sus

concentraciones. Algunas de ellas son: Cromatografía líquida de alta eficiencia de detección por fluorescencia, Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS), Cromatografía de gases-Espectrometría de masas/Espectrometría de masas(GC-MS/MS), Cromatografía líquida-Espectrometría de masas (LC-MS) y Cromatografía líquida-Espectrometría de masas / Espectrometría de masas (LC-MS/MS). A pesar de contar con una alta especificidad y sensibilidad para la determinación y cuantificación de EDs el desarrollo de este tipo de técnicas resulta ser limitado debido a su alto costo ya que emplea diferentes cantidades de compuestos y equipos que muchas veces no están disponibles para la población, además requiere de cantidades elevadas de muestra, procedimientos extensos para su purificación y disponibilidad de tiempo ya que son métodos de larga duración.

Actualmente, existe un ensayo capaz de determinar la presencia de disruptores endocrinos en agua, que no ha sido empleado en la determinación de EDs en peces pero su desarrollo y metodología lo sugieren como método potencial para la determinación de estas sustancias en peces.

- ***Yeast Estrogen Screen (YES).***

Es un ensayo de detección que comprende un sistema de expresión inducible por estrógenos en levaduras. El Departamento de Genética de Glaxo en el Reino Unido desarrolló un biosensor que emplea levaduras *Saccharomyces cerevisiae* transformadas genéticamente. Dicha técnica ha sido validada y muestra una alta especificidad en la detección de compuestos similares al estrógeno ¹.

Se ha demostrado que la implementación de este tipo de levaduras tiene ventajas que facilitan su utilización en la técnica tales como: ser un hongo unicelular, poseer células de tipo eucarióticas, presentar ciclos de vida corto, gran capacidad de reproducción y fácil cultivo. Adicionalmente, *S. cerevisiae* es un organismo al que se le conoce totalmente su genoma. Por otra parte existen otras propiedades intrínsecas que avalan su utilización como: no poseer

otro tipo de receptor nuclear homólogo a los de vertebrados que pudiera interferir; así mismo el plegamiento y las modificaciones post-traduccionales de proteínas de vertebrados en levaduras, es muy similar a la de mamíferos, propiedad que determina la especificidad del sistema, la cual se establece por los elementos genéticos externos insertados en la levadura².

La levadura se modificó adicionando la secuencia de ADN del receptor estrogénico humano (hER- α) en el genoma propio de la levadura y de un plásmido que lleva el gen reportero (Lac-Z). Por lo tanto ante la presencia de un agente con potencial biológico en el medio (estrógeno), se activará la transcripción del receptor el cual funcionará como activador transcripcional de LacZ, que codifica para la síntesis de la proteína β -galactosidasa cuya actividad enzimática, es fácilmente detectada y cuantificada mediante el sustrato cromogénico clorofenol rojo-B-D-galactopiranosido (CPRG) el cual cambia de color amarillo a rojo.

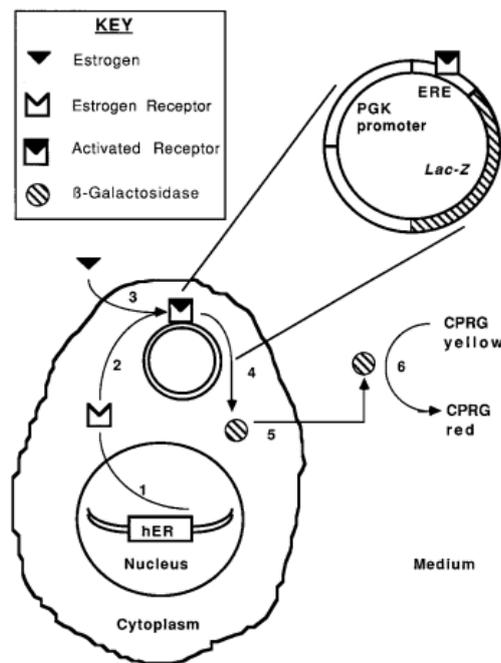


Figura 10. Esquema del sistema de expresión inducible por estrógenos en levadura. Tomado de: <https://scihub.tw/10.1002/etc.5620150303>

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo mixto.
Niveles de investigación: experimental y descriptivo.

5.2 Población de estudio

La población de estudio corresponde a pescados frescos provenientes del Río Magdalena.

5.3 Muestra

7 pescados frescos obtenidos de diferentes puntos de una plaza de mercado de Girardot provenientes del Río Magdalena procesados mediante 2 métodos de extracción: n- Hexano y etanol absoluto.

5.4 Hipótesis y Variables

5.4.1 Hipótesis

Existen sustancias de tipo estrogénico en diversas muestras de pescados provenientes del Río Magdalena, Como consecuencia de la exposición a diversos contaminantes de origen natural o antropogénico que integran la cuenca al desembocar mediante aguas residuales en sus riberas, afectando negativamente a la biota, principalmente peces y a los humanos que lo consumen.

5.4.2 Variables independientes

Entre las variables independientes se encuentran pescados frescos, agua, sedimentos, contaminantes emergentes con actividad estrogénica presentes en el agua y sedimentos del Río Magdalena.

5.4.3 Variables dependientes

Presencia o ausencia de sustancias estrogénicas en pescado fresco del Río Magdalena.

5.5 Indicadores

- La cepa de *Sacharomyces cerevisiae* recombinante genéticamente presenta su gen reportero (Lac-Z) que se une a la sustancia con actividad estrogénica presente en la muestra. Si esta reacción es positiva, se genera la producción de β -galactosidasa, actuando sobre el sustrato CPRG (Clorofenol Rojo β -D Galactopiranosido) y su producto es Clorofenol Rojo. Se evidencia esta interacción por el cambio de color del medio de amarillo a rojo.
- Contaminación presente en el agua y sedimentos del Río Magdalena.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Toma de muestras.

Las muestras se tomaron en diferentes puntos de la plaza de mercado que se encuentra frente al puente Mariano Ospina Pérez el cual cruza el río Magdalena, conectando los departamentos de Tolima y Cundinamarca a la altura de las ciudades de Girardot y Flandes. Para la toma de muestra se garantizó que los pescados seleccionados para el presente ensayo procedieran específicamente del río Magdalena. Una vez identificados se tomaron 7 muestras: 5 tajadas de Bagre y 2 pescado enteros de Bocachico, los cuales expresaban características morfológicas íntegras para su consumo; la cantidad de muestra se eligió basados en el método de muestreo no probabilístico por conveniencia.

6.1.1 Preparación de las muestras.

La técnica que se describe a continuación estuvo basada en la Técnica de extracción de Serrano R., López F.J, Hernández F. empleada en la extracción de compuestos organoclorados y organofosforados en tejidos de ballena detectado mediante espectrofotometría de masas.

Las muestras fueron cortadas en cubos de aproximadamente 10 x 10 mm y transferidas a una base de papel aluminio debidamente rotuladas, luego se incubaron a 65° C por 8 horas con el fin de extraer la cantidad de agua presente en las muestras. A continuación se traspasaron a mortero y se maceraron hasta obtener una pasta la cual fue eluída con n- hexano por un lado y etanol absoluto por otro, con el fin de extraer los analitos en estudio presentes en la grasa de cada muestra de pescado y definir cual eluyente es más efectivo para su obtención.

La capacidad de los eluyentes para extraer EDs se evaluó en función de la recuperación de estrógenos en tejido de pescado; para lo cual se emplearon muestras de pescado sumergidas en 17-β estradiol (Control Positivo) y otras en ausencia de este compuesto (control negativo);

la actividad de la prueba se correspondía con los resultados esperados por lo cual se validó la capacidad extractiva de los dos eluyentes.

Los extractos obtenidos se transfirieron a frascos de vidrio ámbar para protegerlos de la luz, y fueron conservados a 4°C hasta su consiguiente procesamiento.

- **Procedimiento de preparación y extracción de muestras.**



6.2 MONTAJE E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA

6.2.1 Reconstitución de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se reconstituyó de acuerdo al protocolo establecido en el trabajo de implementación de la Técnica YES para evaluar la presencia de sustancias estrogénicas en agua siguiendo los protocolos establecidos por Routledge y Sumpter. El biosensor empleado es capaz de captar cualquier compuesto análogo a los estrógenos cuando estos se unen al receptor hormonal, de tal manera que se transforma en un receptor activo que va a estimular al activador transcripcional para que exprese al gen reportero, el cual induce la expresión de la enzima β galactosidasa. Una vez liberada en el medio actúa sobre el sustrato cromogénico empleado, CPRG (Clorofenol Rojo β -D Galactopiranosido), obteniéndose como producto Galactosa y Clorofenol Rojo. El indicador vira dependiendo la concentración de analito detectado y se expresa mediante un cambio de color de amarillo a rojo.

6.2.2 Implementación de la Técnica YES

El montaje de la prueba se llevó a cabo según el protocolo descrito por Roughtledge y Sumpter, (1996). A partir de las recomendaciones descritas en el procedimiento el material de vidrio destinado para la prueba se sometió a una cuidadosa y efectiva limpieza para evitar la presencia de contaminantes que alteraran los resultados obteniéndose como consecuencia resultados falsos positivos. El material se enjuagó dos veces con etanol absoluto y se dejó secar. Al mismo tiempo que se preparaban las soluciones de ensayo.

- **Compuesto de Referencia**

Para llevar a cabo los ensayos se preparó una solución patrón de 21,6 mg/L de 17 β -estradiol marca Calbiochem (Merck) (CAS 50-28-2) de 97% de pureza en etanol absoluto marca Chemí de 98% de pureza, la cual se empleó para realizar diluciones seriadas en etanol absoluto preparando concentraciones desde 1080 μ g/L hasta 0,128 ng/L. Así mismo, se preparó una solución stock de 10mg/mL del sustrato cromogénico Clorofenol Rojo β -D Galactopiranosido sal sódica de 98,9% de pureza marca Calbiochem (Merck), la cual se purifica en un filtro de 0,2 μ m y se colecta en frascos de vidrio estériles, en cabina de flujo laminar con posterior conservación a 4°C.

- **Protocolo de la prueba**

Se realizó la transferencia de 10 μ L de cada una de las diluciones preparadas de 17- β -estradiol y los 14 extractos a cada uno de los pozos de la fila de la microplaca de 96 pozos y se dejó evaporar hasta sequedad en cabina de flujo laminar. Una vez cumplida la evaporación, se adicionaron 200 μ L del medio de trabajo, el cual se preparó adicionando 50 mL de medio de crecimiento, 500 μ L de cultivo de la levadura (con previo crecimiento durante 18 horas y con densidad óptica ajustada a 1) y 500 μ L de la solución del sustrato cromogénico Clorofenol Rojo β - D Galactopiranosido.

La microplaca 1 contenía:

1. 4 curvas de 17- β estradiol comprendida por las diluciones anteriormente mencionadas.

Nota: Se realizaron 4 curvas de 17 β -estradiol en el presente estudio, con el fin de complementar los resultados obtenidos en 16 ensayos anteriormente realizados y obtener un promedio de las D.O corregidas de las últimas 20 curvas para desarrollar la curva patrón.

La microplaca 2 contenía:

1. Un control positivo integrado por muestras de pescado sometidas a tratamiento con etinilestradiol representados en las filas A y B de la microplaca.
2. Un blanco integrado por el CPRG y el medio de crecimiento Fila F (pozos 7-12) y fila H.
3. Un control negativo integrado por el solvente (etanol), CPRG y medio de crecimiento Fila G.
4. Montaje de Muestras extraídas con Hexano y etanol Filas C, D, E y F (pozos 1-6).

Las 14 muestras de pescado, 7 extraídas con etanol y 7 con hexano respectivamente; se montaron por triplicado a lo largo de la placa. Para evitar la contaminación de la prueba con el agua de condensación procedente del baño serológico se procedió a cubrirla con papel filtro estéril. Se incubaron a 30°C por 72 h con agitación orbital constante y seguidamente se llevó a cabo la lectura en un lector de placas de ELISA BioRad a 540 nm (densidad óptica para CPRG) y 630 nm (densidad óptica para la turbidez producida por el crecimiento de la levadura).

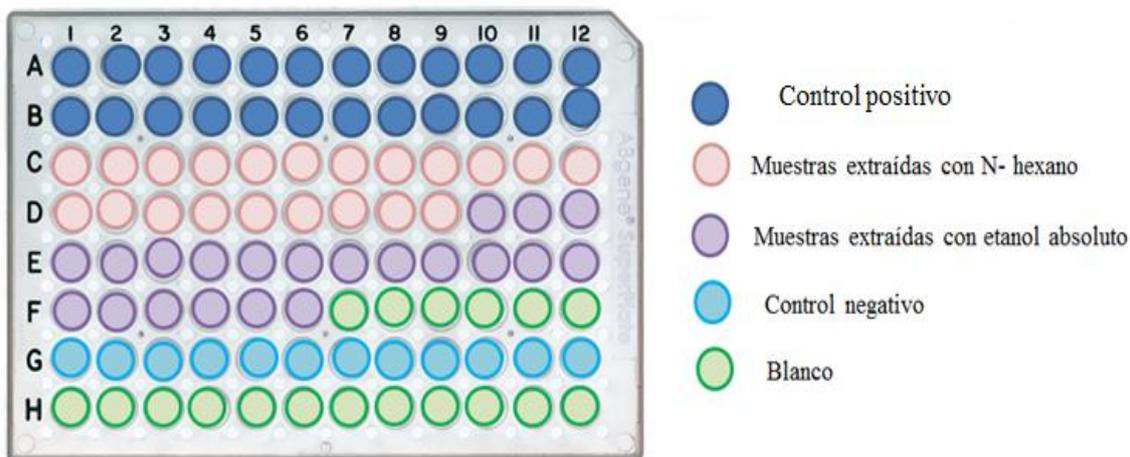


Figura 11. Montaje placa de ensayo nº 2.

Una vez implementada la técnica se procedió a elaborar la curva concentración respuesta. Los resultados obtenidos fueron corregidos bajo la siguiente fórmula.

$$D.O.muestra(540\text{ nm})-[D.O.muestra(630\text{ nm})-D.O\text{ blanco (630 nm)}] .$$

La actividad estrogénica de las muestras se calculó interpolando la lectura corregida en la curva dosis-respuesta del 17 β -estradiol.

Nota: Para realizar la tabla n° 3 del promedio de las D.O corregidas obtenidas de los últimos 20 ensayos, se tuvieron en cuenta concentraciones de 17 β -estradiol desde 16875 ng/L hasta 0,128 ng/L, ya que concentraciones superiores de 16875 ng/L producen resultados positivos lineales, razón por la cual se decide limitar los datos empleando 18 de las 24 concentraciones realizadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

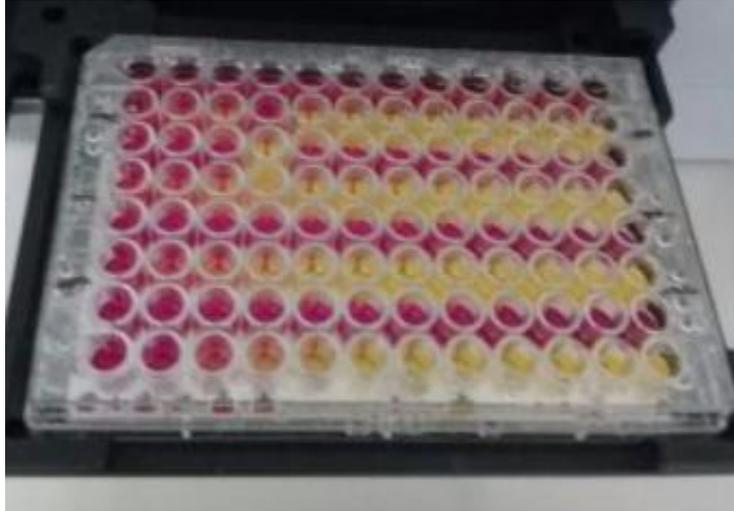


Figura 12. Curva patrón 17 β -estradiol placa n°1.

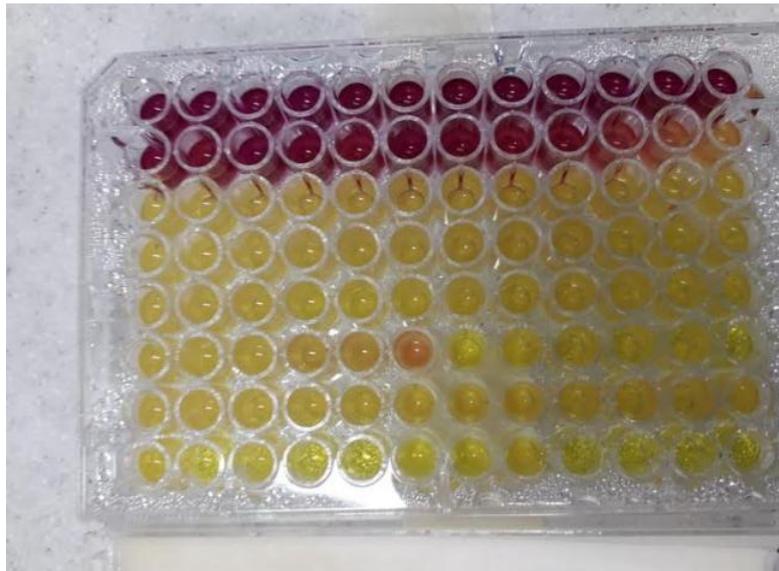


Figura 13. Placa n° 2 de microtitulación exhibiendo la respuesta de la técnica YES frente a EDs presentes en pescado .

Nº de dilución	Concentración 17 β -estradiol ng/L	Promedio D.O
1	16875	2,248
2	8437,5	2,106
3	4218,75	2,057
4	2109,38	1,983
5	1054,7	1,871
6	527,35	1,738
7	263,7	1,613
8	131,85	1,297
9	66	1,05
10	33	0,72
11	16,5	0,521
12	8,25	0,333
13	4	0,266
14	2	0,203
15	1	0,21
16	0,5	0,198
17	0,25	0,186
18	0,128	0,203

Tabla 3. Promedio de las D.O corregidas de los últimos 20 ensayos.

MUESTRAS	DISOLVENTES	ACTIVIDAD ESTROGÉNICA (ng/L EEQ)	
		HEXANO	ETANOL
M1	PESCADO BAGRE PLAZA PTO 1	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M2	PESCADO BAGRE PLAZA PTO 2	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M3	PESCADO BAGRE PLAZA PTO 3	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M4	PESCADO BAGRE PLAZA PTO 4	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M5	PESCADO BAGRE PLAZA PTO 5	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M6	PESCADO BOCA CHICO PLAZA PTO 6	< 4 ng/L	< 4 ng/L
M7	PESCADO BOCA CHICO PLAZA PTO7	< 4 ng/L	6 ng/L

Tabla 4. Resultados de actividad estrogénica obtenidos con las muestras de pescado.

Se han desarrollado una amplia variedad de ensayos para determinar la presencia de sustancias con actividad estrogénica en pescados. La principal consiste en un método indirecto de estimulación de la producción de vitelogenina en suero definido como marcador biológico de disrupción endocrina en peces, cuando se está expuesto a ciertas concentraciones de sustancias químicas capaces de activar los receptores estrogénicos. El presente trabajo describe un ensayo alternativo que emplea un método de identificación directa en el que hER es expresado en la levadura de una forma capaz de activar la transcripción de un promotor portador de ERE, de una manera dependiente de estrógenos. *Saccharomyces cerevisiae*, es una especie cuyo genoma se conoce totalmente, característica que favorece el desarrollo del estudio ya que normalmente no contiene un receptor de estrógenos y por consiguiente los EDs presentes en las muestras no ejercen efecto en otros genes; por lo tanto en su ausencia no se consideran objetivos diana para este tipo de compuestos, lo que permite excluir resultados falsos positivos cuando se trabaja y se cumple con todas las condiciones de prueba, manteniendo la esterilidad de la muestra y los procesos, evitando así la presencia de microorganismos que puedan actuar sobre el compuesto cromogénico CPRG.

Siguiendo los protocolos establecidos descritos por Cifuentes P. en su trabajo, para la implementación de la técnica YES, se logró obtener un crecimiento óptimo de la cepa, determinado por el balance de componentes proporcionado por el medio. La solución patrón, el sustrato cromogénico, los solventes y las condiciones específicas de temperatura permitieron llevar a cabo el ensayo sin ninguna interferencia, se excluye la presencia de contaminación en cualquiera de los elementos empleados.

Para la determinación de la actividad estrogénica presentada en cada una de las muestras, se realizó una curva patrón cuya dosis estaba determinada por cada una de las concentraciones de 17 β - estradiol 16875 ng/L a 0,128 ng/L empleadas en la técnica; y la densidad óptica promedio obtenida de cada una como respuesta en los últimos 20 ensayos; expresada como la actividad de la enzima β -galactosidasa.

La prueba cuenta con una sensibilidad de 4 ng/L de 17 β - estradiol. Además posee varias ventajas ya que se realiza en placas de 96 pozos de microtitulación que permiten la detección

de cualquier compuesto con actividad estrogénica que se encuentre presente; y se pueden obtener resultados en 3 a 4 días sin la necesidad de recolección de cantidades específicas de suero de peces, procedimiento que se emplea para la determinación de los niveles de vitelogenina y se ve limitado ya que se obtienen muestras insuficientes como producto de su tamaño, además de ser un proceso que demanda mayor cantidad de tiempo y en ciertas ocasiones empleo de grandes concentraciones de compuestos químicos para provocar una respuesta estrogénica características relacionadas con lo expuesto por Routledge y Sumpter 1996. En la técnica YES el cambio de color se puede ver a simple vista, lo que permite que los resultados sean cualitativos o cuantitativos. Además, a partir del protocolo se evidencia que este sistema es altamente específico, reproducible y rápido, lo que facilita su uso como un ensayo de rutina para la detección de sustancias con actividad estrogénica en pescado como producto de consumo.

Los ensayos convencionales histopatológicos y bioquímicos miden la respuesta biológica de los peces a xenobióticos estrogénicos, sin embargo se ven limitados ya que funcionan únicamente como marcadores indirectos de exposición a EDs al no determinar directamente la presencia de estas sustancias químicas y las concentraciones biodisponibles en cada especie; no reflejan la real situación que se da en el medio ambiente acuático, donde la biota se encuentra con gran probabilidad de exposición crónica a contaminantes a lo largo de su vida.

A partir de los resultados obtenidos en la Tabla número 3, se observa la positividad de la muestra 7 correspondiente al pescado Bocachico obtenido del punto 7 de la plaza de mercado de Girardot mediante la extracción con etanol absoluto. La respuesta generada corresponde a 0,2895 D.O expresada como actividad de la enzima β -galactosidasa sobre el 17 β -estradiol, la cual produjo un cambio de color en el medio. La positividad de una muestra en la presente técnica es representativa cuando la respuesta generada supera una D.O 0.260 ABS, necesaria para definir la concentración de la dosis que la produce. Las respuestas que se encontraron por debajo de la sensibilidad de la técnica generada por muestras en 13 de 14 extracciones realizadas, no son concluyentes para definir la inocuidad de los pescados provenientes del río Magdalena, ya que no se correlaciona con las características de contaminación del agua de la que provienen. Los resultados se relacionan con tres situaciones específicas: la cantidad de

muestra empleada para la obtención de los extractos, el solvente usado para la extracción y la cantidad de eluato obtenido constituido por lípidos recuperados de las muestras.

Con respecto a la cantidad de la muestra, el porcentaje de carne y tamaño difería entre las 2 especies. Para la extracción de las muestras de bagre (1-5) se utilizaron rebanadas de 4 cm de grosor y 10 cm de diámetro, cada rebanada pertenecía a un pescado diferente representativo de cada uno de los puntos de la plaza. Para la extracción de las muestras de Bocachico (6-7) se emplearon pescados completos de longitud de 20 cm cada uno, se decidió realizar el ensayo según cantidades referidas ya que el porcentaje de carne de las rebanadas de Bagre que se podría obtener se correlacionaba con la carne de un Bocachico completo que según morfología impediría la obtención de cierta cantidad de muestra de un sitio específico. Además, se garantizaron condiciones iguales a cada muestra ya que al desecarse mediante calor por 8 horas a 65°C, la humedad presente en cada una se redujo de tal manera que contribuyó en la obtención de extractos con nulo porcentaje de agua que interfiriera con el eluyente; sin embargo, la proporción existente entre las dos especies con respecto a las cantidades de muestra empleada se perdió, pues al ser el Bagre la especie que presenta mayor humedad se generó una disminución en su tamaño.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que se usaron dos tipos de solventes n-hexano y Etanol absoluto para realizar dos extracciones diferentes en el pescado fresco. El n-Hexano, se eligió de acuerdo al protocolo realizado por Serrano R., López F., Hernández F., para la extracción de compuestos organoclorados y organofosforados en tejidos de ballena detectado mediante espectrofotometría de masas. Con respecto al Etanol absoluto, se usó para identificar su comportamiento para detectar este tipo de sustancias en pescado fresco, ya que se había usado obteniéndose excelentes resultados en un estudio realizado por Aguirre C. en 2015 para la determinación de sustancias con actividad estrogénica en frutas y hortalizas de consumo en fresco en puntos de venta de la ciudad de Bogotá.

Disolvente	Densidad g/mL	Punto de ebullición	Solubilidad en H2O mg/L
n-Hexano	0,654	69°C	6,1
Etanol absoluto	0,789	78°C	miscible

Tabla 5. Características químicas de los disolventes.

El uso del n-hexano como disolvente orgánico se ha empleado en varios estudios para la extracción de grasas, ya que se caracteriza por ser liposoluble al poseer baja polaridad; propiedad determinante en la solubilidad de sustancias de tipo estrogénico al ser estas lipofílicas. Su empleo como eluyente permite obtener una mayor adsorción de los lípidos presentes en las muestras y por lo tanto una mayor recuperación de EDs al propiciar su coelución.

Sin embargo, la obtención de extractos con este solvente se vio limitada por su alta volatilidad; una efectiva extracción con este compuesto requiere de mayor cantidad de volumen de reactivo debido a que se evapora rápidamente y dificulta la recuperación de cantidades representativas y/o apreciables de muestra, pues solo se logró obtener $\frac{1}{3}$ parte del vial y a simple vista se podía apreciar que el porcentaje de grasa extraído era mínimo. A pesar de las limitaciones presentadas con este solvente, como consecuencia de sus características químicas que impidieron la obtención de una cantidad apreciable de extracto lipídico, que facilitara la recuperación de EDs en las muestras y por lo tanto exhibiera resultados positivos; es importante resaltar que su empleo es un método efectivo para la extracción de sustancias de tipo estrogénico, según la validación de la capacidad extractiva de cada eluyente, en función de la recuperación de estrógenos en tejido de pescado, descrito en el protocolo de preparación de muestras desarrollado en el presente estudio. No obstante se debe replantear un protocolo de extracción con este compuesto, en donde se controlen las condiciones para obtener un óptimo resultado y se valide su capacidad extractiva mediante el empleo de muestras de pescado tratadas con diferentes tipos de sustancias estrogénicas, durante periodos de tiempo prolongados para ser empleados como controles positivos; de tal manera que se garantice el ingreso de estas sustancias a los tejidos grasos de los pescados para su posterior extracción con n-Hexano.

El etanol absoluto ha demostrado ser un eficiente eluyente; en resultados obtenidos por Cifuentes P. para la determinación de EDs en aguas, mostró el mayor porcentaje de recuperación de los solventes utilizados para extracción en fase sólida. En el presente estudio el etanol empleado en la extracción comparado con n-Hexano, exhibió una mayor eficiencia como eluyente hecho que se correlaciona con la fuerza de elución que este tipo de compuesto posee (0.88) superior a la presentada por n-Hexano (0.01) descrita en la serie de Snyder. Además, mostró tener una mayor estabilidad de su fase al no evaporarse y por lo tanto una menor demanda de reactivo, la recuperación de extractos fue mayor a las $\frac{2}{3}$ partes de cada vial empleado, sin embargo, solo la muestra 7 de Bocachico tratada con este compuesto fue positiva, suceso que se relaciona con la variable 3. al obtenerse un mayor porcentaje de materia grasa de esta especie, el porcentaje de material lipídico aumenta y por lo tanto aumenta la recuperación de EDs. En este punto el extracto obtenido de la muestra 7, el porcentaje de grasa fue tal que logró la solidificación del eluato.

Con relación al porcentaje de grasa total presente en 100g de bagre es de 1.70g, cantidad superior comparada con la que contiene un Bocachico 1.50g en 100 g de pescado, valores determinados por la Fundación Iberoamericana (FUNIBER) presentada en la base de datos internacional de composición de los alimentos. Sin embargo, de acuerdo con la cantidad de muestra empleada para el ensayo (Bocachico completo, Bagre por rebanadas), del Bocachico se extrajo mayor cantidad de grasa siendo proporcional a la cantidad de gramos empleada. Además al emplear la totalidad de la masa de esta especie se aseguró la recuperación de extractos con mayor cantidad de lípidos; que según fisiología se encuentran integrando gran parte del tejido adiposo del vientre de cada pescado.

La técnica no logro percibir resultados cuali o cuantitativos de la presencia de disruptores endocrinos referentes a la muestra 6 a pesar de ser una muestra que comparte características similares, al provenir del mismo río, al ser de la misma especie que la muestra 7 y obtenerse mediante el mismo procedimiento de extracción; los resultados obtenidos difirieron ya que la grasa extraída fue menor a pesar de una cantidad empleada similar a la muestra 7; característica que aumenta las probabilidades de coelución con sustancias de tipo estrogénico y por lo tanto una mayor recuperación mediante la técnica empleada.

No obstante la susceptibilidad de las especies a sufrir de contaminación por EDs no se relaciona únicamente con la proporción de grasa que está presente correlacionada con un incremento del tiempo de exposición a EDs, pues el estilo de vida de cada especie es determinante ya que la disponibilidad y exposición a EDs van a depender de las características en las que se desarrolle.

Los estilos de vida de las especies empleadas para el ensayo varían; el Bagre es una especie que se encuentra en zonas poco profundas, se alimenta de algas que le proporciona el ambiente ya que es una especie oportunista, no migratoria; al no ser un gran cazador emplea poca energía lo que le permite la acumulación de grasa. Por otro lado el Bocachico es una especie migratoria que se alimenta de detritus (succionando con su boca el lodo para aprovecharlos) lo que garantiza un rápido crecimiento del pez y acumulación de grasa, sin embargo esta disminuye al realizar largos desplazamientos desde las ciénagas hasta los tributarios laterales en periodos de aguas bajas.

Las aguas del Río Magdalena por su parte presentan una enorme variedad en su composición, esta composición química depende, en primer lugar, de lo que el agua pueda disolver del suelo por el que discurre, por lo tanto es el suelo lo que determina la composición química del agua; al ser el río Magdalena una desembocadura para diferentes ríos y vertimientos contaminados, la composición del agua va a estar determinada en gran parte por los contaminantes químicos presentes asociados al suelo. Esto se explica porque los sedimentos presentes en estos cuerpos de agua se caracterizan por ser matrices receptoras de los contaminantes emergentes; al poseer una alta actividad electrostática y de fuerzas moleculares adsorbe cationes y moléculas exógenas, funcionando de esta manera como amortiguadores de contaminantes como lo expresa Liu et al 2012 *Debido a su baja solubilidad y alta lipofilidad, EDs tienden a acumularse en los sedimentos, quienes actúan como depósito de los mismos a largo plazo.* Sin embargo, al funcionar como almacén también pueden liberar dichos contaminantes a corto plazo bajo condiciones físicas y químicas cambiantes resultando en su movilización. El agua intersticial presente en los sedimentos constituye un sumidero de COPs característica que la hacen favorable como indicador de impacto ambiental; y los compuestos que se encuentran en esta se consideran biodisponibles propiedad que determina la verdadera exposición de los organismos a los contaminantes. De acuerdo con estudios realizados por Olivero y Tejada en el Río

Magdalena, los contaminantes emergentes se ven principalmente asociados a los sedimentos en comparación con los que se encuentran disueltos en el agua descritos por investigaciones desarrolladas por Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés (INVEMAR).

Por consiguiente las especies de Bochachico presentan mayor susceptibilidad a sufrir de contaminación ya que a pesar de que posee menor cantidad de grasa, la biodisponibilidad de los EDs es mayor debido a que se alimentan de detritus continuamente, exponiéndose de esta manera a mayores concentraciones de contaminantes durante mayor periodo de tiempo, por lo tanto las características en las que se desarrolla una especie pueden actuar como factores protectores o factores de riesgo.

Como lo exponen Wasserman JC, et al. 2003 y Simoneau M et al. 2005: la bioacumulación y biomagnificación van a depender en gran medida del nivel trófico de una especie ya que va a influir en los niveles de contaminación presentes en cada organismo. Estudio realizado por Marrugo, Negrete et al. 2008 en 16 pescados de Mojana Bolívar Colombia; determinaron que las concentraciones de mercurio presentes en especies carnívoras era mayor que las presentes en especies no carnívoras, ya que las primeras obtienen la contaminación proveniente de las presas que injieren.

La susceptibilidad a los EDs entre organismos de una misma especie varía debido a las condiciones de escasez o abundancia de alimento en las cuales se desarrollan (Fent et al. 2006), la edad de cada pescado (Houtman et al., 2011), las características fisicoquímicas de las fuentes de agua dulce de las que provienen (Echarri. 1998). Al ser el Bocachico una especie migratoria se desconocen las características exactas del agua en términos de materia orgánica, sólidos suspendidos, sedimentos contaminados y la presencia de contaminantes orgánicos persistentes, a lo largo del cauce del río en las que se desarrolló, ya que las concentraciones en las que se encuentran estos elementos varían dependiendo de la cercanía y constante exposición de las empresas, industrias y hogares que contribuyen a su vertimiento. La exposición de los Bocachicos empleados en el presente estudio a diferentes ambientes dentro del bioma acuático, se pudo comprobar al detectar a simple vista que la carne de la

muestra 6 presentaba un color anaranjado comparado con la muestra 7 y las muestras de pescado Bagre que poseían un color natural.

8. CONCLUSIONES.

- La técnica Yeast Estrogen Screen cuenta con una alta sensibilidad, especificidad y obtención rápida de resultados para ser implementada en la detección de sustancias con actividad estrogénica en pescado fresco.
- Se puede reconocer al método de extracción con etanol como el más efectivo para la extracción de compuestos disruptores endocrinos en peces gracias a que cuenta con una gran estabilidad de la fase líquida y una menor volatilidad que el n-Hexano.
- La susceptibilidad de los peces a la contaminación con EDs se asocia principalmente al estilo de vida de cada especie el cual determina la disponibilidad y exposición a estos contaminantes, el porcentaje de grasa total presente en cada especie y el tiempo de exposición.

9. RECOMENDACIONES.

- Realizar más estudios teniendo en cuenta el método de extracción para este tipo de productos ya que de este proceso depende la recuperación e identificación de los compuestos de interés.
- Llevar a cabo determinaciones de sustancias con actividad estrogénica mediante la técnica YES, en diferentes especies de pescado de importancia comercial, obtenidos en los Ríos que contribuyen a su mayor abastecimiento.
- Implementar herramientas como espectrofotometría de masas, que brinden el conocimiento de las sustancias químicas específicas presentes en el pescado fresco.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Friedman M, McIntosh P, Berenbaum M, Carson R. La pluma contra el veneno. [Internet] 1962.[citado 15 ago 2018]. Disponible en:
<https://photos.state.gov/libraries/amgov/30145/publications-spanish/rachel-carson-sp.pdf>
2. Milne L, Milne M. There's Poison All Around Us Now. The New York Times [Internet]. 1962.[cited 23 sep 2018];Sec:Books. Available in:
https://archive.nytimes.com/www.nytimes.com/books/97/10/05/reviews/carson-spring.html?_r=1&oref=slogin
3. Murphy, Coit P, *What A Book Can Do: The Publication and Reception of Silent Spring*. University of Massachusetts Press [Internet]1968. [cited 23 sep 2018].Available in:
<http://www.umass.edu/umpress/title/what-book-can-do>
4. Roberto A, Carson A, la mujer que enfrentó a las agroquímicas e inauguró el ecologismo contemporáneo. Diario la izquierda [Internet].1982 [citado 15 ago 2018]; Sec: sociedad. Disponible en: https://laizquierdadiario.com/spip.php?page=gacetilla-articulo&id_article=105006

5. Ministerio del Medio Ambiente. LEY 99 DE 1993[Internet].1993.[citado 24 nov 2018] Disponible en: <http://www.humboldt.org.co/images/documentos/pdf/Normativo/1993-12-22-ley-99-crea-el-sina-y-mma.pdf>
6. Teoría de la disrupción endocrina.[Internet].1993; [citado 5 ago 2018] Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Interrupcion_endocrina
7. Soto A, Sonnenschein C. Disruptores endocrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades [Internet]. Gac Sanit 1993; [citado 5 ago 2018] 16(3):209-11. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/gsv/v16n3/edit02.pdf>
8. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS). Curso de Introducción a los Disruptores Endocrinos [Internet]. (ISTAS). [citado 5 ago 2018]. Disponible en: http://www.istas.ccoo.es/descargas/disruptores_endocrinos_final.pdf
9. Colborn T, Frederick S, Soto M. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans [Internet].Environmental Health Perspectives 1993 . [cited 5 aug 2018]. 101, Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519860/>
10. Sumpter JP. Feminized responses in fish to environmental estrogens [Internet]. Toxicology Letters 1995[cited 5 aug 2018];82-83:737-742. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8597136>
11. Lutz D. No conception [Internet] . New York Academy of Sciences Jan 1996 [cited 15 January 2019]; Volume 36, Nº 1. Available in: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/pqrl/docview/212614955/fulltext/96E0A94D49884305PQ/20?accountid=50438>
12. Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination [Internet]. Environmental Health Perspectives Supplements 1995[cited 5 July 2018]; 103:173. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593867>

13. Ministerio de ambiente. Ley 253 de 1996 Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación. [Internet]. 1996. [citado 24 nov 2018] Disponible en:
http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/leyes/1996/ley_0253_1996.pdf
14. Serrano N, Fernández MF, Olmedo P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos I. Estrógenos naturales [Internet]. Revista Salud Ambiental 2001. [citado 15 ago 2018] 12 Disponible en: http://www.estudiosecologistas.org/web/Curso/Curso%20Ecuador/Disruptores%20Endocrinos/Disrupci%C3%B3n_Endocrina_Humanos.pdf
15. Burkhardt-Holm P, Peter A, Segner H. Decline of fish catch in Switzerland [Internet]. Aquatic Sciences (2002). [cited 5 april 2019] 36-54 Available in:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/docview/917591095/fulltextPDF/27FB7AE29E34411BPQ/33?accountid=50438>
16. Brian J, Harris C, Scholze M, Backhaus T, Booy Petra, otros. Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals [Internet] . Environ Health Perspect 2005. [cited 5 april 2019]. 113(6): 721–728. Available in:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257597/>
17. Nielsen L. Baatrup E. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of the guppy, *Poecilia reticulata* [Internet]. Aquatic toxicology 2006. [cited 15 April 2019] Volume 80, Issue 2, pages 140-148 Available in:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0166445X06003237?via%3Dihub>
18. Hecker M. Sanderson T. Karbe L. Suppression of aromatase activity in populations of bream (*Abramis brama*) from the river Elbe, Germany [Internet]. Chemosphere 2007. [cited 15 April 2019] Volume 66, Issue 3, Pages 542-552. Available

in:<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0045653506007053?via%3Dihub>

19. Lyssimachou A, Arukwe A. Alteration of Brain and Interrenal StAR Protein, P450scc, and Cyp11 β mRNA Levels in Atlantic Salmon after Nominal Waterborne Exposure to the Synthetic Pharmaceutical Estrogen Ethynylestradiol [Internet]. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2007. [cited 17 April 2019] 70: 606–613. Available

in:<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2388/doi/pdf/10.1080/10937400600882905?needAccess=true>

20. Milla S, Depiereux S, Kestemont P. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review [Internet]. *Ecotoxicology* 2011.[cited 17 April 2019] 20(2):305-19. Available in:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210218>

21. Kessabi K1, Annabi A, Hassine AI, Bazin I, Mnif W, Said K, Messaoudi I. Possible chemical causes of skeletal deformities in natural populations of *Aphanius fasciatus* collected from the Tunisian coast [Internet]. *Chemosphere* 2013.[cited 17 April 2019]90(11):2683-9. Available in:

<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S004565351201452X?via%3Dihub>

22. Ministerio de Ambiente. Ley 1252 de 2008. Normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos [Internet].2008. [citado 24 nov 2018] Disponible en: <http://quimicos.minambiente.gov.co/index.php/contaminantes-organicos-persistentes/normatividad>

23. Ministerio de Ambiente. Ley 1196 de 2008. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes[Internet].2008. [citado 24 nov 2018] Disponible en: <http://www.cdmb.gov.co/web/documentos/documentos-2015-1/1378-ley-11961998/file>

24. Smith A.G, Gangolli D. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns [Internet]. *Food and Chemical Toxicology* 2008. [cited 24 Jan 2019]. Volume 40,

Issue 6, pag 767-779. Available in:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502000467>

25. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in blood plasma of humans in Hong Kong [Internet]. *Environment International* 2012. [cited 29 Jan 2019]

Volume 47, 15, Pages 66-72. Available in:

<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0160412012001249?via%3Dihub>

26. Thrupp T, Runnalls T, Scholze M, Kugathas S, Kortenkamp A, Sumpter J . The consequences of exposure to mixtures of chemicals: Something from ‘nothing’ and ‘a lot from a little’ when fish are exposed to steroid hormones [Internet]. *Science of The Total Environment* 2018.[cited 24 Jan 2019]. Volumes 619–620, 1,Pages 1482-1492. Available in:

<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S004896971733139X>

27. Romano Mozo D. Disruptores endocrinos, Nuevas respuestas para nuevos retos [Internet]. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS) 2012. [citado 24 Ene 2019].: V - 238 - 2013. Disponible en:

http://www.istas.ccoo.es/descargas/disruptores_endocrinos_final.pdf

28. Aguirre Jimenez C. Determinación de la presencia de sustancias de tipo estrogénico en la superficie de alimentos para consumo en fresco procedentes de diferentes centrales de venta en la ciudad de Bogotá D.C. [Internet]. Repositorio Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2015. [citado 07 Jun 2019]. Disponible

en:<http://190.60.201.179:28080/janium-bin/sumario.pl?Id=20190609141706>

29. Vargas Ruiz J, Torres Herrera L, Parra Steevens A. Determinación de sustancias con actividad estrogénica en la fresa (*fragaria sp*) a partir de la técnica Yeast Estrogen

Screen.[Internet]. Repositorio Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2015[citado 07 Jun 2019]. Disponible en:[http://190.60.201.179:28080/janium-](http://190.60.201.179:28080/janium-bin/sumario.pl?Id=20190609141706)

[bin/sumario.pl?Id=20190609141706](http://190.60.201.179:28080/janium-bin/sumario.pl?Id=20190609141706)

30. Fonseca Ruiz A, Gil Barón F. Determinación de la actividad estrogénica relacionada con la contaminación en la cuenca alta del río Bogotá [Internet]. Repositorio Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2016[citado 07 Jun 2019]. Disponible en:<http://190.60.201.179:28080/janium-bin/sumario.pl?Id=20190609141706>
31. Serrano N. , Fernández Cabrera M.F , Olmedo P. . Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos . Estrógenos naturales [Internet]. Laboratorio de investigaciones médicas. hospital clínico. universidad de granada. Escuela andaluza de salud publica 2001 [citado 07 Oct 2019]. Disponible en:
<https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/434/357>
32. Moreno Márquez E. , Nuñez Álvarez A. Disruptores endocrinos, un posible riesgo tóxico en productos de consumo habitual [Internet]. Ciencias Ambientales, Universidad de Huelva 2012. [citado 07 Oct 2019]. Disponible en:
<http://www.zaragoza.es/contenidos/medioambiente/contaminantes-hormonales.pdf>
33. Cifuentes Prieto P. Implementación de la técnica “Yeast Estrogen Screen” para evaluar la presencia de sustancias estrogénicas en agua [Internet]. Universidad Nacional de Colombia 2013. [citado 07 Oct 2019]. Disponible en:
<http://bdigital.unal.edu.co/10699/1/01186314.2013.pdf>
34. Raloff J. Explainer: What are endocrine disruptors?[Internet]. Science News for Students; Washington 2014. [citado 07 Oct 2019]. Available in:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/pqrl/docview/1550707625/BBB989E2381B402FPQ/5?accountid=50438>
35. Grothusen miller H. Efecto de estímulos estrogénicos en la expresión de factores hipofisiario en cyprinus carpio [internet].Universidad austral de chile facultad de ciencias 2008. [citado 09 Oct 2019]. Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fcg881e/doc/fcg881e.pdf>

36. Estors Sastre B. Exposición a disruptores endocrinos y otros factores paternos en la etiología del hipospadias y la criptorquidia [internet].Universitat de les Illes Balears 2018.[citado 09 Oct 2019]. Disponible en:
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/665571/tbes1de1.pdf?sequence=1&isallowed=y>
37. Aranzazu Taborda D., Rodríguez B., Duque Agudelo B. Disrupción endocrina en peces [internet].Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias vol.25 no.2 2012..[citado 10 Oct 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000200015
38. Sastre B.Exposición a disruptores endocrinos y otros factores paternos en la etiología del hipospadias y la criptorquidia [internet].Programa de Doctorado en Investigación Translacional en Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia.Universitat de les Illes Balears 2018. [citado 17 Oct 2019] Disponible en:
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/665571/tbes1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
39. Diliz Perez E. Disruptores endocrinos ambientales y su relación con la obesidad [internet]. Universidad autónoma de Barcelona 2015. [citado 10 Oct 2019]. Disponible en:
<http://www.semcc.com/master/files/Disruptores%20endocrinos%20y%20obesidad%20-%20Dra.%20Diliz.pdf>
40. Brandan N.C, Llanos I., Horak F. A., Tannuri H. O., Rodriguez A. N.. Principios de endocrinología [internet].Universidad Nacional de Nordeste 2014.[citado 17 Oct 2019]. Disponible en:
<http://www.med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/PRINCIPIOS%20DE%20ENDOCRINOLOG%20C3%8DA.pdf>
41. Biosíntesis y metabolismo de hormonas esteroides y vitamina D [internet]. Bioquímica humana. Guia de esteroides. [citado 17 Oct 2019]. Disponible en :
http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%20C3%B1o/bioquimica/esteroides.pdf

42. Mendoza Patiño R. Farmacología médica. Farmacología Especial: sistema endocrino: estrógenos [internet]. Universidad autónoma de México 2008. [citado 17 Oct 2019].
Disponible en:
<https://books.google.com.co/books?id=EUBNE4Y0v9sC&pg=PA413&dq=ESTROGENOS&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj-vYCOuOLjAhUDwlkKHZ5gAHQQ6AEIOTAD#v=onepage&q&f=false>
43. Col J. Col D. Propiedades químicas de los estrógenos. [internet]. Participación Funcional. [citado 18 Oct 2019]. Disponible en:
<http://163.178.103.176/casosberne/8hendocrino/caso50-1/htmlc/casosb2/dos/dos1.html>
44. Díaz Chico B. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: biología y clínica del cáncer: Degradación y eliminación de estrógenos [internet]. Departamento de Bioquímica y Fisiología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria 2004 [citado 18 Oct 2019].
Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/1026/11-degradacion-y-eliminacion-de-estrogenos>
45. Espinoza Locia J., Hernández Aguilar E., Aranda Abreu G., Rojas Durán F., Manzo Denes J., otros. El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática [internet]. Neurobiología revista electrónica 2013 [citado 18 Oct 2019]. Disponible en:
[https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/Locia-Espinoza4\(8\)300813.pdf](https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/Locia-Espinoza4(8)300813.pdf)
46. Reckelhoff J. Estrógenos: Mecanismos de acción de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular [internet]. MEDWAVE Revista biomédica Revisada por Pares 2001 [citado 18 Oct 2019]. Disponible en:
<https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Congresos/778>
47. Sabyasachi S. Fisiología humana: Hormonas Testiculares y ováricas. [internet]. Departamento de biofísica molecular y psicología. Facultad de medicina Chicago Illinois [citado 18 Oct 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=m->

z6CAAQBAJ&pg=PT1429&dq=estrona+fisiologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi8rvmC
nvTjAhXJx1kKHAT3AigQ6AEILzAB#v=onepage&q=estrona%20fisiologia&f=false

48. Noriega-Reyes M, Langley McCarron E. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario [internet]. Departamento Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas [citado 18 Oct 2019]. Disponible en: <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1215566910.pdf>

49. Sánchez Suárez P, Benítez-Bribiesca L. Receptores estrogénicos alfa y beta en cáncer de mama [internet]. Acta Médica Grupo Ángeles Volumen 1, No. 3, julio-septiembre 2003 [citado 26 Oct 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2003/am033g.pdf>

50. Locia Espinoza J., Soto Cid A., Manzo Denes J., Hernandez Aguilar M. Receptores a estrógenos α y β en células normales y cancerígenas [internet]. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruziana Vol XX1 N° 1 [citado 18 Oct 2019]. Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol21num1/articulos/receptores/index.html>

51. Márquez D. Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina [internet]. Universidad de California, Los Angeles. Escuela de Medicina. Departamento de Medicina, División de Hematología y Oncología [citado 24 Oct 2019]. Disponible en: https://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3012.pdf

52. Muriac Sauri. Distribución neuroanatómica de los receptores estrogénicos en la lubina *Dicentrarchus Labrax*: implicaciones en la función reproductora y el comportamiento alimenticio control transcripcional de la hormona folículo estimulante [internet]. Tesis Doctoral Universidad Cardenal Herrera 2012. [citado 24 Oct 2019]. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/102039/4/receptores_estrogenos_Muriach.pdf

53. Björnström L1, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes [internet]. Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden. [cited 30 Oct 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695368>
54. ESCRIVÁ J., CARBAJAL J., MENDAÑA M. Farmacia Hospitalaria : Endocrinología [internet]. [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP05.pdf>
55. Aranzazu Taborda D., Rodríguez B., Duque Agudelo B. Disrupción endocrina en peces [internet]. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295023555015.pdf>
56. Valdebenito I. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión [internet]. Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola, CGNA. Arch. med. vet. v.40 n.2 Valdivia 2008 [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2008000200002
57. Thiviya Kanagasabesan. Molecular Characterization of the Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Ovarian Steroidogenic Pathway and Implications for Exogenous Estrogen Effects during Follicular Development [internet]. Thesis Submitted to the Department of Biology Faculty of Science, University of Waterloo, 2013. [cited 30 Oct 2019]. Available in: <https://pdfs.semanticscholar.org/0886/e4e53317ebe2749345269198e8a564f3140c.pdf>
58. Patino, Sullivan. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish [internet]. Fish Physiology and Biochemistry 26 (1):57-70.2002. [cited 30 Oct 2019]. Available in: https://www.researchgate.net/publication/226010363_Ovarian_follicle_growth_maturation_and_ovulation_in_teleost_fish

59. Takashima e Hibiya. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features [internet].1995.[cited 30 Oct 2019]. Available in: <https://www.worldcat.org/title/atlas-of-fish-histology-normal-and-pathological-features/oclc/844940233>
60. Valdebenito I, Paiva L , Berland M . Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión [internet].2011.[cited 30 Oct 2019]. Disponible en: http://mediorural.xunta.gal/fileadmin/arquivos/publicacions/pesca/Genetica_salmon_07_II.pdf
61. Moreno J. , Méndez C. , Meruane A.,Morales M.Descripción histológica y caracterización de los estados de madurez gonadal de hembras de *Cryphiops caementarius* [internet]2012.International Conference: “Environment and Resources of the South Pacific” .Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(3): 668-678.[citado 30 Oct 2019]. Disponible en:<https://scielo.conicyt.cl/pdf/lajar/v40nSpecIssue/art15.pdf>
62. Sifuentes I.Caracterización parcial de vitelogenina de *Chelonia mydas agassizii* y validación de un ensayo inmunoenzimático para su detección en plasma como potencial marcador de Xenoestrógenos [internet].2004. [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/374/1/sifuentes_i.pdf
63. Lee YM, Rhee JS, Hwang DS, Kim IC, Raisuddin S, Lee JS. P53 gene expression is modulated by endocrine disrupting chemicals in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* [internet]. Department of Chemistry, and the National Research Lab of Marine Molecular and Environmental Bioscience, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, South Korea.[cited 30 Oct 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950039>
64. Estrada E. Baltaza M.-Nacheva P.-Chavez G, otros.Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endocrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas [internet].Ingeniería, Investigación y Tecnología Vol 14, 2, Abr–Jun 2013, Pág 275-284. [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S140577431372242X>

65. Ramírez-Sánchez I., Martínez-Austria P., Quiroz-Alfaro M., Bandala E. Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente [internet]. Universidad de las Américas Puebla, México Tecnol. cienc. agua vol.6 no.5 Jiutepec sep./oct. 2015. [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000500003
66. Smith AG, Gangolli SD. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns [internet]. MRC Toxicology Unit, Hodgkin Building, University of Leicester, Lancaster Road, Food Chem Toxicol. 2002 Jun;40(6):767-79. [cited 12 Nov 2019]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983271>
67. RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Di(2-etilhexil) Ftalato [internet]. DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS de los EE.UU. [citado 12 Nov 2019]. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs9.pdf
68. Oropesa Jiménez A. disruptores endocrinos en el medio ambiente: caso del 17- α -etinil-estradiol [internet]. unidad de toxicología. dpto. de sanidad animal. facultad de veterinaria (uex) 2008. [citado 12 nov 2019]. Disponible en: <https://revistas.ucm.es/index.php/obmd/article/download/obmd0808110063a/21285>
69. Windsor F, Ormerod S, Tyler C. Endocrine disruption in aquatic systems: up-scaling research to address ecological consequences [internet]. Cambridge Philosophical Society, Biological. Reviews. (2018), 93, pp. 626–641. [Cited 12 nov 2019]. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/brv.12360>
70. Raimann X, Rodríguez L, Chávez P, Torrejón C. Mercurio en pescados y su importancia en la salud [internet]. Rev Med Chile 2014; 142: 1174-1180. [citado 12 nov 2019]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v142n9/art12.pdf>
71. Zero Mercury [internet]. Working Group c/o European Environmental Bureau 34, Boulevard de Waterloo B-1000, Brussels. [cited 12 nov 2019]. Available in: Belgium www.zeromercury.org

72. Evaluación de riesgo de mercurio en peces de aguas continentales en Colombia [internet]. REPÚBLICA DE COLOMBIA, MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD 2015. [citado 12 nov 2019]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/ER%20MERCURIO%20EN%20PECES.pdf>
73. Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia - PlaNDAS [internet]. Ministerio de agricultura y desarrollo rural 2014. [citado 12 nov 2019]. Disponible en: <https://www.aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf>.
74. Barreto Reyes C. Producción pesquera de la cuenca del Río Magdalena: desembarcos y estimación ecosistémica [internet]. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca 2017. [citado 12 nov 2019] disponible en: http://sepec.aunap.gov.co/archivos/aunap/produccion_pesquera-cuenca_del_rio_magdalena.pdf
75. Diagnóstico y Evaluación de la Calidad Ambiental Marina en el Caribe y Pacífico Colombiano [internet]. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives De Andrés. [citado 12 nov 2019]. disponible en: http://www.invemar.org.co/documents/10182/14479/Informe_REDCAM_2009.pdf
76. Herrera P. Análisis cualitativo del impacto ambiental por vertimiento de aguas residuales en el río Magdalena, caso aplicativo municipio de Girardot-Cundinamarca [internet]. UNIVERSIDAD PILOTO DE COLOMBIA SECCIONAL ALTO MAGDALENA. 2018. [citado 12 nov 2019] disponible en: <http://repository.unipiloto.edu.co/bitstream/handle/20.500.12277/5761/PAULO%20MONOGRAFIA%20UPC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

77. Aranzazu D, Rodríguez B., Duque V. Disrupción endocrina en peces. [internet]. Revista Colombiana de ciencias pecuarias. vol.25 no.2. [citado 12 nov 2019] disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902012000200015

78. Routledge J, Sumpter J. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen [internet]. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15, No. 3, pp. 241–248. [cited 12 nov 2019]. Available in: <https://scihub.tw/10.1002/etc.5620150303>