



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**CURE**  
Centro Universitario  
Regional del Este



**Implementación del Bioensayo YES en CURE-UdelaR para  
detectar sustancias estrogénicas y su aplicación en monitoreo  
ambiental: la cuenca del arroyo Maldonado como caso de  
estudio**

**Trabajo final para la obtención del Título de Magíster en Ciencias Biológicas**

**Autora: Lic. Isabel Alejandra Bertone González**

**Tutores: Dr Javier García- Alonso y PhD Pablo Inchausti**

**2024**

---

## Resumen

Muchas sustancias de origen antropogénico dispersadas en el ambiente pueden producir efectos nocivos a concentraciones muy bajas ( $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dependiendo de su estructura química y de las condiciones ambientales. Los disruptores endocrinos (EDCs) son un grupo heterogéneo de sustancias que pueden alterar las señales químicas internas de los organismos, comprometiendo de esta forma el normal funcionamiento endocrino, y eventualmente generar patologías, como enfermedades tiroideas, alteraciones en el sistema neurológico, enfermedades metabólicas, obesidad, enfermedades cardiovasculares, trastornos del sistema inmunológica, la capacidad reproductiva y el desarrollo sexual. Un gran grupo de EDCs alteran las señales estrogénicas, y se los conoce como xenoestrógenos. Abarcan químicos con diferentes estructuras, hormonas sintéticas y naturales, detergentes, formulaciones de pesticidas, plastificantes, entre otras. En Uruguay son escasos los estudios de actividad estrogénica y no existe un laboratorio que analice esta problemática ambiental con un método simple y sin emplear vertebrados. El objetivo de esta tesis fue implementar el bioensayo YES (Yeast Estrogen Screen) para detectar actividad estrogénica en el CURE-UdelaR, efectuar su validación con estándares de xenoestrógenos conocidos e integrar este bioensayo al monitoreo de calidad del Arroyo Maldonado. Se puso a punto un bioensayo para detectar actividad estrogénica basados en levaduras en el laboratorio del CURE, Sede Maldonado, y se analizó la estrogenicidad en agua y sedimento de 19 sitios de la cuenca del Maldonado. A su vez, fueron analizadas por HPLC para detectar y cuantificar Bisfenol A (BPA), etinilestradiol ( $\text{EE}_2$ ), estradiol ( $\text{E}_2$ ) y estriol ( $\text{E}_3$ ). El ensayo YES presentó una curva patrón sigmoideal en un rango de concentración entre 1.367 a 1400  $\text{ng.L}^{-1}$  de  $\text{E}_2$ . El límite de detección del método fue de 30  $\text{ng.L}^{-1}$ . La concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ) promedio para la curva patrón fue de  $69.04 \pm 39 \text{ ng.L}^{-1}$ .

---

Al validar el bioensayo YES con xenoestrógenos conocidos, se obtuvo valores similares a los publicados en literatura, con  $EC_{50}$  para EE2 fue  $27.85 \text{ ng. L}^{-1}$ , para BPA  $50.488 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , para Nonifenol (NP)  $255 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ . Al estudiar la estrogenicidad en muestras ambientales, se analizó si existían interferencias por la salinidad en extracciones con SPE de agua, no encontrándose variaciones en los resultados. Una vez que se ajustó el bioensayo YES, se realizaron muestreos de agua y sedimento a lo largo de la cuenca del Maldonado. Se seleccionaron 19 sitios a lo largo de la cuenca, donde se encontraron tres puntos con estrogenicidad detectable. Dos en agua ambos pertenecen a cañadas urbanas, y en sedimento fue aguas abajo de la descarga de los efluentes de la planta de tratamiento del saneamiento de la ciudad de San Carlos. Se detectaron xenoestrógenos (BPA, E2, EE2, E3) en sedimento en 9 de los sitios seleccionados. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de incluir bioensayos de estrogenicidad dado a que otorgan medidas rápidas, que al día de hoy no se incluyen en las normativas de monitoreo de calidad ambiental. Los xenoestrógenos pueden ser liberados de distintos tipos de usos de suelo y actividades antrópicas y presentan serios efectos subletales en la fauna asociada a sistemas acuáticos, como también para humanos.

**Palabras claves:** Bioensayos, Disruptores Endocrinos, Xeno-estrógenos, contaminación ambiental.

---

## Abstract

Many substances of anthropogenic origin dispersed in the environment can produce harmful effects at very low concentrations ( $\text{ng.L}^{-1}$  to  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) depending on their chemical structure and on environmental conditions. Endocrine disruptors (EDCs) are a heterogeneous group of substances that can alter the internal chemical signals of organisms, thus compromising normal endocrine functioning, such as pathologies of thyroid diseases, alterations in the neurological system, metabolic diseases, obesity, cardiovascular diseases, disorders of the immune system, reproductive capacity and sexual development. A large group of EDCs alter estrogenic signaling, and are known as xenoestrogens. They include chemicals with different structures, synthetic and natural hormones, detergents, pesticide formulations, plasticizers, among others. In Uruguay there are few studies of estrogenic activity and there is no laboratory capable of analyzing this environmental problem with a simple method and without using vertebrates. The objective of this thesis was to develop the YES (Yeast Estrogen Screen) bioassay to detect estrogenic activity in the CURE-UdelaR, to carry out its validation with known xenoestrogenic standards and integrate this bioassay to the quality monitoring of Arroyo Maldonado. The bioassay to detect estrogenic activity based on yeast was developed in the CURE laboratory, Maldonado Headquarters, and estrogenicity was analyzed in water and sediment from 19 sites in the Maldonado basin. In turn, ten sediment samples were analyzed by HPLC to detect and quantify Bisphenol A (BPA), ethinyl estradiol (EE2), estradiol (E2) and estriol (E3). The YES assay presented a sigmoidal standard curve as expected, in a concentration range between 1.367 to 1.400  $\text{ng.L}^{-1}$  of E2. The detection limit of the method was 30  $\text{ng.L}^{-1}$ . The average mean effective concentration (EC 50) for the standard curve was  $69.04 \pm 39 \text{ ng. L}^{-1}$

When validating the YES bioassay with known xenoestrogens, values similar to those published in the literature were obtained, with EC50 for EE2 being 27.85  $\text{ng. L}^{-1}$ , for BPA 50,488  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , for Noniphenol (NP) 255  $\mu\text{g. L}^{-1}$ . When studying estrogenicity in environmental samples, it was analyzed whether there were interferences due to salinity in SPE extractions of water, and no variations were found in the results.

---

Once the YES bioassay was adjusted, water and sediment samplings were performed throughout the Maldonado River basin. Out of the 19 sites selected across the basin, three points had detectable estrogenicity. Two of these points in water both belong to urban ravines, and that of sediment occurred downstream of the effluent discharge from the sanitation treatment plant of the city of San Carlos. Xenoestrogens (BPA, E2, EE2, E3) were detected in sediment at 9 of the selected sites. The results obtained highlight the need to include estrogenicity bioassays since they provide rapid measurements, which today are not included in environmental quality monitoring regulations. Xenoestrogens can be released from different types of land use and anthropogenic activities and present serious sublethal effects on fauna associated with aquatic systems, as well as for humans.

**Keywords:** Bioassays, Endocrine Disruptors, Xeno-estrogens, environmental pollution.

---

## Agradecimientos

A mis tutores de maestría Javier García-Alonso y Pablo Inchausti por los valiosos aportes. Quienes me han guiado, participado en los muestreos y en el procesamiento estadístico de los datos, y sobre todo han hecho posible el desarrollo de este trabajo.

A Giselle Gomes también de la UFRJ, quien analizó y aportó datos importantes para mi trabajo.

También agradecer a mis compañeros de laboratorio, Javier Fernández quien aportó datos importantes para el trabajo, a Winston Aparicio y Joaquín González quienes me han apoyado, con paciencia en muchas oportunidades, desde el trabajo en el laboratorio como en el procesamiento de los datos.

A mi familia, Fabián y mis dos hijos Isabella y Guillermo que me han acompañado en este proceso, pasando por los dos años de pandemia donde horas de zoom realizando cursos junto a ellos, como acompañándome fin de semanas a analizar datos.

Y finalmente al tribunal que hicieron grandes aportes para culminar mi trabajo de Tesis.

---

## INDICE

<b>Introducción general</b> .....	10
Señales estrogénicas en metazoo.....	11
<i>Receptores estrogénicos citoplasmáticos (vía genómica)</i> .....	14
<i>Receptores estrogénicos de membrana (vía no genómica)</i> .....	15
Disruptores endocrinos (EDCs).....	16
Sustancias químicas con actividad estrogénica en el ambiente.....	19
Efectos de los EDCs.....	20
<b>Capítulo 1: Puesta a punto del Bioensayo YES para detectar actividad estrogénica en el laboratorio de Bioensayos, CURE-Maldonado (UdelaR)</b> .....	23
Introducción.....	23
Detección de sustancias con actividad estrogénica.....	23
Objetivos.....	26
Hipótesis.....	26
<b>Metodología</b> .....	27
Preparación de soluciones y medio de análisis.....	27
Resucitación de la cepa YES <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
Crecimiento de la cepa.....	29
Ensayo YES.....	29

---

Análisis de los Datos.....	31
Optimización del ensayo YES vs concentración de CPRG .....	33
Interferencia por Salinidad.....	33
<b>Resultados</b> .....	34
Puesta a punto de la técnica YES.....	34
Ensayo YES.....	34
Curvas de Absorbancia vs concentración E2 a diferentes concentraciones de sustrato CPRG.....	35
Efectos de la salinidad en la determinación de estrogenicidad.....	37
Validación de bioensayo con estándares de xenoestrógenos.....	40
<b>Discusión</b> .....	41
<b>Capítulo 2: Estrogénicos y estrogenicidad en la cuenca del arroyo Maldonado</b> .....	43
<b>Introducción</b> .....	43
Cuenca del arroyo Maldonado.....	44
Monitoreo de estrogénicos en Uruguay.....	46
Objetivos generales.....	47
Objetivos específicos.....	47
Hipótesis.....	47
<b>Metodología</b> .....	48
Área estudio.....	48

---

VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS.....	52
Extracción estrogénicos de muestras ambientales.....	52
En muestras de la columna de agua.....	52
En muestras de sedimento.....	53
Análisis de los datos.....	55
Detección y cuantificación de estrogénicos naturales y sintéticos por HPLC.....	56
<b>Resultados</b> .....	57
VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS EN LA CUENCA DEL ARROYO MALDONADO.....	57
Determinación de actividad estrogénica en muestras ambientales.....	59
<b>Discusión</b> .....	63
Calidad del agua en la cuenca del arroyo Maldonado.....	63
Actividad estrogénica en la cuenca del arroyo Maldonado.....	64
Conclusiones .....	68
Consideraciones Finales.....	69
Bibliografía.....	71

---

## **Introducción general**

El agua, recurso indispensable para la vida, puede ser concebido como un sistema único, integrando los océanos, cuencas de agua dulce, atmosférica y subterránea. El agua dulce en particular es utilizada y sobreexplotada para consumo humano (potabilización), recreación, riego y como medio de eliminación de residuos líquidos, ocasionalmente sufriendo un importante deterioro en su calidad (Yang et al., 2021). Los contaminantes en el agua son responsables de casi el 40% de la morbilidad humana en todo el mundo (Machineni, 2019). La contaminación del agua provocada por las actividades humanas es una preocupación pública y un importante problema ecológico a escala mundial (Arnold et al., 2014). Durante siglos y décadas, toneladas de sustancias químicas de uso agrícola, industrial, médico, y domésticas, entre otros, han sido vertidos al medio acuático. Cada día se vierten al agua 2 millones de toneladas de líquidos residuales, desechos industriales y agrícolas al medio acuático (Sharma et al., 2017).

Dentro de los contaminantes inorgánicos y orgánicos, se encuentran los denominados “contaminantes emergentes” que suelen encontrarse en el ambiente a muy bajas concentraciones. Entre estos se encuentran plaguicidas, productos químicos industriales, farmacéuticos, compuestos de “estilo de vida” (por ejemplo, drogas ilícitas, cafeína, nicotina, etc.), aseo personal y otros (Gil et al., 2012). Estas sustancias se pueden encontrar en aguas superficiales y subterráneas, en el agua potable, generando riesgos para la salud humana y ambiental, y muchos pueden acumulándose en los sedimentos. Dentro de estos químicos, encontramos a los disruptores endocrinos, en inglés Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), un grupo heterogéneo de sustancias que pueden alterar las señales químicas internas de los organismos.

Los EDCs afectan negativamente el normal funcionamiento del sistema endocrino, interfiriendo con la producción, transporte, señalización y eliminación de hormonas. Puede estar interfiriendo a distintos niveles de la cascada regulatoria que involucra el sistema nervioso central (ej. hipotálamo), glándula

---

hipofisaria (pituitaria) o diferentes órganos (ej. gónadas). Pueden afectar el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, necesaria para el desarrollo del cerebro, función y crecimiento y control del metabolismo energético, el hipotálamo-hipófisis-suprarrenal que controla muchos aspectos de nuestra respuesta al estrés, los ejes hipotálamo-hipófisis-ovario e hipotálamo-hipófisis-testículo, que controlan la reproducción y la pubertad (Gubbi et al., 2023). De esta manera se producen efectos adversos en las señales hormonales en individuos de muchas especies de vertebrados superiores.

### **Señales estrogénicas en metazoos**

Las hormonas son mensajeros químicos producidos por el cuerpo para transferir información de un grupo celular a otros y coordinar los procesos metabólicos de diferentes partes del cuerpo. Las hormonas esteroideas son compuestos lipídicos derivados del colesterol. Además, las hormonas controlan la determinación, diferenciación y desarrollo sexual en muchos animales, las respuestas de estrés, la retención de minerales, e incluso en el sistema nervioso central. Se pueden dividir principalmente en progestágenos, andrógenos y estrógenos (Singhal et al., 2009), siendo los estrógenos derivados de los andrógenos por la actividad de la enzima aromataasa y con 18 carbonos son las hormonas esteroideas más pequeñas.

Los estrógenos son principalmente producidos por los folículos en desarrollo en los ovarios, el cuerpo lúteo, córtex adrenal, cerebro, testículos, hígado y tejido óseo y adiposo (Dimogerontas & Liapi, 2014). En humanos, son producidas tanto en hombres como en mujeres, siendo en estas últimas en mayor cantidad (Hileman, 1994). Se encuentran en vertebrados e invertebrados, donde en vertebrados los estrógenos principales son estrona, estradiol y estriol. En la mayoría de especies de invertebrados, sus hormonas son ecdiestroides las cuales tienen una estructura similar a la del estrógeno de los vertebrados. No obstante, algunos taxones como moluscos y crustáceos tienen estradiol, y los equinodermos estradiol y estrona (Oehlmann et al., 2004; Lafont et al, 2007).

---

El estrógeno natural más potente es el  $17\beta$ -Estradiol (E2) que es el principal producto de liberación del ovario en el sistema circulatorio. Su síntesis se realiza por las células foliculares que rodean el ovocito, y presenta gran afinidad con los receptores de estrógeno (Houtamn, et al., 2011). Encontramos también los estrógenos sintéticos, como  $17\alpha$ -etinilestradiol y mestranol con aplicaciones en medicina e impactos notorios en el ambiental. En la figura 1, se presentan las estructuras químicas de estrógenos naturales y sintéticos.

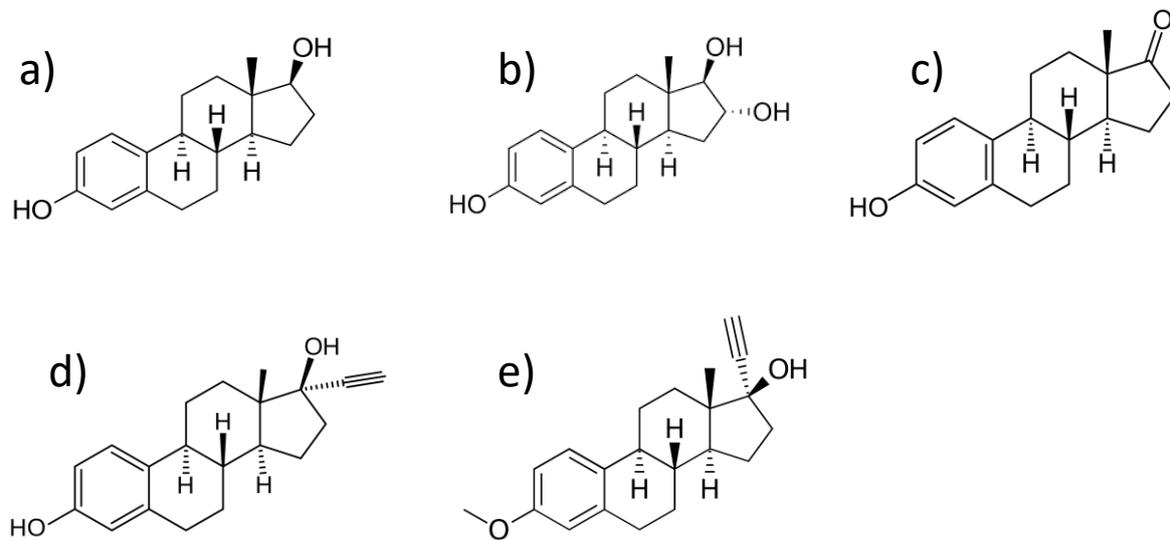


Figura 1. Estructura química de los principales estrógenos. a) Estradiol. b) Estriol, c) Estrona, d)  $17\alpha$ -etinil estradiol, EE2; e) mestranol. Donde a), b) y c) son estrógenos naturales y d) y e) son estrógenos sintéticos.

Los estrógenos inducen etapas claves en la ovogénesis y cumplen una función vital en la fisiología, estimulando el crecimiento y diferenciación de las células del tejido mamario, hígado, útero, vagina, testículo, epidídimo, próstata, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen et al., 2000; Noriega et al., 2008). Estos compuestos también presentan efectos sobre tejido cardiovascular, óseo y nervioso (Malgor y Valsecia 2000; Lira et al, 2022), participan en el metabolismo de lípidos y síntesis de proteínas (Kiyama et al, 2015).

---

La respuesta específica de la acción estrogénica depende de la presencia de receptores estrogénicos de membrana y citoplasmáticos (ER, por sus siglas del inglés Estrogen Receptor). Los estrógenos ejercen sus funciones cuando se unen a estos receptores. Los ERs estrogénicos son proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores citoplasmáticos, que incluye a otros receptores de hormonas esteroideas como el receptor de la Vitamina D, retinoides, hormonas tiroideas y algunos receptores huérfanos. Una vez unido al ligando dimerizan, y este complejo estrógeno-ER migran al núcleo y pasan a actuar como factores de transcripción activando directamente los promotores de los genes diana mediante la unión de elementos de respuesta estrogénica (ERE), o indirectamente a través de interacciones con otros factores de transcripción (Hall et al., 2001).

Hay muchos receptores estrogénicos citoplasmáticos/nucleares en vertebrados e invertebrados (Amyoghe et al., 2020; Keay et al., 2006). Encontramos variantes (isoformas) de la misma proteína; la alfa y la beta ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , respectivamente), estas isoformas son muy similares entre sí, comparten un alto grado de similitud de secuencia, y dominios de unión al ligando (Xia et al, 2000; Kuiper, 1996), sin embargo, poseen diferentes funciones según el tejido donde ejerzan su acción, también se ha identificado un tercer subtipo de ER en peces teleosteos, denominado gamma ( $ER\gamma$ ) (Amenyogbe et al, 2020).

Los receptores de estrógeno se expresan en varios tejidos que incluyen ciertas secciones del cerebro, huesos, glándulas suprarrenales, glándulas de mamíferos, epidídimo y tiroides, también vasos sanguíneos, corazón (Osborne, 1998; Xia et al., 2000; Matthews y Gustafsson, 2003; Lira et al., 2022). La diversidad de sitios donde se encuentra involucrada la acción de los estrógenos, nos muestra la complejidad fisiológica que presenta, además de que existen receptores localizados en la membrana que también median funciones de estas hormonas, lo que determinan la existencia de dos vías principales de estrogénicidad: la genómica y la no genómica.

---

### *Receptores estrogénicos citoplasmáticos (vía genómica)*

Los receptores estrogénicos (ER) luego de unirse a la hormona, dimerizan y pasan a ser factores de transcripción que se unen a sitios específicos de respuesta estrogénicas (ERE) y regular la expresión de genes. Su actividad a su vez, está regulada por co-represores y co-activadores en sitios específicos aparte de los dominios de unión al ligando y el de unión al ADN. Los efectos moduladores de los ER sobre la transcripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos. Al unirse los ER con los estrógenos, éstos desencadenan cambios en la forma del receptor que consisten en la disociación de un complejo correpresor del ER y la unión de éste con un complejo coactivador. Estos últimos son moléculas que al interactuar con el receptor le confieren la actividad de transcripción, resultando en la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos (ERE, Figura 2). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los ER se asocian con los correpresores que inhiben la actividad de transcripción (Pérez et al., 2005).

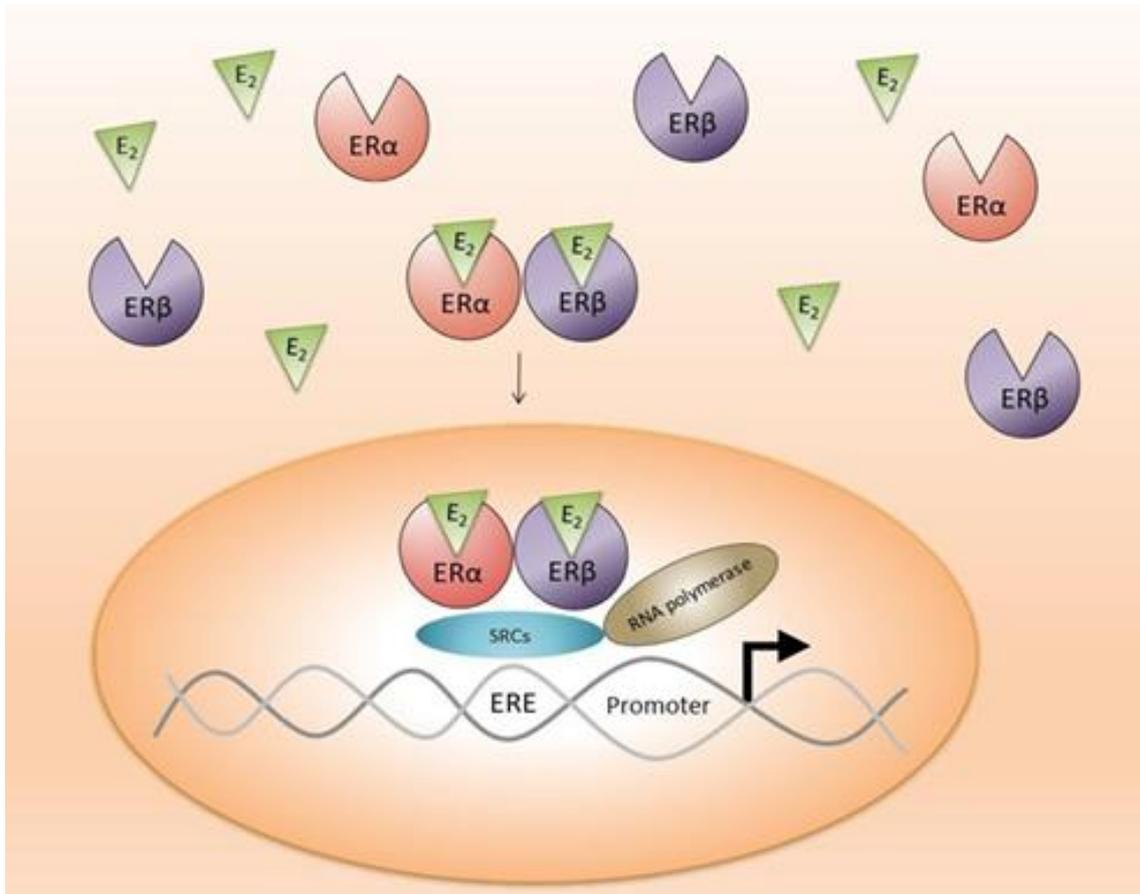


Figura 2. Mecanismo de acción de los receptores de estrógenos citoplasmáticos (Vía Genómica o clásica)  
 La hormona 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) se une al receptor nuclear ERα o ERβ y, después de la dimerización y translocación al núcleo, el complejo del receptor nuclear se une a una secuencia específica de ADN conocida como elemento de respuesta al estrógeno (ERE). El complejo ADN-receptor nuclear, a su vez, recluta coactivadores SRCs (receptores coactivadores esteroideos) que activan la transcripción de los genes diana (Ramírez et al., 2021).

### *Receptores estrogénicos de membrana (vía no genómica)*

Son procesos que se dan rápidamente, no requieren la transcripción ni la síntesis de proteínas para producir un efecto, mediados por receptores localizados en membrana acoplado a cinasas o segundos mensajeros citoplasmáticos (AMPcíclico), calcio y óxido nítrico. Esta vía estrogénica no genómica se

ha observado en diferentes tejidos celulares (Moggos et al., 2001). Dentro de los procesos de acción rápida encontramos la apertura de canales iónicos, la despolarización de la membrana y la activación de sustancias como las cinasas tirosincinasa, proteincinasa A (PKA), proteincinasa C (PKC), ERK (extracellular signal-regulated kinase) y proteínas G (Fig.3).

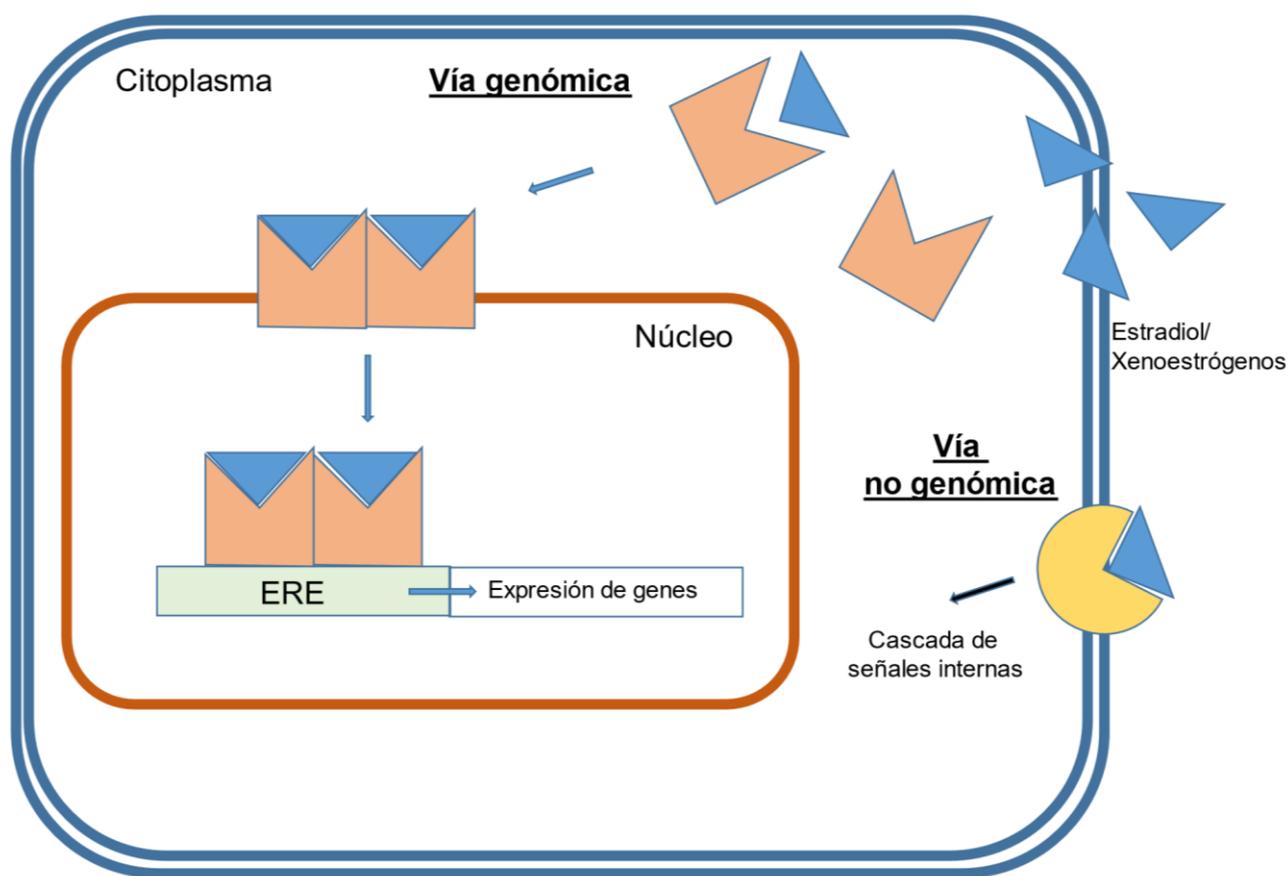


Figura 3. Mecanismos de señalización estrogénica. Vía genómica y no genómica: el ligando Estradiol /Xenoestrógenos se puede unir al receptor de estrógeno; tras su activación, el receptor promueve la cascada de señales internas implicadas en diferentes respuestas celulares que ocurren en cuestión de segundos o minutos. (Imagen tomada y modificada de Liria et al, 2022).

---

## **Disruptores Endocrinos (EDCs)**

Los disruptores endocrinos son un grupo heterogéneo de sustancias que se encuentran en el medio ambiente, alimentos y productos de consumo y que pueden alterar las señales químicas internas de los organismos, comprometiendo el normal funcionamiento endócrino. Los EDCs pueden alterar la capacidad reproductiva y el desarrollo sexual, desarrollo de cáncer de mama, el cáncer de próstata, alteraciones neuroendocrinología, de la tiroides, el metabolismo y la obesidad, y la endocrinología cardiovascular, tanto, en invertebrados, peces, anfibios, mamíferos acuáticos y semi acuáticos y el hombre (Marlatt et al, 2022). En la literatura se puede encontrar diferentes definiciones de los EDCs, entre ellas la proporcionada por la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA): “*Cualquier agente exógeno que interfiera con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de una hormona natural responsable de la manutención, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos*” (EPA, 1997). Otra definición de EDCs, que complementa la anterior, es la proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (WHO): “sustancia o mezcla exógena que altera las funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, causa efectos adversos para la salud en un organismo intacto, o su progeñie, o (sub)poblaciones” (Damstra et al., 2008).

Los EDCs agrupan a químicos de distintas naturalezas, y se encuentran en formulaciones de agroquímicos, fármacos (e.g. pastillas anticonceptivas), plastificantes, detergentes, resinas, entre otros (Scaglia et al., 2009; Esteban et al. 2014). La acción de los EDCs es variada, ya que pueden imitar la acción de hormonas naturales, bloquear receptores, alterar la secreción o el metabolismo, modificando los receptores hormonales o interfiriendo en otros sistemas de señalización relacionados con el sistema endócrino como el sistema inmune o el nervioso (Porcher et al., 2009). Estos compuestos han demostrado generar altos impactos en los distintos niveles de organización biológica (Kidd et al., 2007; Zhou, Cai & Zhu, 2010 ; Wang & Zhou, 2013), y también tener efectos sobre la salud humana (Kabir et al., 2015 ). Sus efectos pueden alterar la función biológica en los organismos en concentraciones

---

ambientalmente relevantes, siendo una potencial amenaza para la biodiversidad acuática (Windosr et al., 2018; Marlatt et al., 2022).

Algunos de los efectos observados por lo EDCs incluyen reducción de la fertilidad, feminización, anomalías en los órganos reproductivos y cambios en el comportamiento sexual de diversos organismos acuáticos (algas, organismos bentónicos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) (Pal et al., 2010; Marlatt et al 2022), también se han observado cambios en el metabolismo de los esteroides sexuales, impactos en la etapa gonadal y masculinización en hembras (Salgado 2008; Ankley et al., 2018).

Los seres humanos nos encontramos expuestos a EDCs a través del entorno laboral, alimentación y ambiental (Metclalfe et al., 2022a). Se han realizado estudios que muestran la relación de los EDCs estrogénicos con el desarrollo y proliferación de ciertos cánceres, como el de próstata, testículo y mama (Kabir et al., 2015, Arias et al., 2020). Uno de los factores de riesgo ambiental es la exposición a aguas residuales de humanos, aumentando la incidencia en el cáncer de mama (Du Plessis et al., 2023). Además, la exposición fetal a los EDC puede dar lugar a alteraciones permanentes en la función reproductiva y neurológica, así como en la incidencia de obesidad (Marconetto et al., 2022; Arias et al., 2020; Kurşunoğlu et al., 2022). Con respecto a la obesidad, algunos EDCs actúan como obesógenos, i.e. promueven el aumento de peso y la obesidad al aumentar la cantidad de adipocitos y el almacenamiento de grasa en los adipocitos existentes, cambiar el balance de energía y, finalmente, regular el apetito y la saciedad. Además del efecto obesogénico, los EDCs pueden causar diabetes mellitus del tipo 2 (DM2) a través de la alteración en la función y morfología de las células  $\beta$  y la resistencia a la insulina (Kurşunoğlu et al., 2022).

Los efectos de los EDCs sobre la salud humana han conllevado a la necesidad de cuantificar y regular concentraciones de sustancias que actúen como EDCs en el medio ambiente. En la Unión Europea existen reglamentaciones generales y normativas nacionales de cada país (Reglamento UE 2018/605 De la Comisión, anexo II del Reglamento (CE) n°528/2002 y n° 1107/2009) que establecen los criterios para etiquetar una sustancia como “EDC” y propone estrategias de prueba escalonadas. Otros programas que

---

abordan la detección de EDCs son los de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), así como la gestión de productos químicos (CMP) en Canadá (Martyniuk et al., 2022). Si bien hay un marcado interés por el estudio de los EDCs en los países desarrollados, en Sur América hay una gran deficiencia de acciones propias con respecto al uso de los EDCs, particularmente en el Uruguay no hay ninguna reglamentación sobre los EDCs.

### **Sustancias químicas con actividad estrogénica en el ambiente**

Dentro de los EDCs, los xenoestrógenos actúan como hormonas naturales (estradiol), alteran el sistema de esteroidogénesis o poseen actividad antiestrogénica. Abarcan un rango amplio de sustancias, compuestos químicos y hormonas (naturales y sintéticas). Los xenoestrógenos detectados en el ambiente, se liberan por actividad industrial, doméstica, minera y agropecuaria (Scaglia et al., 2009; Esteban et al. 2014). Los químicos pueden encontrarse en formulaciones de biocidas (herbicidas, insecticidas, etc), dioxinas, bifenilos policlorados (PBCs), alquifenoles polietoxilados, hidrocarburos aromáticos, policíclicos (PAHs), bisfenoles (A, F y S), ftalatos, estrógenos sintéticos como el dietilestilbestrol (DES), el 17alfa-etinilestradiol (EE2), mestranol, entre otros (Carpenter, 2013). También se pueden encontrar estrógenos naturales y sus conjugados, siendo muchos de estos compuestos lipofílicos, por lo cual se acumulan en sedimentos y tejido adiposo (Wang et al., 2011; García-Alonso, et al 2011). Los herbicidas basados en glifosato han demostrado presentar efectos estrogénicos sumados a genisteína y el daidzein (fitoestrógeno presente en la soja), implicando que el uso de soja transgénica contaminada con herbicidas basados en glifosato en suplementos alimenticios puede suponer un riesgo de exposición a la estrogenicidad en animales (Mesnage et al., 2017; Muñoz et al., 2021). También se ha demostrado que los herbicidas basados en glifosato tienen una clara influencia en la producción de hormonas esteroides, al interferir con la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis (Richard et al., 2005; Gasnier et al., 2009). Los compuestos alquilfenólicos, como el nonilfenol (NP) y

---

el octilfenol (OP) presentan actividad estrogénica, son tensioactivos no iónicos que se usan en la producción de pinturas, textiles y papel, así como detergentes, emulsionantes en plaguicidas, agentes humectantes, dispersantes y solubilizantes (Acir et al., 2018), así como el bisfenol A (BPA) que se utiliza en la producción de plásticos policarbonatos, PVC, resinas, papeles de impresión térmica, entre otros. Existe un amplio grupo de xenoestrógenos que pueden ingresar al medio acuático, donde los organismos están expuestos a diversos cócteles químicos, los cuales pueden presentar efectos aditivos o sinérgicos (Norris y Carr, 2006; Marlatt et al., 2022). El efecto de los xenoestrógenos no depende solo de la concentración, existen otros factores propios y ambientales como la hidrofobicidad, persistencia, bioacumulación, tiempo de exposición y el mecanismo de biotransformación. Estos compuestos al ingresar al medio acuático, se particionan entre las fases de sedimento y agua (Baker et al, 1991; Zhu et al., 2008).

### **Efectos de los EDCs**

En el caso de metazoos, se han reportado interferencias en los sistemas endócrinos de invertebrados, peces, anfibios, aves y mamíferos (Wojnarowski et al., 2021). Algunos de los efectos observados en invertebrados están relacionados con la tasa de eclosión, el tamaño corporal, la capacidad de muda, el comportamiento reproductivo y el número de huevos en la puesta (Wojnarowski et al., 2021), incluso se ha explotado las interferencias en sistema endócrino de insectos para el desarrollo de insecticidas. En peces, se ha observado el hermafroditismo, cambios en comportamiento territorial, problemas en sistema inmune, en anfibios cambios de comportamiento (cambios en sonido de apareamiento), así como cambios fisiológicos, alteraciones en la ontogénesis en sus distintas etapas del desarrollo, en reptiles alteraciones óseas como también desarrollo de órganos sexuales deformes (Norris y Carr 2006; Wojnarowski et al., 2021; Marlatt et al., 2022).

---

Algunos de los efectos sobre la salud humana por exposición a EDCs, se relacionan con daños en el sistema reproductor, disminución de la fertilidad (Marlatt et al., 2022, Papalouand et al, 2023), la inducción de tumores como cáncer mama (Manisha Du et al., 2023) y próstata (Du Plessis et al., 2023), las patologías de las enfermedades tiroideas (He et al., 2024), las alteraciones en el sistema neurológico, las enfermedades metabólicas, obesidad, enfermedades cardiovasculares, y los trastornos del sistema inmunológico (Gore et al., 2015, Arias et al 2020).

Los tratamientos para eliminar los en las plantas de tratamiento de agua son muy costosos. En general, las plantas de tratamiento de agua se enfocan en los nutrientes y patógenos, contando con reactores anaeróbicos, floculación-sedimentación, esterilización con UV y cloración que no son capaces de eliminar a contaminantes como los EDC (Westerhoff et al., 2005; Gibs et al., 2007; Kim et al., 2007; Schenck et al., 2012).

Algunos de los EDCs que son liberados al medio ambiente son estrogénicos. Esto significa que activan una señal estrogénica, actuando tanto en las vías de biosíntesis en la esteroidogénesis (e.g. induciendo la expresión de la aromatasa), o actúan como la hormona  $17\beta$ -Hidroxi-estradiol (E2) que se encuentra presente y conservada en los metazoarios. Estas acciones disparan procesos estrogénicos en su mayoría asociados a las hembras de vertebrados. No obstante, hay procesos metabólicos que pueden ser alterados por los EDCs actuando en diversos órganos y tejidos, generando alteraciones como por ejemplo en el hígado, sistema nervioso central, huesos, e incluyendo la proliferación de carcinomas dependientes de estrogénicos (Arias et al., 2020)

Hay una preocupación creciente con respecto a los riesgos de EDCs, y prueba de ello son los esfuerzos para avanzar en estudios de metodologías de evaluación y monitoreo que están en marcha en varios países (Barton-Maclaren et al., 2022). Los EDCs se han detectado por medio de bioensayos de respuesta tanto en el agua como sedimento de los ecosistemas acuáticos (Kolle et al., 2010; Gorba et al., 2015;

---

Wieczerzak et al., 2016; Nascimento et al., 2018; Griffero et al., 2018; Yu et al., 2019; Saggiaro et al., 2019; Chaves et al., 2020; Argolo et al., 2021; Argolo et al., 2023).

Si bien los sistemas endocrinos están muy conservados en la evolución, las señales endocrinas son muy variadas dentro de los metazoos (Oetken et al., 2004). No obstante, el conocimiento básico acerca de estos últimos principalmente proviene de especies de vertebrados desconociéndose muchos compuestos químicos que potencialmente puede afectar a un amplio rango de especies animales. En algunos invertebrados como los moluscos, por ejemplo, el pulpo *Octopus vulgaris*, y las ostras (*Crassostrea gigas*), la síntesis de vitelogenina (precursor del vitelo en los ovocitos de especies ovíparas) es inducida por el estradiol (Oetken et al., 2004; Matozzo et al., 2008). Lo mismo se ha observado en anélidos poliquetos donde el estradiol y sus receptores se encuentran involucrados en la reproducción y en el desarrollo (García-Alonso y Rebscher 2005; García-Alonso et al., 2006; Lidke et al. 2014), indicando que EDCs con actividad estrogénica afectan a organismos no vertebrados, como el caso de los alquifénoles y su efecto sobre la reproducción en poliquetos nereididos (García-Alonso et al. 2011).

En el caso de los vertebrados, como ser varias especies de peces teleósteos se observó los efectos de EDCs, principalmente de estrogénicos, afectando las condiciones reproductivas como la inhibición de la gametogénesis, el desarrollo de gónadas intersexuales, los cambios en el índice gonadosomático, los cambios de los esteroides sexuales, disminución de la fertilidad y cambios en las vías epigenéticas que inducen mecanismos específicos de toxicidad y /o respuestas celulares que pueden afectar la generación de la línea germinal (Carnevali et al., 2018; Delbes et al., 2022). Incluso la concatenación de causa-efecto en distintos niveles de organización biológica por exposición subletal a un xenoestrógeno ha sido puesta en evidencia en poblaciones de peces anuales en lagos de Canadá (Kidd et al., 2007), llegándose a observar extinciones locales de las poblaciones por inhibición en la fecundidad a lo largo de varias generaciones

---

El monitoreo ambiental de EDCs en cuerpos de agua para uso recreativo, consumo o riego es imprescindible para su una correcta gestión y manejo sustentable. Sin embargo, hoy en día muy pocos países y monitorean EDCs en sistemas acuáticos (Barton et al., 2022). Es por ello que es importante desarrollar herramientas no invasivas de bajo costo, rápidas que permitan detectar la presencia de respuestas tóxicas en el ambiente, tales como los bioensayos basados en levaduras, aportan información relevante para determinar la calidad de los cuerpos de agua.

El objetivo general de esta tesis fue poner a punto el bioensayo YES en el laboratorio de bioensayos en CURE sede Maldonado y su aplicación en un monitoreo piloto de la cuenca del arroyo Maldonado.

## **Capítulo 1: Puesta a punto del Bioensayo YES para detectar actividad estrogénica en el laboratorio de Bioensayos, CURE-Maldonado (UdelaR)**

### **Introducción**

#### **Detección de sustancias con actividad estrogénica**

Existen al día de hoy herramientas que detectan concentraciones de EDCs en aguas residuales, superficiales, así como en sedimento. Las mayores concentraciones de EDCs han sido detectadas en sedimento y en aguas residuales, y las menores en el aire y en aguas de bebidas (Benfenati et al., 2003; Petrovic et al., 2004).

Es importante que la metodología de detección de estrogénicos sea sensible, ya que los efectos biológicos subletales de los EDCs ocurren a muy bajas concentraciones. Son diversos los enfoques que se realizan en los diferentes grupos de investigación, pudiendo abordar la determinación de los componentes por procedimientos analíticos como la cromatografía, o la evaluación de la actividad estrogénica mediante ensayos biológicos *in vivo* e *in vitro*.

---

Las técnicas cromatográficas pueden determinar concentraciones de determinados compuestos específicos previamente seleccionados. Algunas de estas técnicas son Cromatografía líquida de alta eficiencia de detección por fluorescencia (HPLC-FLD, Fan et al., 2005), Cromatografía de Gas/Espectrometría de masa (GC/MS) (Hernando et al., 2004), Cromatografía de gases- Espectrometría de masas/Espectrometría de masas (GC-MS/MS) (Huang and Sedak 2001), Cromatografía líquida- Espectrometría de masa (LC- MS (Petrovic and Barceló, 2000) y Cromatografía líquida- Espectrometría de masa / Espectrometría de masa (LC-MS/MS) (Benijts et al., 2004). Estas técnicas presentan alta sensibilidad y precisión, pero son costosas y requieren mucho tiempo y reactivos, especialmente si se trata de mezclas de compuestos, y los analitos deben estar previamente identificados.

Los ensayos biológicos son utilizados para detectar y monitorear la actividad estrogénica generada por la presencia de disruptores endocrinos. En estos ensayos, los organismos se exponen a la acción de EDCs ya sea en el laboratorio o en el ambiente. El efecto de los EDCs sobre organismos multicelulares se realiza midiendo efectos característicos ya sea sobre la anatomía (ejemplo: cambios en las gónadas), o midiendo los niveles atípicos de la expresión de proteínas. Dentro de estos ensayos encontramos los que utilizan la inducción de la expresión y/o síntesis de vitelogenina (Vg) en cultivos primarios de hepatocitos de peces machos *Oncorhynchus mykiss*, que es usado como un biomarcador temprano de feminización (Flouriot et al., 1995; Mattsson et al., 2011; Yan et al., 2012). Es de señalar que este tipo de métodos requieren el sacrificio de animales vertebrados (e.g. peces), para realizar las mediciones, suelen ser complejas, y con altos costos operativos.

Uno de los ensayos ampliamente utilizado es el bioensayo “*Yeast Estrogen Screen*” (YES). Esta metodología utilizada para la determinación de la actividad estrogénica fue desarrollada por Routledge y Sumpter (1996) con adaptaciones de Bila (2005). El ensayo utiliza una cepa recombinante de *S. cerevisiae* que contiene un receptor estrogénico (hER) en el genoma de la levadura y un gen reportero a nivel plasmídico (Lac-Z), que codifican para la síntesis de la enzima  $\beta$ -galactosidasa gracias a la presencia del promotor transcripcional o elemento de respuesta estrogénico (ERE) acoplado. El

bioensayo detecta el compuesto con actividad estrogénica. Cuando éste se une al receptor hormonal, se convierte en receptor activo (dímero) que estimulan al activador transcripcional (ERE) para que se exprese el gen reportero, quien induce la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima es liberada al medio cultivo y actúa sobre un sustrato cromogénico, ya sea el cloro rojo  $\beta$ -D galactopiranosido (CPRG) o el o-nitrofenil  $\beta$ -D galactopiranosido (ONGP), que producen galactosa y clorofenol rojo o el o-nitrofenol, respectivamente (Keel et al., 2010). Para los ensayos se utilizó el CPRG. En el medio se produce un cambio de color, de amarillo a rojo/fucsia que se detecta mediante la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm (Fig.4).

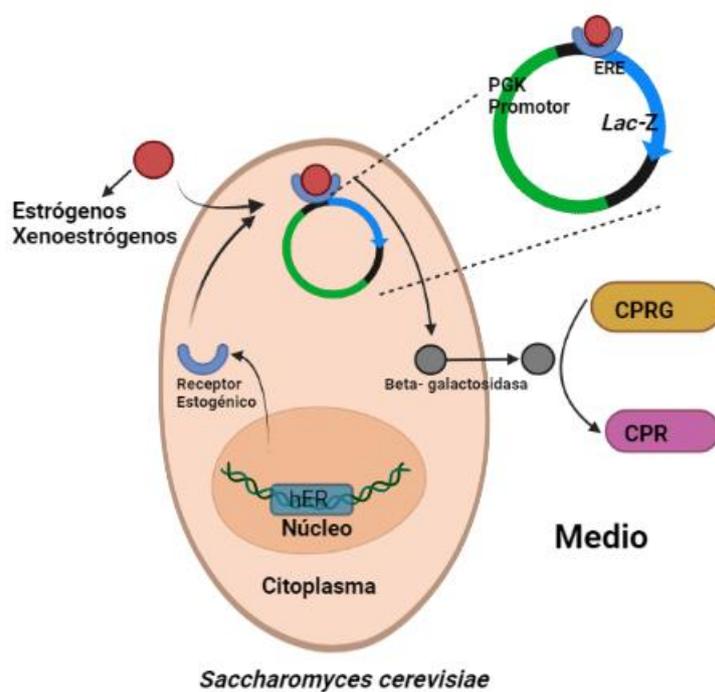


Figura 4. Representación esquemática del principio de acción del ensayo YES utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

Los bioensayos pueden usarse como herramientas de detección que inician un análisis químico en caso de resultados positivos, o pueden usarse cuando los métodos químicos de rutina no alcanzan los límites de detección requeridos (Kunk et al., 2015).

---

La selección de un bioensayo para la evaluación de los EDCs que el mismo pueda: (1) predecir los efectos desencadenados en los organismos expuestos, así como proporcionar herramientas efectivas para comprender los mecanismos de acción involucrados; (2) usarse fácilmente para monitorear los EDCs a gran escala; (3) tener reproducibilidad, repetibilidad y sensibilidad respecto a las matrices ambientales ( Hecker y Hollert, 2011).

El ensayo YES cumple con los tres requisitos mencionados anteriormente, y presenta un mecanismo de acción específico que permite cuantificar la actividad estrogénica a bajas concentraciones, permitiendo el análisis de xenoestrógenos con acción genómica (Routledge and Sumpter, 1996; Khetan, 2014). Además de las características mencionadas, este ensayo permite cuantificar la actividad estrogénica total, incluyendo sus componentes aditivos y sinérgicos (Ramírez et al., 2014; Yu et al. , 2019) . El ensayo YES ha sido empleado para la evaluación de compuestos individuales, mezclas y muestras ambientales (Kolle et al., 2010; Wiczerzak et al., 2016 ; Griffero et al., 2018; Saggiaro et al., 2019 ; Yu et al., 2019; Chaves et al., 2020 ; Argolo et al., 2021 , Argolo et al., 2023) . Además, se ha utilizado para la determinación de la actividad estrogénica en muestras de 17-alfa- etinilestradiol empleado hidrogeles activos tratados con lacasas de *Dichostereum sordulentm* (Vázquez et al., 2023).

## **Objetivos**

El objetivo general de este capítulo es la puesta a punto del bioensayo YES en el CURE Maldonado. Los objetivos específicos son evaluar el desempeño del ensayo YES; comparar las diferentes concentraciones de sustrato (CPRG); y determinar si la salinidad de la matriz acuosa ambiental interfiere en el ensayo, y validar con estándares de xenoestrógeno (BPA, EE2 y Nonilfenol).

## **Hipótesis**

*Hipótesis 1:* Las curvas de estrogénicidad en el Ensayo YES se ajustarán de manera diferencial de acuerdo a las concentraciones relativas de los reactivos.

---

*Predicción 1:* El aumento de las concentraciones del sustrato (CPRG) generarán un aumento en la intensidad del color hasta alcanzar un óptimo.

*Hipótesis 2:* La salinidad de las muestras acuosas puede afectar la extracción de estrogénicos.

*Predicción 2:* El aumento de las concentraciones de sal en la columna de agua interfiere en el porcentaje de recuperación de los compuestos estrogénicos.

## **Metodología**

### **Preparación de soluciones y medios de análisis**

Todas las soluciones se preparan siguiendo el siguiente protocolo en cámara de flujo laminar. Para el Medio Mínimo: se utilizaron 1 L de agua ultra pura; 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4,2 g de KOH; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 1ml de solución de  $\text{Fe}_2(\text{SO})_4$ (40 mg/50 ml de agua ultra pura); 50 mg de L-leucina; 50 mg de L-histidina; 50 mg adenina; 20 mg de L-arginina, 20 mg de L-metionina; 30 mg de L-tirosina; 30 mg de L-isoleucina; 30 mg de L-lisina-HCl; 25 mg de L-fenilalanina; 100 mg de ácido glutámico; 150 mg de L-valina y 375 mg de L-serina. Se almaceno la solución en tubos de 50 ml y luego el medio se esterilizó autoclavando a 121°C durante 20 min. Para la solución de vitaminas, se tomaron 180 ml de agua ultra pura y se añadieron 8 mg de tiamina; 8 mg de piridoxina; 8 mg de pantetonato de calcio; 40 mg de inositol y 20 ml de solución de biotina (2 mg/100 ml de agua ultra pura). La solución se esterilizó utilizando filtros de membrana de 0,2 micras y se almacenó a 4°C en alícuotas de 10 mL. La solución de glucosa al 20% (w/v) se preparó con 20 g de glucosa en 100 ml de agua ultra pura, se autoclavó a 121°C durante 10 min y se almacenó a temperatura ambiente. Se preparó una solución de L-aspártico a una concentración de 4 mg/mL con agua ultra pura, que fue autoclavada a 121°C durante 10 min y almacenada a temperatura ambiente. La solución de L-treonina se partió de una solución madre de una concentración de 24 mg/mL con agua ultra pura y fue autoclavada a 121°C durante 10 min y se

---

almacenó a 4°C. La solución de sulfato de cobre (II) de 20mM se preparó con 0,5 g de sulfato de cobre en 100 ml de agua ultra pura. Esta última solución se esterilizó utilizando filtros de membrana de 0,2 µm y se almacenó a temperatura ambiente. Por último, la preparación del sustrato (Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside, CPRG) a concentración de 10 mg/ml se preparó el mismo día del ensayo usando agua ultra pura en un frasco color ámbar previamente lavado con etanol y acetona y cubierto con papel de aluminio.

Medio de cultivo completo YES: Esta solución se preparó en cámara de flujo laminar con 5 mL de solución de glucosa; 1.25 mL de solución de ácido L-aspártico; 0,5 ml de solución de vitaminas; 0.4 ml de solución de L-treonina; 125µL de solución de sulfato de cobre (II) y 45 mL de medio mínimo. La solución se almacenó en frasco de vidrio estéril, a temperatura ambiente y se utilizó en un plazo dos semanas.

Medio de análisis: En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 25 mL de medio de cultivo completo YES, 250 µL de CPRG y 25 µL de cultivo de levadura (crecimiento no mayor a 48 hs, una concentración de 10<sup>6</sup>/mL). La concentración de levaduras y la relación con la absorbancia se estimó cuantificando en una primera instancia el número de levaduras por mL en una cámara Neubauer bajo microscopía lumínica.

### **Resucitación de la cepa YES de *Saccharomyces cerevisiae***

La proliferación celular mediante se realizó, este procedimiento se realiza en cámara de flujo laminar con la adición de 100 µL de cultivo de levadura cepa recombinante de *S. cerevisiae* (donada por Eduard Routledge, Brunel University, UK) obtenida de una cepa conservada a -80°C (cultivo YES con glicerol). Se extrajeron 100 µL de cultivo YES del fondo del tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, evitando pipetear glicerol que se encuentra en la superficie del tubo, y se colocaron en un Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de medio de cultivo YES completo. El cultivo se incubó a 28°C con una agitación de 100 rpm en

---

orbital modelo Bisan OS-20. Luego de transcurridas las 48hs, se extrajo una alícuota de 100  $\mu$ L del cultivo previamente obtenido, en un Erlenmeyer se colocó 25 mL de medio completo YES y se incubó a 28°C durante 48hs con agitación 100 rpm. Este inóculo se guardó en heladera a 4°C. Este inóculo presentó una densidad óptica entre 0.8 y 1, que representa una concentración de  $3,7 \cdot 10^7$  células/mL.

### **Crecimiento de la cepa**

Previo a realizar los bioensayos, nos aseguramos que la levadura se encontraba en máxima actividad metabólica. Para esto se realiza un primer crecimiento, donde se inoculan 100 $\mu$ l de cultivo YES y 25 ml de medio completo, luego de transcurridas las 48hs de inoculación, volvemos a realizar otro crecimiento en idénticas condiciones. Luego de obtenido este inóculo se guarda en heladera a 4°C para luego poder ser utilizado en el ensayo.

### **Ensayo YES**

El ensayo se basó según el protocolo de Roughtledge y Sumpter (1996). Para cada ensayo YES se realizó una curva estándar con E2 (MW: 272.38 Steraloids, E0950-000) como compuesto de referencia. Se preparó una solución madre de 28 $\mu$ g. L<sup>-1</sup> de E2 en etanol absoluto ppa y a partir de ahí se realizó una curva patrón con un rango de concentraciones de 1.367 a 1400 ng. L<sup>-1</sup>. Para el sembrado de las placas primero se preparó la batería de diluciones del compuesto de referencia en una placa de 96 pocillos añadiendo 100  $\mu$ l de etanol a todos los pocillos. Luego se agregan 100  $\mu$ l de solución madre de E2 (28  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>) en el primer pocillo y se realizó la dilución seriada 1:2, hasta finalizar la fila, con un total de 12 pocillos.

Luego de preparada cada una de las diluciones de E2, se transfirieron rápidamente (para evitar evaporación) 10  $\mu$ l a cada uno de los pocillos de la fila de la microplaca de 96 pocillos (TCP 96 T-SI,

Axygen Scientific) y se dejó evaporar en cámara de flujo laminar (Clean Beach 120-H). La completa evaporación se corroboró observando la placa a contraluz. Posterior al secado, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de medio de análisis.

El medio de análisis se preparó en tubos Falcon con 25 mL de medio de cultivo YES, 25  $\mu\text{L}$  del cultivo de levadura (previamente crecido durante 48 hs y una densidad óptica de 0.8 a 1), y 250  $\mu\text{L}$  de la solución del sustrato cromogénico cloro fenol rojo  $\beta$ - D galactopiranosido (CPRG) (Roche, REF 10884308001). En cada microplaca se sembraron tres filas de pocillos (triplicado) con la curva de E2 (1400 hasta 1.367 $\text{ng.L}^{-1}$ ) según la figura 5. Intercaladas entre las filas el negativo (solvente, CPRG y medio de crecimiento). Por último, una fila para el blanco (CPRG y medio de crecimiento).

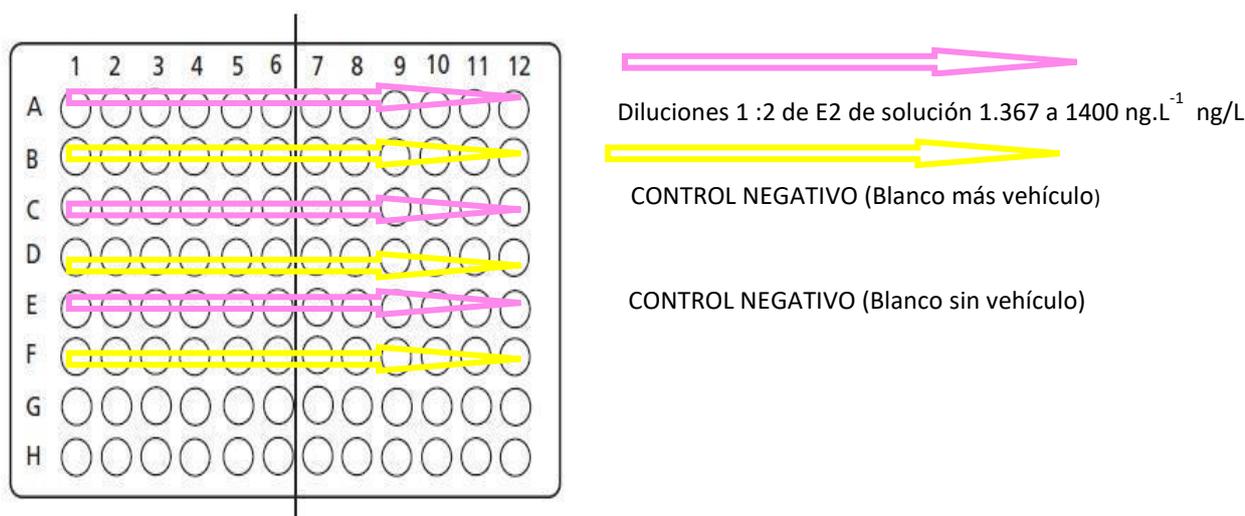


Figura 5. Diseño de sembrado de la curva patrón en placa de 96 pocillos para el bioensayo YES. En la fila A, C y E, se siembran las diluciones de E2 de menor a mayor concentración (1.367 a 1400  $\text{ng.L}^{-1}$ ); en B, D y F se sembraron las diluciones, control negativos sin vehículo y control negativo con vehículo. G y H, pocillos vacíos.

Luego de sembradas las placas y colocado el medio de análisis las placas son agitadas durante 2 minutos en un agitador (Os-20) a 100 rpm. Posteriormente se incubaron a 30°C durante 72 hs. En esta etapa es posible observar el cambio de color de amarillo a rosa/fucsia (indicador de actividad estrogénica), así

---

como un aumento de la turbidez producto del crecimiento de la levadura. Terminada la incubación, se realizó la lectura en un lector de microplacas (Fluostar OPTIMA BMG Labtech) a 540 nm y a 640 nm (densidad óptica para la turbidez producida por el crecimiento de la levadura).

### **Análisis de los datos**

Una vez obtenido los datos de absorbancia a 540 nm para la reacción colorimétrica y 640 nm se realizó la corrección de la respuesta estrogénica obtenida a efectos de corregir los efectos de turbidez asociados al crecimiento de la levadura (Fent et al., 2006):

$$Abs_{\text{ corregida}} = Abs_{\text{ muestra 540nm}} - (Abs_{\text{ muestra 640nm}} - Abs_{\text{ blanco 640nm}}) \quad \text{Ec. (1)}$$

Se construyen los gráficos con las curvas de dosis- respuesta que relaciona el valor de la absorbancia corregida con los factores de diluciones de las muestras en escala logarítmica. Como ya se mencionó el E2 se utilizó como estándar (o control positivo) de la actividad estrogénica, por lo que se debe realizar en cada ensayo una curva de dosis-respuesta del E2. Esta función de Hill se seleccionó en base a bibliografía (Fent et al., 2006) ya que las condiciones de cooperatividad en la interacción ligando-receptor se manifiesta en la forma sigmoidea de la curva (Weiss, 1997). Las curvas patrón se realizan utilizando programa R, con un script que se desarrolló para el presente trabajo empleando el paquete drc (Ritz y Streibig 2005). Este paquete permite el ajuste simultáneo de varios modelos de regresión no lineal. La atención se centra en el análisis de las curvas de respuesta a la dosis, pero la funcionalidad es aplicable a modelos de regresión no lineales arbitrarios. Este programa calcula los valores mínimos o límite de detección (LD) y máximos, la pendiente y el valor concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ), que corresponde a la concentración de ligando a la cual el 50% de los receptores (ER) están unidos, generando una respuesta colorimétrica al unirse (Bila 2005; Beck et al 2006), y se representan a través de la ecuación (2). Estos parámetros son obtenidos mediante el ajuste de la siguiente función logística:

---

$$y = c + \frac{(d-c)}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b} \quad \text{Ec(2)}$$

Donde:

**y**, Absorbancia corregida obtenida de la ecuación 1

**d**, corresponde máxima inducción de la actividad estrogénica (ng/L)

**c**, corresponde a la mínima inducción de la actividad estrogénica o límites de detección.

**x**, Concentración de la sustancia estrogénica (ng/L)

**e**, Valor de EC<sub>50</sub> (concentración de E2 con la cual el 50% de los receptores estrogénicos se unen al ligando) (ng/L)

**b**, es la pendiente de la curva sigmoideal y (x, y) es el par ordenado relacionado con una concentración de muestra y su respuesta de absorbancia corregida.

El EC<sub>50</sub> nos permite determinar qué condiciones son más adecuadas en el ensayo para obtener un mejor límite de detección, y comparar la estrogencidad de diferentes compuestos (e.g. xenestrógenos) (Beck et al., 2006; Bistan et al 2012).

La citotoxicidad, es decir, la inhibición del crecimiento de la levadura debido a múltiples compuestos no estrogénicos que pueden inhiben el crecimiento de la levadura (detergentes, disolventes orgánicos, antibióticos, entre otros) se evaluó y cuantificó controlando la absorbancia a 640 nm, representada por la ecuación (3) (Frische et al, 2009)

$$\text{Citotoxicidad} = 1 - \left[ \frac{|640|_{\text{muestra}}}{|640|_{\text{blanco}}} \right] \quad \text{Ec (3)}$$

Los valores negativos y nulos de la ec. 3 se interpretaron como ausencia de toxicidad, mientras que los valores positivos indicaron citotoxicidad y se expresaron como porcentaje. La evaluación de

---

citotoxicidad debería ser rutinaria en el ensayo YES ya que de no realizarse podrían obtenerse interpretaciones erróneas de falsos negativos (Frische et al., 2009).

El límite de detección (LD) se calculó como la concentración de E2 obtenida con el valor del blanco con el vehículo que es etanol absoluto ( $B+V_{media}$ ), más tres desviaciones estándar Ecuación (4) (Boqué, 2004).

$$LD = Abs_{640(B+V_{media})} + 3 * \sigma Abs_{640} \quad Ec (4)$$

La actividad estrogénica de los compuestos individuales se expresa como su potencia relativa (PR) Ecuación (5) (Beck et al., 2006).

$$PR = \frac{EC50(17\beta\text{-estradiol})}{EC50(sustancia)} \quad Ec (5)$$

### **Optimización de ensayo YES vs concentración de CPRG**

Para poder determinar cuál es la concentración óptima del sustrato CPRG, se realizaron bioensayos a diferentes concentraciones de sustrato estas fueron 40, 60 y 80  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Luego de obtenidas las curvas Absorbancia corregidas vs concentración de E2 como compuesto de referencia, se calcularon los parámetros para cada curva. Para cada ensayo se obtuvo un valor de EC50 y un valor de límite detección.

### **Interferencia por salinidad**

Por otro lado, se realizaron ensayos utilizando agua de la canilla a diferentes concentraciones salinas (conductividad) cubriendo el rango estuarino (Mc Lusky and Elliott, 2004), a partir de 1.5 mS.cm<sup>-1</sup> se considera estuarina y 40 mS. cm<sup>-1</sup> que es el valor máximo registrado en la desembocadura del arroyo Maldonado (González, 2022). Las concentraciones salinas fueron 1.816, 3.7, 7.49, 15.4, 30.2 y 40 mS.cm<sup>-1</sup>, a cada una de estas muestras se le incorporan 250  $\mu\text{L}$  de E2 en concentración conocida 20

---

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se filtraron 150 mL de cada una de las muestras en cartuchos SPE Oasis, por triplicado. Este estudio se realizó para determinar si la salinidad en estas concentraciones afecta la viabilidad y el resultado del bioensayo YES ya que las muestras ambientales a analizar (cuenca del Arroyo Maldonado) tienen salinidades diferentes.

## **Resultados**

### **Puesta a punto de la Técnica YES**

#### **Ensayo YES**

Se observó que la levadura modificada respondió a la presencia de compuestos estrogénicos como el E2 a la que fue expuesta y expresó actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. En esta etapa es posible observar el cambio de color de amarillo a rosa/fucsia (indicador de actividad estrogénica), así como un aumento de la turbidez producto del crecimiento de la levadura (fig. 6).



Figura 6. Fotografía de una placa de 96 pocillos al finalizar la incubación (72horas). Se observa el gradiente de coloración (amarillo a fucsia) correspondientes a las diluciones seriadas 1:2 de la concentración de E2 para la curva patrón.

Además, se puede observar en el gráfico obtenidos con los resultados de Abs corregida vs concentración de E2 que la respuesta de la actividad relativa de  $\beta$ -galactosidasa frente a diferentes concentraciones de E2 (1.367 a 1400 ng.L<sup>-1</sup>) es de tipo sigmoide (Fig 7).

### Curvas de Absorbancia vs concentración E2 a diferentes concentraciones de sustrato CPRG

Para poder determinar la concentración de sustrato CPRG con un valor de EC<sub>50</sub> menor, se realizaron varios ensayos con diferentes concentraciones de sustrato (40, 60, 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La curva de concentraciones de E2 (1.367 a 1400 ng.L<sup>-1</sup>) vs Absorbancia corregidas presentan una forma sigmoidal. Se calcularon los valores de EC<sub>50</sub> y los límites de detección para cada una de ellas (Fig. 7).

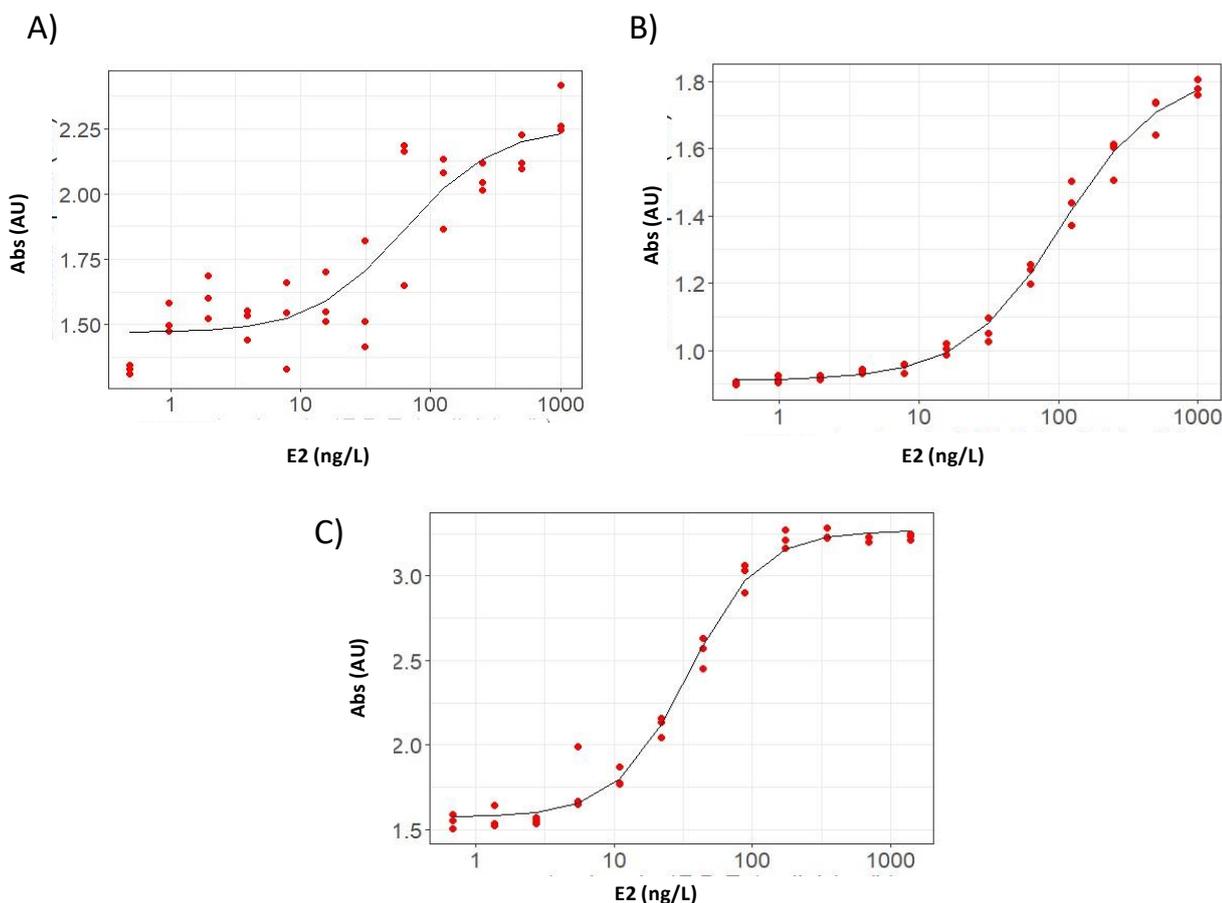


Figura7. Curvas patrón de E2 a diferentes concentraciones de sustrato (CPRG). Absorbancia (Abs. en Unidades Arbitrarias) (AU) corregida vs Concentración de E2. A) 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  CPRG EC<sub>50</sub>=96.23 ng.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, LD= 48.22 ng.L<sup>-1</sup>; B) 60 µg.mL<sup>-1</sup> EC<sub>50</sub>=105.89 ng.L<sup>-1</sup>, LD=100.27 ng.L<sup>-1</sup>; C) 80 µg.mL<sup>-1</sup> EC<sub>50</sub>= 34 ng.L<sup>-1</sup>, LD= 1.9 ng.L<sup>-1</sup>.

En la tabla 1 se representan los valores de EC<sub>50</sub> y los límites de detección para cada bioensayo.

Tabla 1. Valores de EC<sub>50</sub> y Límites de detección (LD) de los ensayos YES con diferentes concentraciones de CPRG en µg.mL<sup>-1</sup>

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Gráficos</b>	<b>(40 µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>(60 µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>(80 µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>EC<sub>50</sub> (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	96.23	105.89	34.21
<b>LD (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	48.22	100.27	1.9

Se realizaron un total de 13 ensayos de E2, utilizando una concentración de CPRG de 80 µg.mL<sup>-1</sup> cada uno con la curva E2 correspondiente, calculándose la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) . Los resultados correspondientes a 13 curvas, utilizando en el ensayo una concentración de CPRG 80µg.mL<sup>-1</sup>, mostraron un valor promedio de EC<sub>50</sub> de 69,05 ± 39,89 ng.L<sup>-1</sup>, un promedio de LD (EQ-E)= 30ng.L<sup>-1</sup>. De los 13 ensayos que se realizaron, se seleccionan 10 que fueron graficados (Fig. 8).

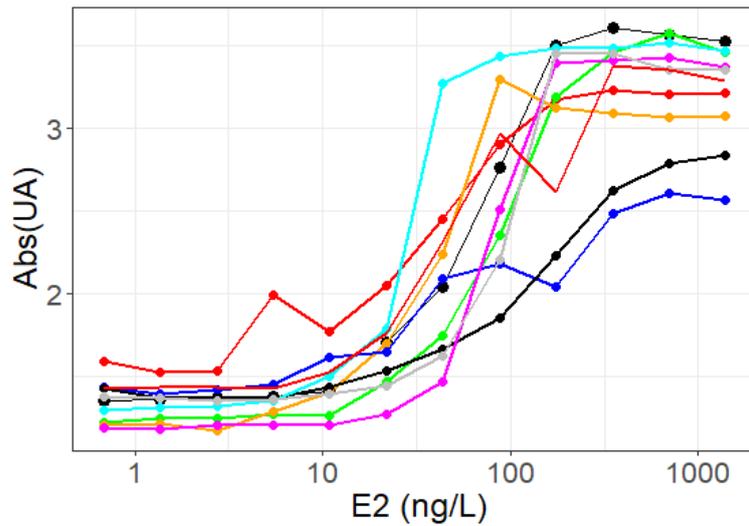


Figura 8. Curvas patrón de estradiol (E2) con  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de CPRG. Se represento cada curva con diferentes colores,  $n=10$ .

Se analizan los parámetros obtenidos en los 10 ensayos de la ecuación de Hill, parámetro e ( $EC_{50}$ ), parámetro b, parámetro c, parámetro d. En la figura 9 se presentan las medias correspondientes a los parámetros con sus desvíos estándar.

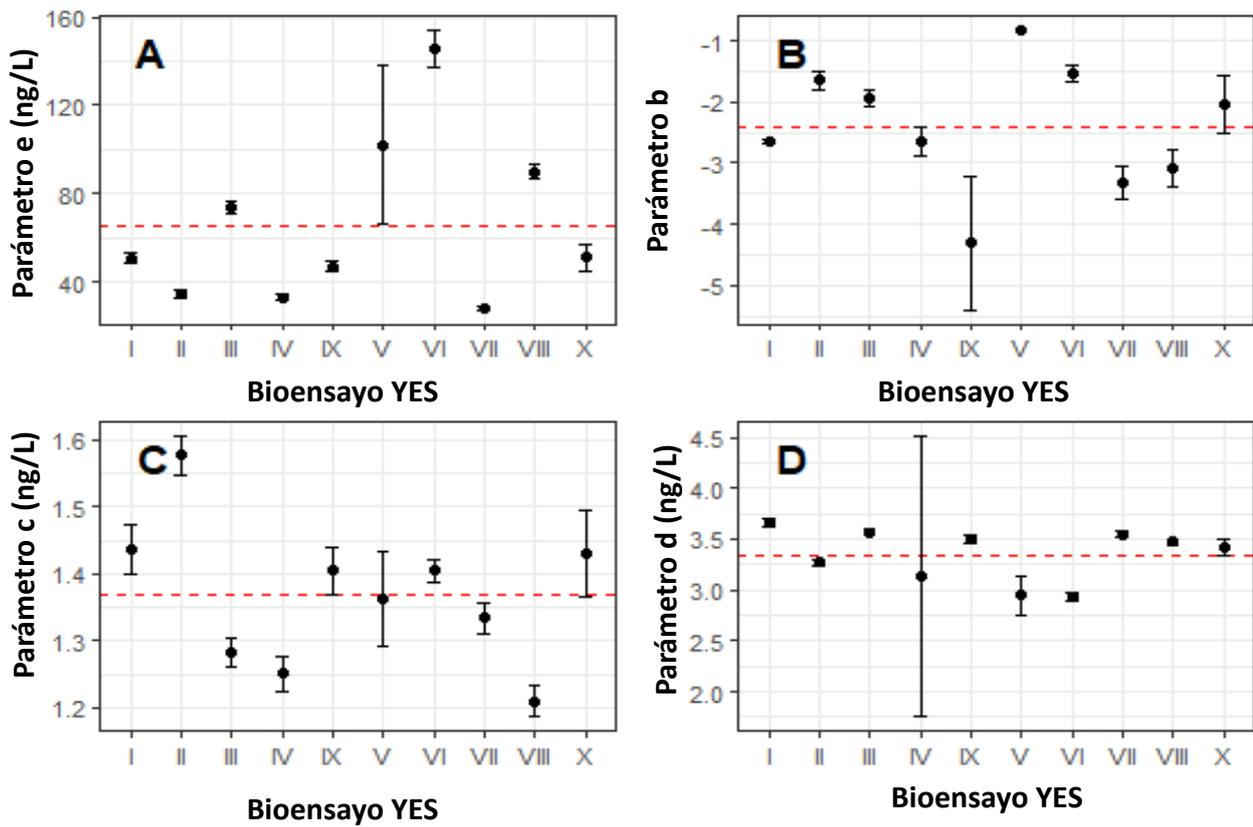


Figura 9. Parámetros de obtenidos de los 10 ensayos de la ecuación de Hill: parámetro e ( $EC_{50}$  ng/L), parámetro b (pendiente de la curva sigmoide), parámetro c (mínima inducción de la actividad estrogénica o límite de detección, ng/L) y parámetro d (máxima inducción de la actividad estrogénica, ng/L) vs Bioensayos YES (I al X), n=10.

### Efecto de la salinidad en la determinación de estrogénicidad

Para la determinación de la actividad estrogénica se realizó la curva patrón de E2, con una concentración de sustrato CPRG de  $80\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , el gráfico obtenido se presenta en la figura 10.

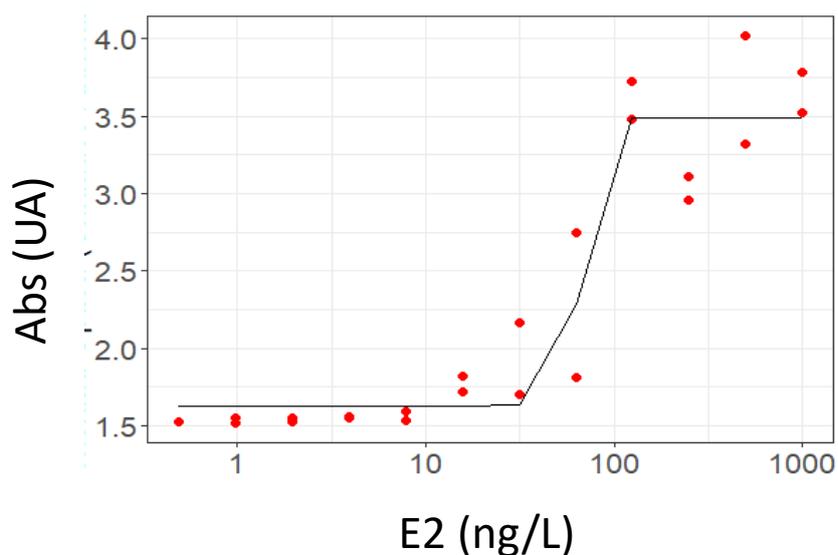


Figura 10. Curva patrón de E2. Gráficos de Absorbancia (Abs. en Unidades Arbitrarias) corregida vs Concentración de E2, Valor de  $EC_{50}= 66.56 \text{ ng.L}^{-1}$ , LD (EQ-E)=  $55.05 \text{ ng.L}^{-1}$ .

Se realizaron 6 muestras por triplicado, con diferentes concentraciones salinas 1.816, 3.7, 7.49, 15.49, 30.2 y  $40 \text{ mS.cm}^{-1}$ , representando la salinidad frecuentemente encontrada sistemas estuarinos y marinos (APHA, 1992) y nombradas S1, S2, S3, S4, S5, S6 respectivamente. Con cada muestra de salinidad, se obtuvo un valor de actividad estrogénica de Estradiol 50 a  $80 \text{ ng.L}^{-1}$  y un desvío estándar de  $12.75 \text{ ng.L}^{-1}$  (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad estrogénica obtenida de las muestras salinas con agua de la canilla y diferentes concentraciones de salinidad.

Muestras Salinas	Conductividad (mS.cm <sup>-1</sup> )	Actividad Estrogénica (ng.L <sup>-1</sup> )	Citotoxicidad
S1	1.8	49	ND
		ND	
S2	3.7	69	ND
		69.64	
		75	
S3	7.5	57.48	ND
		ND	
		ND	
S4	15.5	61.38	ND
		60.67	
		55.39	
S5	30.2	87.44	ND
		80.34	
		80.34	
S6	40.0	64.63	ND
		52.33	
		49.10	

Leyenda ND: No Detectado

En la figura 11 se muestran los resultados de las diferentes muestras salinas y actividad estrogénica.

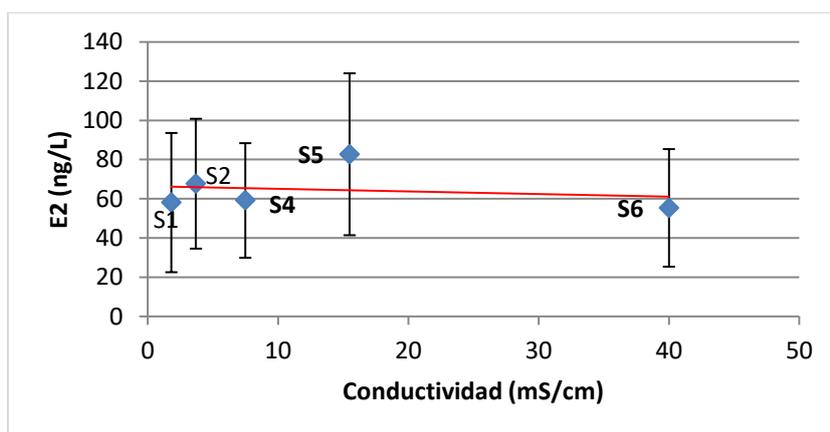


Figura 11. Muestras Salinas S1, S2, S4, S5 y S6 vs E2 (ng.L<sup>-1</sup>). En rojo se observa la línea de tendencia

---

## Validación del bioensayo con estándares de xenoestrógenos

Se realizaron bioensayos YES con estándares de xenoestrógenos. La respuesta estrogénica para compuestos individuales se representa como potencia reactiva. Entre los compuestos evaluados además del E2 como compuesto de referencia, se evaluó el 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), el bisfenol A (BPA) y el Nonifenol (NP).

Tabla 3. Sensibilidad del ensayo YES para compuestos estrogénicos activos. EC<sub>50</sub>: de E2 con la cual el 50% de los receptores estrogénicos se unen al ligando, PR: Potencia Reactiva; LD: límite de detección; Citotoxicidad.

Compuesto	EC <sub>50</sub> $\mu\text{g.L}^{-1}$	PR	LD (EQ-E2) $\text{ng.L}^{-1}$	Citotoxicidad
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	0.02785	1.692	4.1	ND
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	0.047069	1	27,2	ND
Bisfenol A (BPA)	50.488	0,001	ND	ND
Nonifenol (NP) en etanol	255.000	0.9*10 <sup>-4</sup>	ND	ND

Leyenda ND: No Detectado

Los compuestos analizados no presentaron citotoxicidad. La respuesta estrogénica para compuestos individuales se representa por la potencia reactiva (Ec.5).

## Discusión

Con el fin de poder determinar cuál sería la concentración de CPRG que presente un mejor límite de detección se realizaron varios ensayos YES a diferentes concentraciones de CPRG, donde se obtuvieron

---

3 curvas de Absorbancia vs concentración de E2. Las tres curvas obtenidas fueron del tipo sigmoide. La variación de la concentración de CPRG es una tarea que debe realizarse con precaución, ya que una escasez de CPRG en el medio de análisis puede reducir la respuesta medible de la inducción de  $\beta$ -galactosidasa (Gomes et al, 2023).

Los resultados obtenidos mostraron que a diferentes concentraciones de CPRG 40, 60, 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , la respuesta fue la esperada, con un  $\text{EC}_{50}$  de 96.23, 105.89 y 34.21  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , con un LD de cada uno de los ensayos varían de 48.22, 100.27 y 1.9  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. La variación de  $\text{EC}_{50}$  depende de las condiciones del ensayo, ya que está directamente influenciada por factores físicos y químicos, densidad celular, tiempo de incubación y experiencia del operador. El menor  $\text{EC}_{50}$  y límite de detección se presenta en el ensayo que se utilizó 250  $\mu\text{l}$  de CPRG a  $80\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Si bien Routledge y Sumpter (1996) sugieren agregar 300  $\mu\text{L}$  de CPRG ( $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) al medio de ensayo, nuestros resultados muestran que se pueden obtener resultados válidos con un volumen más pequeño de CPRG como 250  $\mu\text{L}$  ( $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Bistan M., et al, 2011). Sin embargo, se observa que el mejor límite de detección se obtiene cuando la concentración de CPRG es de  $80\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , concentración que fue utilizada en los ensayos posteriores.

Se realizaron 13 ensayos utilizando 250  $\mu\text{l}$  de CPRG al  $80\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , de cada ensayo se obtuvo un  $\text{EC}_{50}$  El valor de  $\text{EC}_{50}$  promedio de  $69.5 \pm 39.89\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por Keel et al (2010) de  $70.8 \pm 13\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y los reportados por Gaido et al (1997) de  $65.9 \pm 8\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y Roughledge (1996) de  $55.3 \pm 18\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Las muestras salinas, no presentaron citotoxicidad, y la concentración de E2 se encuentra en el orden de los 50 a 80  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (tabla2). Las muestras que no se detectaron (ND) seguramente ha sido debido a algún error de manipulación. Estos resultados muestran que la diferencia de concentración salina entre muestras no afectaría la detección de estrogenicidad por el ensayo YES. Este resultado es de gran

---

importancia debido a que muchas muestras ambientales pueden presentar diferencias de concentraciones salinas desde las nacientes hasta desembocar en el océano. El BPA mostró un valor de PR de  $1 \cdot 10^{-3}$ , cercano al valor de  $7.3 \cdot 10^{-4}$  reportado por Gomes et al. (2023). El nonilfenol mostró un PR de  $0,9 \cdot 10^{-4}$ , similar a lo reportado por Beresford et al., (2000); Beck et al., (2006) y Gomes et al. (2023). Cada compuesto individual (E2, EE2, BPA, NP) está relacionado con una potencia reactiva (PR), es decir, presentan un mecanismo de acción y afinidad con los receptores estrogénicos (ER), pudiendo un mismo compuesto presentar más de un mecanismo de ingreso (genómico y no genómico). Por ejemplo, el BPA actúa de forma genómica y no genómica, pero presenta un PR bajo ( $1 \cdot 10^{-3}$ ), debido a la baja afinidad por los receptores nucleares que son utilizados en el bioensayo YES (Khetan et al., 2014). Los estrógenos muestran una elevada afinidad con el ER citoplasmático, y es en base a estos receptores que se desarrollaron métodos para detectar actividad estrogénica en agua (Sumpter y Johnson, 2008; Jarošová et al., 2014; Robitaille et al., 2022).

## **Capítulo 2: Estrogénicos y estrogenicidad en la cuenca del arroyo Maldonado**

### **Introducción**

La cuenca hidrográfica es un sistema integral espacial de la superficie terrestre donde el flujo de agua es unidireccional que se dirige hacia el océano (exorreica) o a un cuerpo sin salida al mar (endorreica) desde los límites definidos o divisorios de cuencas por las laderas y los taludes. La cuenca hidrográfica se representa como un sistema multiparamétrico con diferentes propiedades funcionales y características particulares, determinando variaciones espacio-temporales en la composición química del agua y sedimento (Korytny, 2017). La calidad del agua y sedimento determinan el estado sanitario de una cuenca. La actividad antrópica altera, a veces de manera irreversible, su hidrología, química y biota asociada (Allan y Johnson, 1997). Muchas actividades humanas producen impactos sobre los ciclos biogeoquímicos, generando desequilibrios ecosistémicos (Vitousek 1994, Pachauri et al., 2014). Los

---

aportes antrópicos de una variedad de fuentes suelen ser los principales factores que afectan a la mayoría de los cuerpos de agua, incluyendo regiones urbanizadas, industriales, agrícolas y ganaderas (UNESCO; 2019).

### **Cuenca del arroyo Maldonado**

El Arroyo Maldonado es un curso fluvial situado en la región Sud Este de nuestro país, cuenta con una extensión de 1367km<sup>2</sup>, desde su nacimiento en el sector serrano del área septentrional del departamento de Maldonado (Sierras de Carapé), hasta la desembocadura en el océano Atlántico. La alta subcuenca del arroyo San Carlos nace la altura máxima del Uruguay: el cerro Catedral, (513.6 m). Discurre hacia el sur, corriendo paralelo a la ruta nacional 39 (situada al occidente del arroyo). Posteriormente es atravesado por la ruta nacional 9 e inmediatamente bordea el este de la ciudad de San Carlos, donde se encuentra el parque del mismo nombre, de añosa arboleda. Aguas abajo se junta con el arroyo Maldonado cuyas nacientes se encuentran más al Oeste al Norte de la ruta 12. En su tramo inferior posee numerosas islas, la mayor de ellas, justo al oeste de la localidad de El Tesoro, es de 1300 metros de largo por cerca de 500 metros de ancho, contando con lagunas en su interior.

En su cuenca se encuentran varias zonas urbanas, tales como la ciudad de San Carlos, la ciudad de Maldonado, el balneario La Barra y las nuevas urbanizaciones que se están desarrollando en la zona. Con respecto a las características del uso del suelo, el mismo es mayormente de pastizal (70.2%), seguido por bosque nativo (11.8%), forestado (5.54%), mezcla de campo natural, pasturas y rastrojos (5.50%) y otros (9%). El área urbana total fue 3.4% (MGAP, RENARE 2018) (Fig.12).

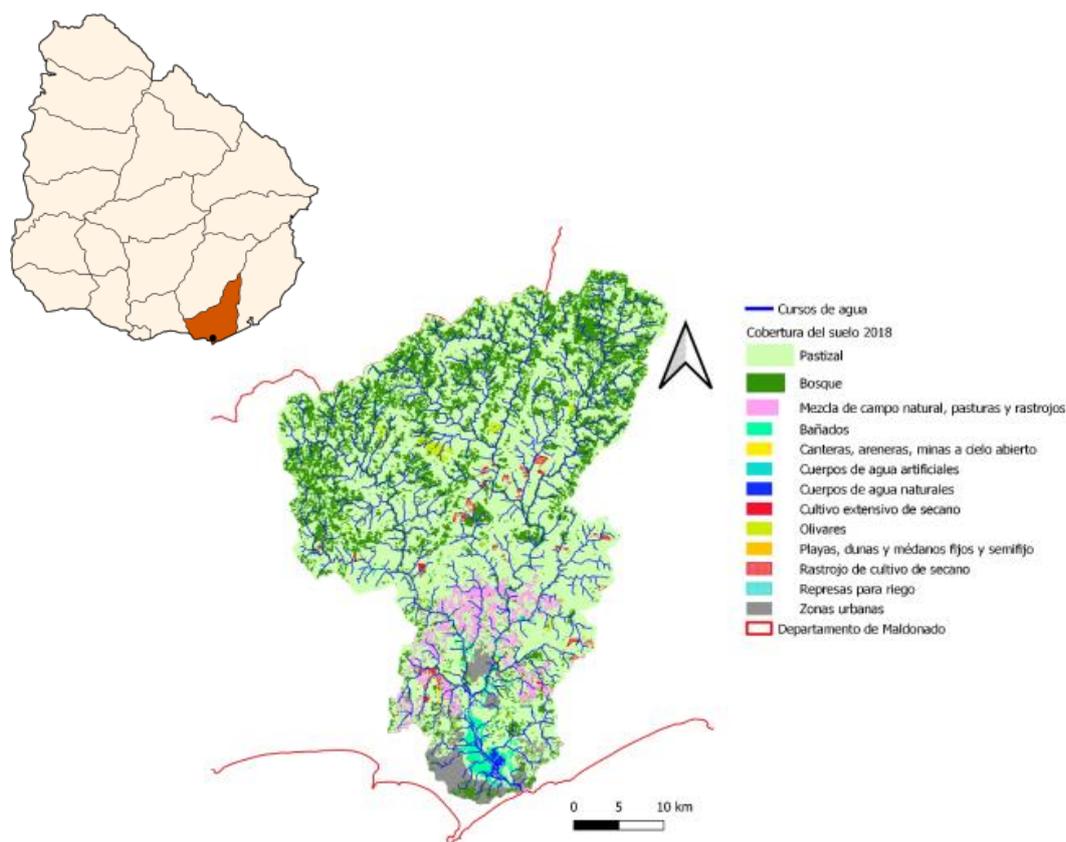


Figura 12. Cobertura de la cuenca del Arroyo Maldonado (modificado de González, 2022).

En las nacientes de la cuenca, la cobertura dominante son el pastizal y el bosque nativo, en la parte media es donde se encuentran campo natural, pasturas y rastrojos y áreas urbanas (Ciudad de San Carlos), mientras la parte baja tienen un gran porcentaje de área urbana correspondientes a la ciudad de Maldonado y el balneario La Barra. Gran parte de las áreas urbanas poseen saneamiento (<https://gisdev.ose.com.uy/visor>). En la periferia de la ciudad de San Carlos sobre el arroyo homónimo se encuentra la planta de tratamiento de efluentes cloacales de la ciudad, La misma se proyecta ampliar y cambiar de lugar ya que fue construida para sanear aproximadamente 10.000 habitantes cuando la ciudad según el último censo (INE, 2011) tenía aproximadamente 27.000 habitantes, arrojando los líquidos tratados en el Arroyo San Carlos. Al oeste de la ciudad de San Carlos existe un tambo (Talar), y al suroeste un criadero de ñandúes y un basurero municipal que se encuentran en la subcuenca del

---

arroyo Maldonado. Aguas bajo de la confluencia de los arroyos San Carlos y Maldonado comienza un área con características estuarinas, formando una de las marismas más grandes del país, que desemboca en el océano Atlántico sudoccidental, separando la localidad balnearia de La Barra (Este), de Playa Brava de Punta del Este (Oeste).

En la parte baja de la cuenca donde se encuentra la ciudad de Maldonado y el balneario La Barra, se encuentran dos plantas de tratamiento de aguas residuales cuyos emisarios liberan sus efluentes directamente a la cuenca (Planta de La Barra) y a la playa (Parada 30 de la Brava) aunque puede arrojar el saneamiento con tratamiento primario al humedal estuarino de la cuenca de Maldonado a través de salidas de emergencia (OAS & CIEMSA, 2012).

La cuenca del arroyo Maldonado, fuente parcial de agua potable y de otros servicios ecosistémicos, no tiene un programa de monitoreo de su calidad ambiental. En particular, se desconoce la presencia de sustancias estrogénicas a lo largo de su cuenca.

### **Monitoreo de estrogénicos en Uruguay**

Los EDCs son liberados de manera puntual o difusa y su distribución en las cuencas depende de su estructura y condiciones ambientales. Estos compuestos pueden producir efectos nocivos a concentraciones muy bajas, en el orden de PPB y PPT (Gaido et al., 1997), por lo tanto, es necesario detectar EDCs en los ecosistemas (Bergman et al., 2012; Martyniuk et al., 2022). En este contexto, se ha sugerido en distintos países integrar los bioensayos de respuesta como el YES en el monitoreo de la calidad ambiental (Altenburger et al., 2015 ; Brack et al., 2016 ; Di Paolo et al., 2016 ; Schuijt et al., 2021; Gomes et al., 2023). En Uruguay no existe legislación que regule la comercialización o liberación de compuestos EDCs, ni tampoco existen programas de monitoreo ambiental de estas sustancias. Además, son escasos en nuestro país los trabajos referidos al estudio ambiental de sustancias estrogénicas, Griffero et al., (2018) detectaron estrogenicidad en sedimentos a lo largo de la cuenca y

---

asociada con diversas actividades antrópicas en la cuenca del Ríos Santa Lucía. Investigadores del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) utilizando bioensayo YES analizaron muestras extraídas de un afluente cloacal y un efluente de una planta de pulpa de celulosa (Keel et al, 2010). Si bien se optimizó el ensayo con éxito, no se detectó actividad estrogénica para las muestras que se analizaron (Keel et al., 2010). Posteriormente, Míguez (2013) evaluó el riesgo de exposición a estrogénicos en un segmento de la costa del río Uruguay, detectando 12 compuestos considerados EDCs.

### **Objetivo general:**

Analizar la presencia de actividad estrogénica en la cuenca del Arroyo Maldonado

### **Objetivos específicos:**

1. Cuantificar los niveles de estrogénicidad con el bioensayo YES en extractos de agua y sedimento de la cuenca.
2. Detección y cuantificación de xenoestrógenos en sedimentos de la cuenca.

### **Hipótesis**

Hipótesis 1: La actividad estrogénica varía dentro de la Cuenca según sus usos del suelo (zonas urbanas, agrícolas y ganaderas), debido a la liberación diferencial de distintos tipos de sustancias potencialmente estrogénicas.

Hipótesis 2: La partición ambiental de la estrogénicidad en la cuenca del arroyo Maldonado estará parcialmente determinada por las propiedades físico-químicas de los xenoestrógenos y el gradiente salino ambiental y las actividades temporales humanas.

---

## Metodología

### Área de estudio y diseño de muestreo

Se realizaron dos muestreos uno en invierno (julio 2019) y otro en primavera (noviembre 2019). Fueron seleccionados 19 puntos de muestreo a lo largo de la cuenca (fig.13), cubriendo un amplio rango de usos de suelo, así como diferentes paisajes. Se contemplan las nacientes de las subcuencas, zonas intermedias (previas a las urbanizaciones de San Carlos y Maldonado) y en la zona el Tesoro y desembocadura.

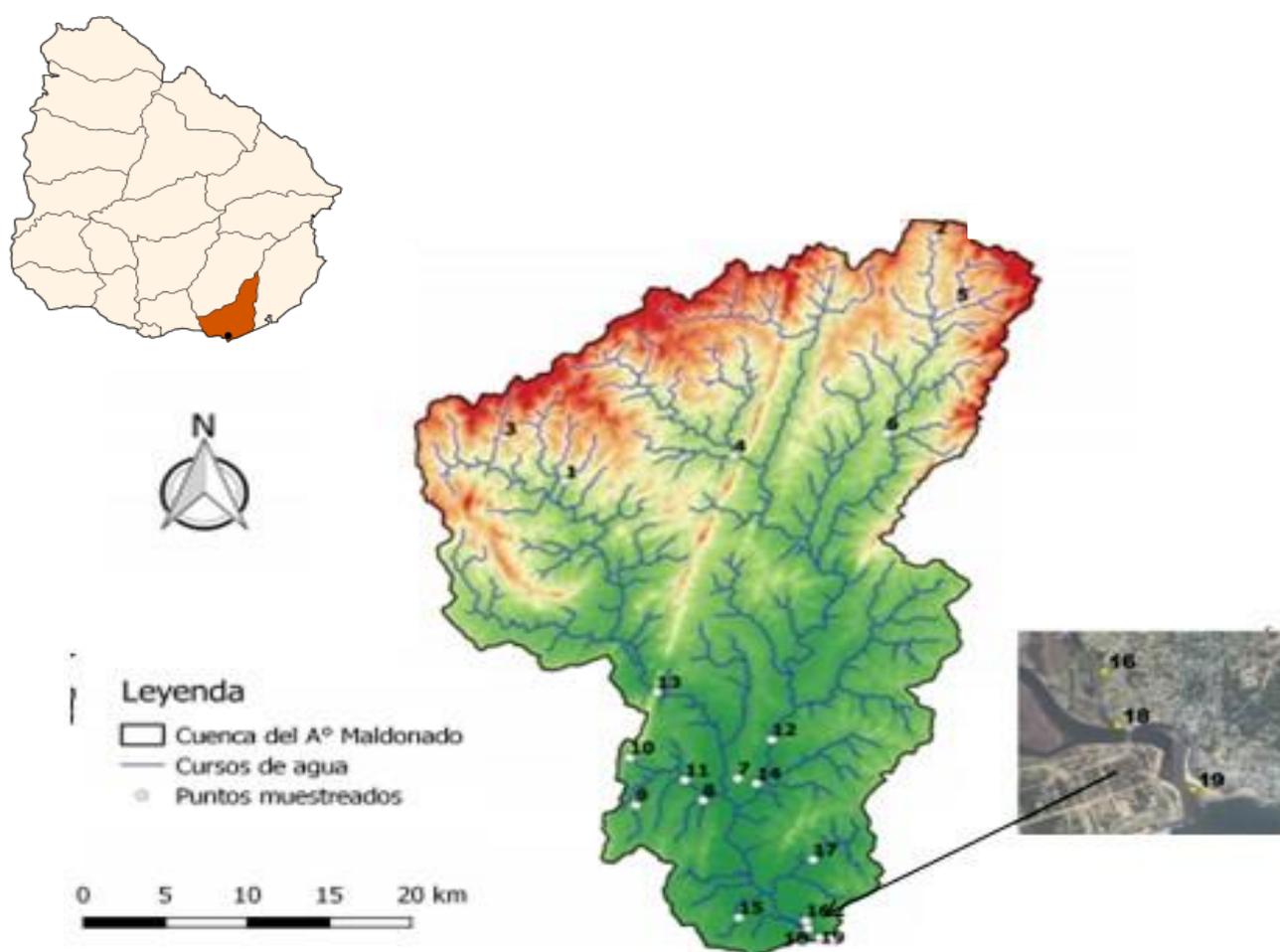


Figura 13. Mapa de la Cuenca del Arroyo Maldonado. La numeración indica los sitios de muestreo.

Los sitios del 1 al 6 al norte de la cuenca (2 en las nacientes del arroyo Maldonado, y 4 en las del Arroyo San Carlos el cual es tributario al anterior) son de característica rural. En las cercanías de la ciudad de San Carlos hacia el norte se ubicaron los sitios 12 y 13 (uno en cada arroyo), el sitio 7 sobre la periferia de la ciudad hacia el suroeste en una cañada urbana afluente del arroyo Maldonado, y el sitio 14 al sur sobre el arroyo San Carlos antes de confluir con el arroyo Maldonado. Los sitios 8-11 hacia el oeste de dicha ciudad pertenecen a cañadas afluentes al arroyo Maldonado, los sitios 10 y 11 se encuentran respectivamente aguas arriba y abajo de un tambo; el sitio 8 incluye en su cuenca el vertedero municipal en tanto que el sitio 9 tiene un criadero de caballos. Se muestrearon 5 sitios en el sur de la cuenca en donde el sitio 15 está situado en la periferia de la ciudad de Maldonado hacia el Este, y pertenece a una cañada urbana que desemboca en el Maldonado. Otros cercanos al Balneario La Barra donde el sitio 17 está en una cañada afluente del Maldonado y al Norte de dicho balneario, y el 16 situado al margen del barrio El Tesoro sobre una cañada que desemboca en el arroyo aproximadamente hacia el noreste del puente de La Barra. Por último, los sitios 18 y 19 son los más cercanos a la desembocadura y se encuentran respectivamente aguas arriba y aguas abajo del mencionado puente (tabla 4). En 15 de los sitios predomina cobertura de pastizal, en tres de predominio el área urbana, y en uno solo predomina la mezcla de campo natural.

Tabla 4. Sitios seleccionados para el monitoreo ambiental, con su ubicación y descripción.

Fecha de muestreo julio y noviembre de 2019.

Sitios	Ubicación	Altitud (m)	Descripción
1	34°34'15.84"S55°03'31.22"O	127	Suroeste del Cerro Dos Hermanos, viñedo en su cuenca
2	34°22'54.45"S54°46'15.33"O	276	Cañada sobre Ruta 12 próxima a las nacientes del Maldonado
3	34°43'33.48"S54°59'23.43"O	271	Sobre el camino arco del sol, unos kilómetros al Este de Ruta 9. Cañada perteneciente a una

			cuenca principalmente de suelo herbáceo, afluente al San Carlos.
4	34°33'48.97"S54°55'39.18"O	117	Afluente al A.San Carlos, al norte de Paso López
5	34°26'31.69"S54°45'57.34"O	189	Sobre el A.San Carlos, norte de la ciudad de San Carlos, zona de sierras
6	34°32'31"S54°48'55"O	68	Sobre el San Carlos, Norte de la ciudad de San Carlos, zona de sierras
7	34°47'54"S54°55'38"O	4	Punto cerca de Escuela N°98 sobre cañada urbana en San Carlos (con construcciones sobre el cauce mismo)
8	34°48'52"S54°57'11"O	6	Cañada sobre Camino de Los Ceibos antes del cruce con Ruta 39, pertenece a la cuenca de drenaje del veredero municipal
9	34°49'04"S55°00'14"O	21	Cañada donde se presenta criadero de Ñandúes y ganado.
10	34°46'59"S55°00'31"O	34	Nacientes de la cañada perteneciente a la subcuenca del tambo Talar.
11	34°48'28"S54°57'16"O	7	Cañada que tiene en su cuenca al tambo Talar, el punto es aguas abajo del mismo.
12	34°46'10"S54°54'05"O	4	Ruta 9 y Arroyo San Carlos
13	34°44'03"S54°59'18"O	25	Costa con suelo modificado
14	34°48'05"S54°54'47"O	4	Después del efluente de la planta de saneamiento de OSE en San Carlos
15	34°54'04"S54°55'33"O	2	Cañada urbana, cruce del camino perimetral de Maldonado.
16	34°54'14"S54°52'32"O	2	Drenaje del humedal, junto a la calle, , barrio El Tesoro de La Barra
17	34°51'31"S54°52'14"O	5	Desembocadura del A. Mdo en La Barra, agua oscura marrón

18	34°54'34"S54°52'28"O	3	Norte puente de la Barra
19	34°54'56"S54°51'57"O	0	Desembocadura en La Barra

En la cuenca conviven distintos usos del suelo, como pastizal, bosque, campo natural que incluye pasturas y rastrojos y áreas urbanas (tabla 5).

Tabla 5. Cobertura del uso del suelo (%) según el sitio. Campos Naturales, pasturas y rastrojos. Fuente MGAP, RENARE (Modificado de González, 2022)

Sitio	Área (km <sup>2</sup> )	Pastizal	Bosques	Campos natural	Áreas urbanas	Otros
1	9.87	80.27	11.36	0	0	8.37
2	4.49	52.97	47.03	0	0	0
3	9.7	69.63	30.04	0	0	0.12
4	28.03	78,75	9.27	0	0	11.98
5	16.86	62.41	37.59	0	0	0
6	141.08	65.8	33.92	0	0	0.29
7	0.32	0	0	0	100	0
8	9.03	48.48	17.8	14.53	11.91	7.28
9	9.78	39.94	13.67	41.32	5.05	0.01
10	1,18	78.4	17.86	1.83	0	1.91
11	46.04	47.24	8.19	36.48	2.15	5.95
12	802.89	75.65	19.48	2.99	0.01	1.88
13	345.46	76.28	22.49	0.01	0.09	1.14
14	854.9	74.94	18.85	3.83	0.44	1.93
15	5.65	0.01	15.4	0	83.82	0
16	2.07	14.76	0	0	64.98	13.15

---

17	26.73	82.02	5.14	3.12	8.39	1.32
18	1481.10	70.36	17.38	5.52	3.27	3.47
19	1484.3	70.21	17.37	5.51	3.43	3.48

---

Para la selección de los sitios se consideró incluir lugares con menos impacto y sitios potencialmente expuestos a estrogénicos a lo largo de la cuenca. Se incluyeron sitios que abarcan la parte baja de la cuenca donde se encuentra gran parte de la ciudad de Maldonado y también la marisma o humedal estuarino, donde se encuentran dos plantas de tratamiento de aguas residuales.

### **Variables físico- químicas de la cuenca**

Para tener una aproximación de la calidad de agua, en cada punto de muestreo se midieron las siguientes variables fisicoquímicas: pH, conductividad, temperatura (Thermo scientific ORION Star A325), y porcentaje de saturación de oxígeno (Thermo scinetific ORION Star A223).

### **Extracción de estrogénicos en muestras ambientales**

- ***En muestras de la columna de agua***

Se colectaron 1000 mL agua en botellas de vidrio color ámbar en los 19 puntos seleccionados que fueron transportadas en conservadora y luego almacenadas a 4°C para su procesamiento dentro de las siguientes 48 hs. Luego, se filtraron 500 mL de cada muestra que fueron sometidos a extracciones de matrices acuosas utilizando SPE Oasis 6cc (Waters) que fueron previamente acondicionados, primero con 6 ml de metanol (ppa) y luego 6 ml de agua ultra pura. Para ello se utilizó una bomba de vacío utilizando un manifold, y luego cada extracto fue eluído en 1 mL de metanol. Posteriormente, a estos extractos se les

determinó la actividad estrogénica mediante el ensayo YES (Fig.14). Se realizaron dos bioensayos (I y II), en primero se sembraron 10  $\mu$ L de extracto de las muestras, mientras que un segundo bioensayo se realizó con 100  $\mu$ L de los eluidos para muestras de agua.

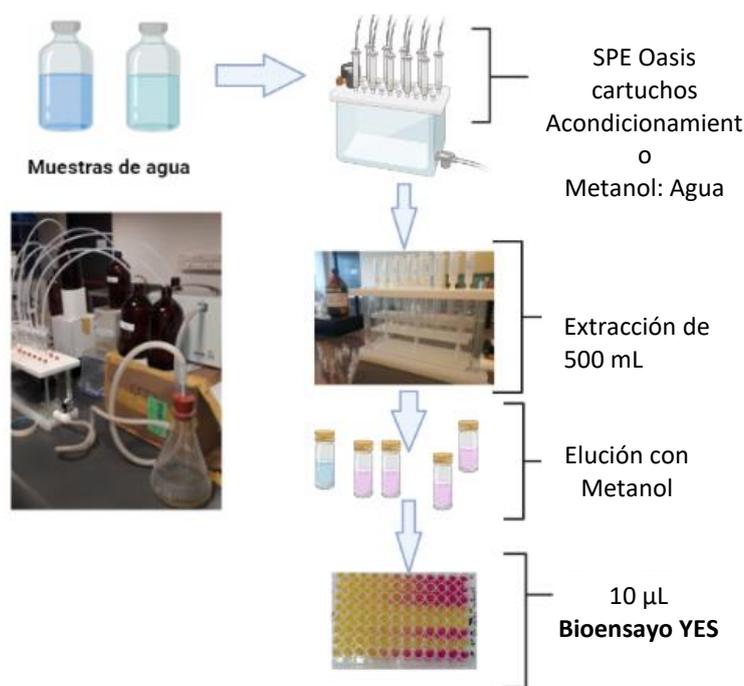


Figura 14. Esquema describiendo el sistema utilizado para la extracción de fase sólida (SPE). Acondicionamiento de los cartuchos Oasis (Metanol: Agua). Las muestras de agua (500 mL) son procesadas utilizando un manifold y una bomba de vacío, donde los compuestos de interés son retenidos en los cartuchos, elución en 1 mL de metanol, se utilizan 10 $\mu$ L para el bioensayo YES.

- ***Extracción en muestras de sedimento***

Para la determinación de estrogénicidad en muestras de sedimento se utilizaron extractos obtenidos a partir de la metodología de QuEChERS, la extracción “rápida, fácil, económica, efectiva, robusta y segura” (QuEChERS, por sus siglas en inglés). La metodología QuEChERS es crecientemente empleada

---

como método alternativo para la extracción de plaguicidas del suelo, compuestos que pueden presentar actividad estrogénica (Metcalfé et al., 2022b).

El sedimento se secó en frío con un liofilizador Lioquest Testar. Para realizar este procedimiento se pesaron 10 g de sedimento seco en un tubo de centrifuga de 50 mL, se agregaron 10 mL de agua destilada/desionizada, luego se agitó un minuto en vortex y se dejó reposar por 10 minutos. Seguidamente se adicionaron 10 ml de acetonitrilo, se agitó nuevamente por un minuto en vortex, se agregaron las sales para “salting-out” (1 g NaCl y 4 g MgSO<sub>4</sub>), se agitó manualmente 3 minutos y se colocaron en un agitador orbital por 20 minutos a 200 rpm. Luego se centrifugó cada tubo por 5 minutos a 3500 rpm y se tomaron 5 mL de sobrenadante y se realizó el lavado o “clean-up” con 0.625 g MgSO<sub>4</sub> y 0.125 g de óxido de aluminio, tras lo cual se llevó a vortex por 1 minuto y se centrifugó 5 minutos a 3500 rpm. Finalmente, el extracto así obtenido se filtró (0.45 µm de tamaño de poro) y se pasó a un tubo de centrifuga de 15 mL, manteniendo el eluído a -20 ° C hasta el momento del análisis. En la Figura 15 se esquematiza el procedimiento (European Commission, 2019).

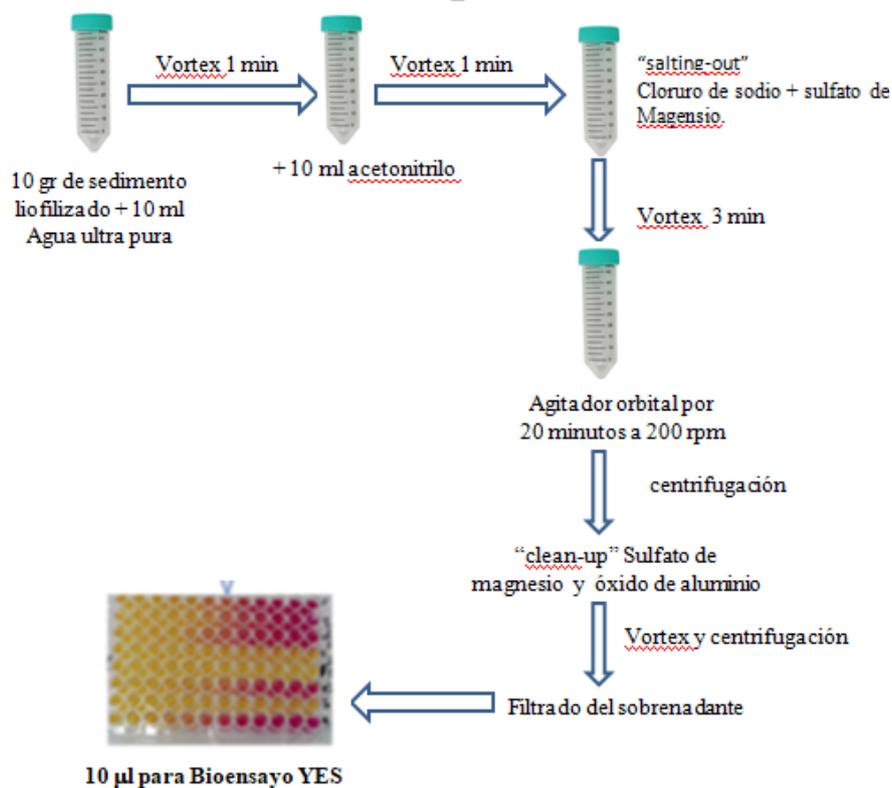


Figura 15. Esquema de extracción QuEChERS para muestras de sedimento de la cuenca del arroyo Maldonado.

### Análisis de los datos

Para determinar la actividad estrogénica de las muestras ambientales, se utilizó la función de Hill (capítulo 1), donde se despeja  $x$  que corresponde a los equivalentes de estradiol (EQ-E2) en  $\text{ng.L}^{-1}$  quedando de esta manera:

$$x = e \left( \frac{d-y}{y-c} \right)^{1/b}$$

---

La actividad estrogénica se expresó en Equivalentes de estradiol (EQ-E2) que se define como la concentración de E2 requerida para producir la misma respuesta observada en la muestra (Bila et al., 2005; Beck et al., 2006). El límite de detección se estimó como se describe en el capítulo 1.

Dado que se puede llegar a observar citotoxicidad en muestras ambientales, se evalúa y controla utilizando la siguiente relación descrita por Frische et al. (2009), como se describe en el capítulo 1

Luego de realizado el bioensayo YES en las muestras ambientales, se obtuvieron los valores de concentración de EQ-E2 en el rango de ng/L. Para calcular la actividad estrogénica en las muestras de agua se multiplicó por un factor de la concentración tomando en cuenta el volumen de re suspensión en el bioensayo, el volumen de agua extraído en los cartuchos SPE y el volumen eluído en la extracción. En el caso de las muestras de sedimento el valor de estrogenicidad (EQ-E ng/L) obtenido en el bioensayo se multiplica por el volumen de re suspensión y se calcula por gramo de sedimento extraído por QuEChERS (EQ-E2 ng/g).

### **Detección y cuantificación de estrogénicos naturales y sintéticos por HPLC**

Para este estudio se analizaron 10 de las 19 muestras de sedimento, las muestras colectadas fueron liofilizadas y enviadas al Laboratorio de Ingeniería Ambiental dirigido por la Dr. Daniela Bila (Universidad Estatal de Río de Janeiro, Brasil). En base a otros indicadores de calidad ambiental se seleccionaron los 10 sitios cubriendo diferentes áreas a lo largo de la cuenca del arroyo Maldonado (González et al., 2022). Estas muestras se extrajeron bajo mismo procedimiento para el YES y se cuantificó BPA, EE2, E2 y E3 a través de HPLC - FLD, cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia. Para la detección y cuantificación de EE2, E2 y E3, se basó en Oliveira et al (2015). Con fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua variando las proporciones temporalmente, con un flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup> y se inyectaron 20µL de muestra. La detección por fluorescencia se realizó con longitudes de onda de 280 y 306 nm, excitación-emisión, respectivamente. Tiempo de corrida de 15

---

minutos.

Para el caso de BPA, se basó en el método desarrollado por Sharma et al. (2015), optimizado por el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UERJ, Río de Janeiro. Usando acetonitrilo:agua, 60:40, v:v como fase móvil. en modo isocrático, a un flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Se inyectó 20 ul de muestra. La detección por fluorescencia se realizó con longitudes de onda de 223 y 300 nm excitación-emisión, respectivamente. Tiempo de corrida de 8 minutos.

En ambos métodos se utilizó una columna Waters PAH C18 5µm, 4.6x250mm en un cromatógrafo líquido Breeze2 (Waters Corporation®).

## **Resultados**

### **Variables Físico-químicas en la cuenca del arroyo Maldonado**

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de los sitios muestreados en la cuenca del arroyo Maldonado: pH, Temperatura (T), Conductividad (K), concentración de oxígeno disuelto (OD). Leyenda ND: No Detectado.

Sitio	pH		T (°C)		K (µS.cm <sup>-1</sup> )		OD (mg.L <sup>-1</sup> )	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
<b>1</b>	8.35	8.5	12.7	19.4	425	439.2	13.1	10.1
<b>2</b>	7.32	7.63	12.1	20.7	93.1	112.3	12	8.5
<b>3</b>	7.45	8.15	12.4	18.63	276	429.6	12	8.9
<b>4</b>	7.75	8.28	12	26.3	178	271.3	13	8.1
<b>5</b>	7.16	7.68	10.9	19.8	73.4	79.1	12.6	8.9
<b>6</b>	7.19	8.19	13.6	20.1	77.43	93.85	12.3	8.5
<b>7</b>	<b>7.64</b>	<b>7.86</b>	<b>14.2</b>	<b>21.3</b>	<b>644</b>	<b>555.3</b>	<b>6.6</b>	<b>3.5</b>

---

<b>8</b>	<b>7.9</b>	<b>7.96</b>	<b>11.5</b>	<b>21.7</b>	<b>588</b>	<b>682</b>	<b>6.7</b>	<b>4.7</b>
<b>9</b>	7.2	7.45	13	24.2	463.7	370.6	9.1	5.5
<b>10</b>	7.98	7.45	13.5	21.6	322	479.2	10.9	6.2
<b>11</b>	<b>7.55</b>	<b>7.53</b>	<b>11.5</b>	<b>21.1</b>	<b>585</b>	<b>636.1</b>	<b>4.5</b>	<b>1.3</b>
<b>12</b>	7.94	7.72	13	23.7	130	159	12	7.4
<b>13</b>	7.94	7.95	10.2	21	178	259.4	12.2	8.4
<b>14</b>	8.04	7.18	11.4	23.3	153.6	188.7	12.63	7.6
<b>15</b>	<b>7.31</b>	<b>7.55</b>	<b>12.3</b>	<b>17.6</b>	<b>892</b>	<b>453</b>	<b>2</b>	<b>3.4</b>
<b>16</b>	7.91	7.7	12.5	16.9	1099	715	12.2	5.1
<b>17</b>	7.24	7.62	12	20.6	304.6	493	8.9	5.8
<b>18</b>	7.57	8.21	13.5	19.6	s/d	8938	12.3	8.4
<b>19</b>	ND	8.63	12.4	18.2	6075	13930	12.4	9

---

Todas las variables fisicoquímicas mostraron variaciones entre los sitios, destacándose la reducción del oxígeno disuelto, por debajo de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  (clase 3 del Decreto 253/79), en los sitios 7 (cañada urbana San Carlos cercana de la Esc. N.º 98), 8 (Cañada sobre Camino de Los Ceibos antes del cruce con Ruta 39, pertenece a la cuenca de drenaje del veredero municipal), 11 (cañada que tiene en su cuenca al tambo Talar, el punto es aguas abajo del mismo) y 15 (cañada urbana, cruce del camino perimetral de Maldonado) (tabla 6). La conductividad presentó los valores más altos en primavera en los sitios 18 (al norte del puente de la Barra) y 19 (sobre la desembocadura del Maldonado).

---

## Determinación de actividad estrogénica en muestras ambientales

La estrogénicidad en agua y sedimento fue estimada a través del bioensayo YES descrito en el capítulo 1. Se realizaron dos ensayos, cada uno con su curva de calibración con E2. En el primer bioensayo, se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de extracto de las muestras de agua, mientras que un segundo bioensayo se realizó con 100  $\mu\text{L}$  de los eluidos para muestras de agua.

Del ensayo I las muestras ambientales de agua invierno y primavera, no se detectó actividad estrogénica en los LD de detección estimada por la curva, tampoco se observó citotoxicidad para ninguna de las muestras (datos no presentados).

Del ensayo II donde se sembrando 100  $\mu\text{L}$  de muestra ambientales de agua, y 10  $\mu\text{L}$  de muestra de sedimento del extracto obtenidos a partir de la metodología QuEChERS. A modo de ejemplo, se presenta la curva de calibración para el segundo bioensayo (Fig. 16), cuyas respuestas se encontraron dentro del rango esperado ( $\text{EC}_{50}=145 \text{ ng.L}^{-1}$ ) y su límite de detección (LD) es de  $49.05 \text{ ng.L}^{-1}$ .

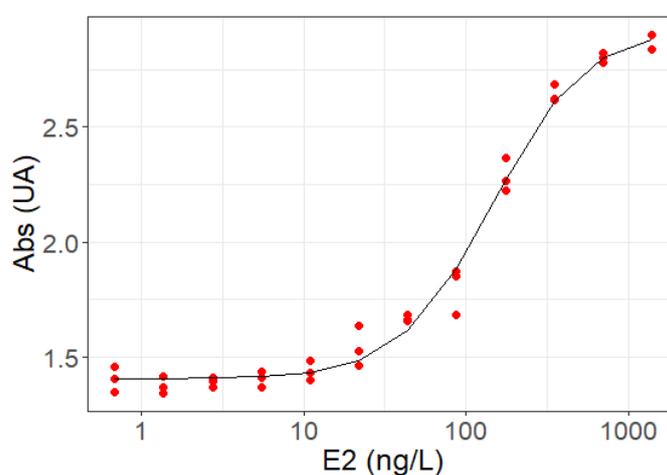


Figura 16. Curva patrón del segundo bioensayo. E2, 17-Estradiol; Abs, absorbancia.

Ninguna de las muestras de agua y de sedimento presenta citotoxicidad según Frische et al., (2009). En el ensayo II se observó cambio de color de amarillo a fucsia en las muestras de agua correspondientes a

---

Cañada Escuela (sitio 7) en invierno y Cañada perimetral en primavera (sitio 15), y en las muestras de sedimento se observó en la correspondiente a Alameda en primavera (sitio 14) (fig.17).

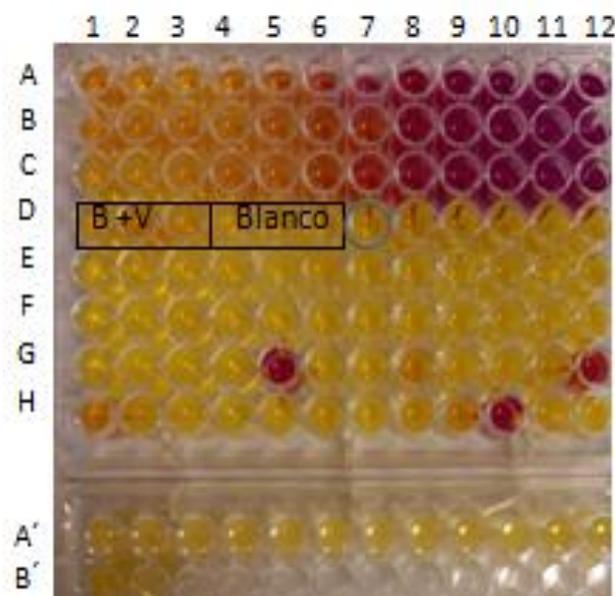


Figura 17. Fotografía del Bioensayo YES II a las 72hs de incubación. Filas A, B, C: control E2; D1 al D3 Blanco con Vehículo; D4 al D6: Blancos; D7 al G7, muestras ambientales de sedimento; G8 al H12 y A', B', muestras ambientales de agua. Donde G5: Cañada escuela invierno; G12: Cañada Perimetral y H10 Alameda ambas muestras en primavera.

Los resultados de los ensayos II de actividad estrogénica a partir de las muestras de agua y sedimento para los puntos muestreados detectó estrogénicidad en 3 de los 19 sitios analizados que correspondieron a zonas urbanas: en una cañada urbana de San Carlos (sitio 7) con  $0.6 \text{ EQ-E ng.L}^{-1}$  y en una cañada urbana de Maldonado (altura de la Perimetral) con  $3.38 \text{ EQ-E ng.L}^{-1}$  (sitio 15) en los eluidos de extractos de agua, mientras que para las muestras de sedimento, solo en el sitio 14, que corresponde a la Alameda de San Carlos (aguas debajo de la descarga del saneamiento de la ciudad con  $2.5 \text{ EQ-E ng.g}^{-1}$ ).

Se detectaron tres sitios con estrogénicidad el 7, 14, y 15. El sitio 7 y 15 corresponden a cañadas urbanas y el 14 en el arroyo San Carlos, donde aguas arriba se encuentra la descarga de la planta de tratamiento de efluentes domésticos de la ciudad de San Carlos (Alameda). Según la cobertura del suelo el sitio 7 y

15 están asociados áreas urbanas con un 100 y 83 % respectivamente, y 14 a Pastizal con 74%. Sin embargo, en el caso del 14, pese a que el uso de suelo está asociado área rural, al encontrarse aguas debajo de la ciudad de San Carlos, se encuentra impactada por la descarga del saneamiento de la ciudad (Fig. 12).

En el análisis de 10 sitios seleccionados en la cuenca, se cuantificaron estrogénicos naturales y sintéticos extraídos en los sedimentos y analizados por HPLC (tabla 7).

Tabla 7. Detección y cuantificación de productos con actividad estrogénica (EDCs) obtenida a través de HPLC. BPA: Bisfenol A; EE2: 17 $\alpha$ -etinilestradiol; E2: 17 $\beta$ - Estradiol; E3: Estriol. ND: No Detectable.

Sitio	BPA ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	EE2 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	E2 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	E3 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
2	0.013 $\pm$ 5.54E-05	ND	ND	ND
3	0.15 $\pm$ 0.009	ND	ND	ND
6	0.014 $\pm$ 0.0019	ND	ND	ND
7	0.025 $\pm$ 0.00066	ND	ND	ND
12	0.013 $\pm$ 2.14E-05	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND
14	0.018	ND	ND	ND
15	0.013 $\pm$ 0.008	ND	ND	ND
18	0.013 $\pm$ 0.00013	0.074 $\pm$ 7.76E-05	0.062 $\pm$ 0.00022	ND
19	0.016 $\pm$ 5.72E-05	ND	ND	0.061 $\pm$ 0.0065

Los resultados obtenidos a través de HPLC de xenoestrógenos, BPA, E2; EE2 y E3, en muestras sedimento, donde de los 10 sitios seleccionados, 9 de los cuales presentaron presencia de uno o más xenoestrógenos. En el sitio 13 no se detectó presencia de EDCs, para los compuestos analizados. En

nueve de ellos se detectó BPA, sitio 2, 3, 6, 7, 12, 14, 15, 18 y 19. En los sitios 14, 15 y 18 se detectaron concentraciones de BPA/EE2/E2 y, por último, el sitio 19 se detectó BPA/E3 (Fig.18).

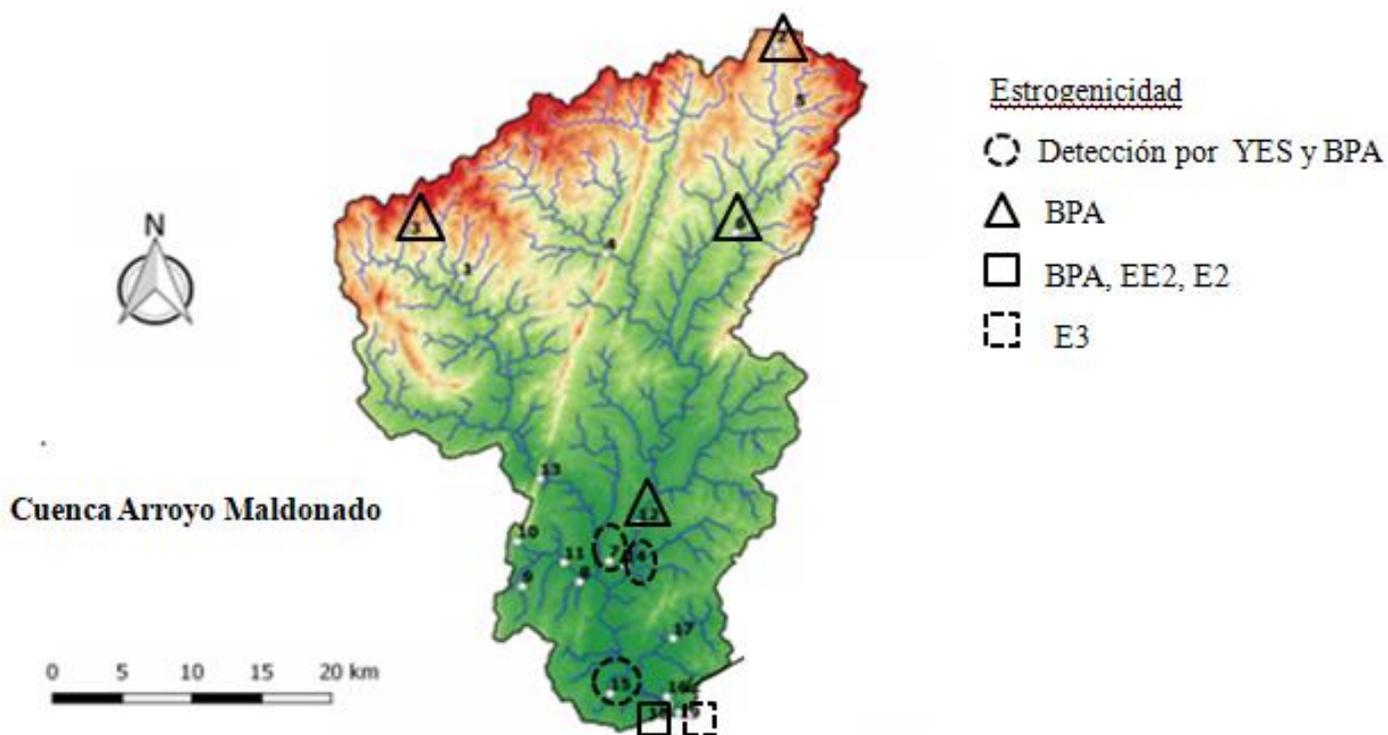


Figura 18. Mapa de estrogénicidad en la cuenca del arroyo Maldonado. La estrogénicidad se presenta por: Ensayo YES y detección de BPA por HPLC representado por círculo punteado; detección por HPLC de BPA representado por triángulo; BPA/EE2/ E2 representados por cuadrado y E3: cuadrado punteado.

---

## **Discusión**

### **Calidad del agua en la cuenca del arroyo Maldonado**

De los datos obtenidos en esta tesis y comparados con el código de aguas (Decreto 253/79) establecido por el Ministerio de Vivienda y Ordenamiento Territorial en el año 1979, la cuenca del arroyo Maldonado pertenece a la clase 3. Para esta clase de cuerpos de agua, los valores de pH se mantienen en el rango establecido como normales (pH entre 6.5 y 8.5). La variación de pH puede tener un efecto sobre la ionización de algunos grupos funcionales de EDCs, pudiendo afectar la estrogenicidad de sustancias químicas en el medio (Li., et al., 2011). Además, el valor de pH puede afectar la capacidad de absorción de algunos compuestos estrogénicos como EE2 neutralizando su actividad (Wang et al., 2014).

Para el caso del oxígeno disuelto (OD) en agua, los valores variaron entre sitios. Los sitios 7, 8 (muestras en primavera), 11 y 15 (ambas muestras en inviernos y primavera), correspondientes a cañadas urbanas no cumplen con los niveles estipulados para cuerpos de agua de la clase 3 (mínimo 5 mg.L<sup>-1</sup>). Los bajos valores de OD se observaron principalmente en primavera. Es posible que los valores bajos de OD sean debidos a la demanda química y biológica de oxígeno resultado de la descarga de contaminantes orgánicos por contaminación fecal o por escorrentía y por el aumento de la temperatura del agua (<https://www.epa.gov/caddis-vol2/dissolved-oxyge>). Los valores más bajos de OD se observaron en el sitio 7 (primavera) y 15 (invierno), 3.5 y 2 mg.L<sup>-1</sup> de OD respectivamente. Ambos sitios se encuentran en cañadas urbanas.

La conductividad reflejó el gradiente ambiental, presentando los valores más altos en primavera en los sitios 18 y 19 ubicados en la desembocadura de la cuenca, lo cual es esperable debido a la condición estuarina y la cercanía al océano Atlántico. Los sitios 11, 14, 15 y 16 presentaron valores cercanos a 1000 µS.cm<sup>-1</sup> considerados salobres (>0.5 g.L<sup>-1</sup>) (ALHA 1992), asociados a sistemas típicos estuarinos (McLusky and Elliott, 2004).

---

## Actividad estrogénica en la cuenca del arroyo Maldonado

Se observó estrogénicidad en tres de los 19 sitios muestreados en la cuenca del arroyo Maldonado utilizando el bioensayo YES. Se resalta que el bioensayo YES es una aproximación bastante conservadora, es decir se obtuvieron valores de límite de detección altos (ensayo II, LD = 49.05 ng.L<sup>-1</sup>), similar a los obtenidos por Kell et al. (2010) y Griffero (2018).

Los sitios donde se observaron estrogénicidad en muestras de agua fueron el sitio 7, cañada urbana ubicada en San Carlos; el sitio 15, cañada urbana ubicada en ciudad de Maldonado. Ambos sitios están asociados a zonas donde el uso de suelo es mayormente urbanizado (tabla 5). Los resultados de las muestras de sedimento, se encontró estrogénicidad en el sitio 14, Alameda, ubicado aguas abajo de la planta de tratamiento de OSE en San Carlos. En los tres sitios donde se encontró actividad estrogénica presentan impacto antrópico. Los valores de actividad estrogénica que se obtuvieron luego de realizado el bioensayo YES, fueron obtenidos a partir de muestras pre concentradas. Para calcular el valor de actividad estrogénica de las muestras ambientales se tuvo en cuenta el factor de concentración. De esta manera, las actividades estrogénicas de las dos muestras de agua y una de sedimento, fueron 0.6 ng EQ-E2. L<sup>-1</sup>, 3.38 ng EQ-E2. L<sup>-1</sup> y 2.5 ngEQ-E2.g<sup>-1</sup> respectivamente. Según la bibliografía estos valores no constituyen un riesgo inmediato para la salud de la comunidad (Russo et al., 2022; Yasdan et al., 2022).

Con respecto a los resultados obtenidos a través de HPLC de xenoestrógenos, BPA, E2; EE2 y E3, en muestras sedimento, donde de los 10 sitios seleccionados, 9 de los cuales presentaron presencia de uno o más xenoestrógenos. Donde el sitio 14 recibe las descargas de la planta de tratamiento de OSE San Carlos y los sitios 7 y 15 que están asociados a zonas urbanas, los sitios restantes están principalmente asociados a zonas donde predomina el pastizal y bosques. Sin embargo, el sitio 18 y 19, ambos asociados a usos de suelo pastizal, se encuentran en zonas donde hay construcciones muy cercanas.

La presencia de actividad estrogénica en varios de estos sitios, podría estar asociada a descargas temporales, de planta de tratamiento y/o a las descargas principalmente en zonas urbanizadas. Existen

---

diversos compuestos que pueden estar actuando como fuente de xenoestrógenos, algunos de ellos pueden tener mayor incidencia en la cuenca sobre el tipo de liberación al medio. Uno de los grupos que pueden estar asociados a la estrogenicidad son las hormonas sexuales naturales, tales como E1 (estrone), E2 (estradiol) y E3 (estriol) y las sintéticos como el EE2 (etinilestradiol) y DES (dietilestilbestrol) que son altamente estrogénicos a bajas dosis y persistente (Allison et al., 2010). Además de los estrógenos, podemos encontrar progestágenos y andrógenos, todos ellos son producidos y excretados en grandes cantidades por la materia fecal humana y animal que finalmente llegan al medio acuático a través del vertido aguas urbanas, junto con aguas residuales de hospitales, aguas residuales de procesamiento de plantas y escorrentías agrícolas y las producidas durante el deterioro natural de las hojas de las plantas (Esteban et al, 2014; Almazrouei et al., 2023), generando un impacto negativo sobre muchas especies silvestres y al humano (Marlatt et al., 2021; Wojnarowski K. et al., 2021, Almazrouei et al. 2023). Otra fuente de xenoestrógeno que puede estar presente en zonas urbanizadas, son los alquilfenoles polietoxilados (AP), un grupo surfactante no iónico que, en las plantas de tratamiento de aguas residuales, son inicialmente biodegradados y derivados en metabolitos estrogénicos, persistentes y altamente lipofílicos, como el nonilfenol (NP) y octilfenol (OP) (Metcalfé et al., 2022). Los alquilfenoles puede estar presente en detergentes, plaguicidas, ceras, entre otros productos de limpieza industrial y domésticos. El bisfenol A (BPA) es un compuesto que, a bajas concentraciones, puede afectar al sistema endocrino (Marlatt et al., 2022), y que es ampliamente utilizado en la síntesis de polímeros (policarbonato, resinas) y en la fabricación de envases de alimentos, contenedores de plástico, biberones, botellas, papel térmico, discos compactos y cosméticos (Tamayo et al., 2022). Estos compuestos son muchas veces descargados directamente a los efluentes, donde sus niveles son mayores en sitios cercanos a zonas urbanizadas o asociados a descargas agrícolas o industriales (Gorga et al., 2015). Tanto alquilfenoles y BPA, debido a su naturaleza hidrofóbica, tienden a acumularse en el sedimento actuando como sumidero y depósito de contaminantes a largo plazo y como fuente de

---

contaminantes a través de la re suspensión, representando así una amenaza potencial para los organismos acuáticos (Salgueiro et al., 2018).

Hay que tener presente que los resultados son bastante alentadores, no se observa niveles preocupantes de estrogenicidad en los 3 sitios donde se encontró actividad estrogénica, por ejemplo en sedimento el valor obtenidos fue de  $2.5 \text{ ng EQ-E2.g}^{-1}$ , comparados con otros estudios en el río Santa Lucía en Uruguay donde el valor máximo registrado fue de  $170 \text{ ng EQ-E2.g}^{-1}$  (Griffero, 2018). A su vez se debe considerar la complejidad de las matrices ambiental y sus efectos sobre la respuesta del bioensayo YES, ya que en algunos casos los resultados pueden verse afectados por la aparición de sustancias citotóxicas (Frische et al., 2009), como también los efectos de los antiestrogénicos (Argolo et al., 2023). También, la relativamente alta lipofilicidad y la capacidad de absorción del EDC estrogénico indican una afinidad con la materia orgánica disuelta y particulada, lo que sugiere un mecanismo de fraccionamiento inherente en matrices ambientales acuosas (Birkett et al., 2003). La materia orgánica disuelta puede interaccionar en el mecanismo de unión del compuesto EDC con el receptor (Tong et al., 2019), de esa manera es reducida la biodisponibilidad del contaminante en el bioensayo (Ma et al., 2018).

Las sustancias húmicas producen efectos antagónicos en el bioensayo YES, ya que no sólo pueden reducir la biodisponibilidad de los estrógenos, sino que también interfieren con el mecanismo del ensayo a través de la inhibición enzimática, enmascarando así el potencial estrogénico de la muestra (Argolo et al., 2023). Por lo tanto, el potencial estrogénico de las muestras ambientales ricas en materia orgánica disuelta puede subestimarse mediante el bioensayo YES y métodos análogos (Argolo et al., 2023).

Si comparamos los resultados obtenidos por el bioensayo YES y la presencia de xenoestrógenos por HPLC en muestras de sedimento, solo el sitio 14 presentó actividad estrogénica a través del bioensayo YES y la presencia de BPA. El hecho que no se obtuvo estrogenicidad en el resto de los sitios puede deberse a las interferencias mencionadas anteriormente, así como también a la sensibilidad de la metodología, que aunque presente una sensibilidad de  $\text{ng.L}^{-1}$  en agua y  $\text{ng.g}^{-1}$  en sedimento, muchos de podrían estar en concentraciones en el orden de los  $\text{pg.L}^{-1}$  y  $\text{pg.g}^{-1}$

---

Los resultados del bioensayo YES está sujeto a factores intrínsecos de la muestra ambiental que pueden influir en la respuesta estrogénica medida. Es así que la interpretación de los resultados debe realizarse junto con la evaluación de los parámetros de caracterización de la materia orgánica, citotoxicidad y actividad antiestrogénica (Argolo et al., 2023). Teniendo presente las interferencias que se pueden presentar, los bioensayos son herramientas muy útiles en el monitoreo ambiental y la evaluación de riesgos de sustancias químicas (Dingemans et al., 2019 ; Schuijt et al., 2021 ), permitiendo la evaluación de respuestas biológicas a una muestra compleja determinada, incluidas posibles interacciones de diferentes contaminantes ( Gómez et al., 2021 ; Martyniuk et al., 2022). Además, la importancia del monitoreo debido al impacto potencial a largo plazo de los xenoestrógenos en la salud humana y el medio ambiente en bajas concentraciones aún no se ha dilucidado (Jari et al., 2022). Es así, que los xenoestrógenos se han categorizado como un "riesgo no cuantificado" (Yazdan et al., 2022). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado que los xenoestrógenos en concentraciones bajas ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) son potencialmente menos dañinos para la salud humana, pero enfatizó la necesidad de limitar la existencia de tales compuestos en el agua (Jari et al., 2022; Chiang et al., 2020).

La regulación a nivel mundial de los EDCs es escasa, pese a los estudios del impacto que presentan los EDCs en el medio acuático y salud humana. Con respecto a las regulaciones a nivel de la Unión Europea existen reglamentaciones y según cada país, cuáles son los parámetros a seguir (Reglamento (UE) 2018/605 De la Comisión, anexo II del Reglamento (CE) nº528/2002 y nº 1107/2009) donde se establecen los criterios para etiquetar una sustancia como “EDCs” y propone estrategias de prueba escalonadas. Otros programas que abordan la detección de los niveles de EDCs son los de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), así como la gestión de productos químicos (CMP) en Canadá (Martyniuk et al., 2022). Los compuestos alquilfenólicos como el nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP) se prohibió en gran medida la comercialización y el uso por parte de Unión Europea (directiva 2008/105/CE).

---

En Uruguay, son múltiples los productos utilizados que contienen alquifenoles etoxilados en sus formulaciones. Encontramos múltiples productos de uso sanitario (productos de limpieza, desinfección de uso doméstico e industrial) registrados en el Ministerio de Salud Pública de uso autorizado que contienen este tipo de compuestos (DIGESA, MSP).

En muchos países, entre ellos Uruguay no existe un inventario de estos compuestos como tampoco su regulación.

Una de las estrategias para poder reducir su presencia en el medio acuático, es eliminar de manera progresiva los químicos con actividad EDC, y sustituirlos por alternativas más seguras. Además, es necesario incrementar el conocimiento sobre el origen, transformación y los efectos de estos contaminantes, como también mejorando los mecanismos de tratamiento del agua, con el fin de garantizar una calidad del agua, reduciendo los riesgos y efectos para la salud humana y ambiental.

### **Conclusiones**

Se logró con éxito poner a punto el bioensayo YES en el CURE- UdelaR. El bioensayo YES puede ser utilizado para analizar xenoestrógenos, así como también para determinar sustancias con potencial actividad estrogénica en muestras ambientales. Este hecho es de gran utilidad porque nos permite poder analizar la estrogénicidad en diferentes matrices ambientales. También, fueron determinados algunos parámetros que describen el desempeño analítico del método, obteniéndose valores aceptables. Este es un bioensayo de respuesta a estrogénicidad presentando ventajas frente a los analíticos, ya que en el correr del tiempo los compuestos químicos van cambiando algunos se prohíben, aparecen nuevos, y la estrogénicidad es la respuesta toxicológica frente a ellos.

---

Los resultados obtenidos de este estudio demostraron que la contaminación de EDCs es baja en la cuenca del arroyo Maldonado, y los sitios donde se detectó estrogenicidad están asociados a descargas temporales en zonas urbanizadas y a plantas de tratamiento del saneamiento.

### **Consideraciones finales**

El bioensayo YES luego de ponerse a punto en el CURE fue utilizado con éxito en dos proyectos, en colaboración con la Facultad de Química, Proyecto Titulado: “Biotransformación de 17 alfa-etinestradiol empleado hidrogeles activos de lacas de *“Dichostereum sordulentum”* (Facultad de Química, Área Bioquímica, Proyecto a cargo de Dra Gioia Larissa, Menendez Pilar, Karen Ovsejevi, Valeria Vazquez), y para el trabajo experimental del Lic. Wintson Aparicio en su trabajo final de Gestor Ambiental, Titulado: “Monitoreo de estrogenicidad en productos de uso cotidiano” (CURE- UdelaR).

Es importante seguir trabajando para mejorar la sensibilidad del bioensayo y así poder obtener un límite de detección aún más bajos. Para esto se plantea tener presente el tiempo de almacenamiento de la cepa YES en -80°C, siempre contar con soluciones frescas, poder reducir el tiempo de incubación del bioensayo YES.

Si bien se testeó una primera aproximación del potencial efecto de la salinidad en muestras de agua superficial por SPE (capítulo 1), no se encontró un efecto en el rango analizado. Queda pendiente realizar distintas extracciones de estrogénicos en sedimento a través de QuEChERs. Además, luego de obtenido el extracto de QuEChERs se podría realizar una microextracción con una gota del inglés “single drop microextraction (SDME) y así concentrar más la muestra. Es importante tener presente la complejidad de las matrices ambientales y sus posibles interferencias, habría que junto a la determinación de la actividad estrogénica también evaluar la actividad antiestrogénica que podría enmascarar los resultados obtenidos.

Sería de gran importancia poder revisar el procedimiento normativo que rigen la aprobación de la importación de productos químicos con potencial estrogénico que ingresan al país, incorporar

---

regulaciones de otros países como Unión Europea a los controles ambientales. Y poder controlar reducir y regular la liberación de estos al medio ambiente.

---

## Bibliografia

- Acir I.H., Guenther K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates - a critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation *Sci. Total Environ.*, 635, 1530-1546.
- Amenyogbe E., Chen G., Wang Z., Lu X., Lin M., Ying Lin (2020). A Review on Sex Steroid Hormone Estrogen Receptors in Mammals and Fish. *Hindawi International Journal of Endocrinology*. 5386193
- Almazrouei B., Islayem D., Alskafi F., Krystelle C M., Amna R., Nasrat S., Sizirici S., Yildiz I. (2023) Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. *Emerging Contaminants*. 9 (2), 100210.
- Ankley, G. T., Coady, K. K., Gross, M., Holbech, H., Steven, L., Maack, G., y Williams, M. (2018). A Critical Review of the Environmental Occurrence and Potential Effects in Aquatic Vertebrates of the Potent Androgen Receptor Agonist 17 $\beta$ Trenbolone. *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (8), 2064–2078.
- APHA. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Arias M.P., Castro-Feijóo L., Carreiro J., Rodriguez P. (2020). A review on endocrine disruptors and their possible impact on human health. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 11. Número 2.
- Argolo A.S, Gomes G., Bila D.M. (2021). Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: distribution between particulate and dissolved phases *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 208,111574
- Argolo A.S., Gomes G., Bila D.M. (2023). (Anti) estrogenic activity impacted by complex environmental matrices: A DOM and multiphase distribution approach *Chemosphere*, 310, 136, 17+
- Arnold K. E., Brown A.R., Ankley G.T, Sumpter J.P. (2014). Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Phil. Trans. Biol. Sci.*, 369. 20130569
- Barton-Maclaren T.S.,Wade M.,Basu N, Bayen N., Grundy J., Marlatt V., Moore R., Parent L., Parrott J., Grigorova P., Pinsonnault-Cooper J., Langlois V.S.(2022). Innovation in regulatory approaches for endocrine disrupting chemicals: The journey to risk assessment modernization in Canada *Environ. Res.*, 204 (Pt C), 112225.
- Beck I.C., Bruhn R., Gandrass R. (2006). Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere* 63, 1870–1878.
- Beresford E. J., Routledge C. A., Harris, Sumpter J.P. (2000). Issues Arising When Interpreting Results from an in Vitro Assay for Estrogenic Activity N. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162, 22–33.

- 
- Bila, D. M. (2005). Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 $\beta$ -Estradiol pelo Processo de Ozonização, Tese de Doutorado, UFRJ/COPPE.
- Birkett J.W., Lester J.N. (2003). Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process (first ed.), CRC Press LLC. 6 (4), 325-326.
- Bistan M., Podgorelec M., Marin R.L., Ti T. (2012). Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technol. Biotechnol.* 50 (4), 427–433.
- Boqué, R. (2004). El límite de detección de un método analítico. *Universitat Rovir Virgili*, 9. <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf>
- Brix, R., Noguerol, T.N., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A.J., Tollefsen, K.E., Levy, W., Schramm, K.W. & Barceló, D. (2010). Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International* 36, 361–367.
- Carnevali O., Santangeli S., Forner-Piquer I., Basili D., Maradonna F. (2018). Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes? *Fish Physiol. Biochem*, 44, 1561-1576.
- Carpenter D.O. (2013) Effects of persistent and bioactive organic pollutants on human health. Wiley: 1-608.
- Chaves F.P., Gomes G., Della-Flora A., Dallegrave A., Sirtori C., Saggiaro E.M., Bila D.M. (2020). Comparative endocrine disrupting compound removal from real wastewater by UV/cl and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: effect of pH, estrogenic activity, transformation products and toxicity *Sci. Total Environ.* 746, 14104.
- Chiang, Y.R.; Wei, S.T.S.; Wang, P.H.; Wu, P.H.; Yu, C.P. (2020). Microbial degradation of steroid sex hormones: Implications for environmental and ecological studies. *Microb. Biotechnol.* 13, 926–949.
- Damstra, T., Bergman, A., Kavlock, R., y Van Der Kraak, G. (Eds.). (2008). Introduction. En: *Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors*. World Health Organization. 1-6
- Delbes G., Blázquez M., Fernandino J. I., Grigorova P., Hales B.F., Metcalfe C., Navarro-Martín L., Parent L., Robaire B., Rwigemera A., Van Der Kraak G., Wade M., Marlatt V. (2022). Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals *Environ. Res.*, 204 (Pt B), 112040.
- DECRETO 253/79, 253 1 (1979).
- Dimogerontas, G., & Liapi, C. (2014). Endocrine Disruptors (Xenoestrogens): An Overview. In T. Eliades & G. Eliades (Eds.). *Plastics in Dentistry and Estrogenicity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 3-48.
- Du Plessis M, Fourie C, Stone W, Engelbrecht AM. (2023). The impact of endocrine disrupting compounds and carcinogens in wastewater: Implications for breast cancer. *Biochimie.* 209, 103-115.
- Edwards, T.M., Morgan, H.E., Balasca, C., Chalasani, N.K., Yam, L., Roark, A.M. (2018). Detecting Estrogenic Ligands in Personal Care Products using a Yeast Estrogen Screen Optimized for the Undergraduate Teaching Laboratory. *J. Vis. Exp.* 131, 55754.

---

Esteban S., Gorga M., Petrovic M., González-Alonso S., Barceló D., Valcárcel Y. (2014). Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Sci. Total Environ.* 466–467, 939–951.

European Commission. (2019). Method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

Fent, K., Escher, C., & Caminada, D. (2006). Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 175–185.

Frische M., Faust W., Meyer T., Backhaus (2009). Toxic masking of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen.(YES) *Rein. ciencia contamin. Res.*, 16, 593 – 603.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babaï, D., Portier, C.J. & Mc Donnell, D. P.(1997).Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143(1), 205–212.

García-Alonso J, Hoeger U, Rebscher N. (2006). Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): effect of estradiol-17 $\beta$  on eleocytes. *Comp Biochem Physiol.* 143A, 55–61.

García-Alonso, J., Greenway, G.M., Munshi, A. Gómez, J.C., Mazik, K.A., Knight, W.J., Hardege, D. & Elliott, M. (2011). Biological responses to contaminants in the Humber estuary: disentangling complex relationships. *Marine Environmental Research* 71, 295-303.

Gil J. M., Soto M. A, Usma I. J., Gutiérrez D. O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Art.de revisión.*7 (2), 52-73

Gomes G., Argolo A.S., da Cruz Felix L. a , Bila D.M.(2023) Interferences in the yeast estrogen screen (YES) assay for evaluation of estrogenicity in environmental samples, chemical mixtures, and individual substances *Toxicology in Vitro.* 88, 105551.

González A., Palacios I., Domínguez A.L. (2021). Evaluación espacio-temporal de la calidad de las aguas en la Cuenca Hidrográfica Guaos-Gascó. *Rev. Cubana Quím.* 33 (1), 2224-5421.

Gore A.C. (2014) Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) – A Guide for Public Interest Organizations and Policy-makers. Endocrine Society.

Gore AC, Chappell V, Fenton S, Flaws JA, Nadal A, Prins GS. (2015). EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 36 (6), 1–150.

Gorga M., Insa S., Petrovic M., Barceló D. (2015). Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Science of the Total Environment* 503–504, 69–86

Griffero L., Gomes G., Berazategui M., Fosalba C., Teixeira de Mello F., Rezende C.E., Bila D.M., García Alonso J. (2018). Estrogenicity and cytotoxicity of sediments and water from the drinkwater source-basin of Montevideo city, Uruguay *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 13,15-22.

---

Grilo, T., Rosa R. (2017). Intersexuality in Aquatic Invertebrates: Prevalence and Causes Science of the Total Environment, 592, 714-728.

Gubbi S., Wurth R., Hannah-Shmouni F., and Koch Ch.A. (2023). Environmental Endocrinology. Pivonello R., Diamanti-Kandarakis (Ed). Environmenta. Environmental Endocrinology and Endocrine Disruptors Endocrine and Endocrine-targeted Actions and Related Human Diseases. 1-45.

He J, Xu J., Zheng M., Pan K., Yang L., Ma L., Wang Ch., Yu J. (2024) Thyroid dysfunction caused by exposure to environmental endocrine disruptors and the underlying mechanism: A review. Chemico-Biological Interactions. 391, 110909.

Hileman, B. (1994). Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer. Chemical & Engineering News, 72(5), 19-23

Houtman, C. J., Legler, J., & Thomas, K. (2011). Effect Directed Analysis of Endocrine Disruptors in Aquatic Ecosystems. In W. Brack (Ed.). Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 237-265.

Jarošová B., Bláha L., Giesy J.P., Hilscherová K. (2014). What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste: waters can be considered as safe? Environment International 64, 98-109.

Jari, Y.; Roche, N.; Necibi, M.C.; El Hajjaji, S.; Dhiba, D.; Chehbouni, A. (2022). Emerging pollutants in moroccan wastewater: Occurrence, Impact, and removal technologies. Journal of Chemistry, 1-24.

Kabir, E., Sharfin, M. & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environmental Toxicology and Pharmacology 40, 241–258.

Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G. V., Montano, M., Sun, J., Weis, K., & Katzenellenbogen, J. A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: Selective ligands and receptor pharmacology. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 74(5), 279–285.

Kase R; Hansen PD; Fischer B; Manz W; Heininger P; Reifferscheid G (2008). Integral assessment of estrogenic potentials of sediment-associated samples. Part 1: The influence of salinity on the in vitro tests ELRA, E-Screen and YES. Environmental science and pollution research international. 15 (1), 75-83.

Keay J., Bridgham J. T, and Thornton J. W. (2006). The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. Endocrinology, 147 (8), 3861- 3869.

Keel, K., Míguez, D., Soares, A., Parodi, A. (2010). Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de Saccharomyces cerevisiae recombinante. Revista anual del laboratorio Tecnológico del Uruguay. Nº 5, 34- 38.

Khetan S.K. (2014). Endocrine Disruptors in the Environment. Wiley, 376.

- 
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Evans, R. & Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS* 104, 8897-8901.
- Kolle S.N., Kamp H.G., Huener H., Knickel J., Verlohner A., Woitkowiak C., Landsiedel R., Van Ravenzwaay B. (2010). In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays *Toxicol. in Vitro*, 24, 2030-2040.
- Korytny, L. M. (2017). The basin concept: From hydrology to nature management. *Geography and Natural Resources*, 38(2), 111-121.
- Kunz C., Kienle M., Carere N., Homazava R., Kase. (2015). In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. biomedicina Anal*, 106, 107 – 115
- Kurşunoğlu N.E., Sarer Yurekli B. P., (2022). Endocrine disruptor chemicals as obesogen and diabetogen: Clinical and mechanistic evidence. *World J Clin Cases*; 10(31), 11226-11239
- Kuster M., Lopez M.J, Hernando D., Petrovicac M., J., Alonso M., Barceló D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology* 358 (1-2), 112-123.
- Ma L., Yates S.R. (2018). Dissolved organic matter and estrogen interactions
- Machineni L. (2019). Review on biological wastewater treatment and resources recovery: attached and suspended growth systems. *Water Sci. Technol.*, 80, 2013-2026 regulate estrogen removal in the aqueous environment: a review *Sci. Total Environ.*, (640), 529-542
- Malgor L., y Valsecia M. (2000). *Farmacología Médica*. 2. (26), 1-9
- Marconetto A., Babini A., Ñañez A., Moreno L., Rosato O., Fux Otta C. (2022). Principales Disruptores Endocrinos Vinculados con salud reproductiva femenina: bases biológicas de su asociación. *Revisión Médica (Buenos Aires)*, 82, 428-43.
- Martyniuk R., Martínez L., Navarro M., JKamstra J.H., Schwendt A., Reynaud S., Chalifour L. (2022) Emerging concepts and opportunities for endocrine disruptor screening of the non-EATS modalities. *Reinar. Res.*, 204
- Matozzo, V., Gagné, F., Gabriella, Marin, M.G., Ricciardi, F. & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ Internation* (34), 531–545.
- Marlatt V.L, Bayen S., Castaneda-Cort`es D., Delb`es D., Grigorova P., Langlois V.S, Martyniuk C.J., Metcalfe C.D., Parent D., Wigemera D., Thomson P., Van Der Kraak G. (2022). Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environmental Research* 208, 112584.
- Matthews J., Gustafsson J.A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 35, 281-92.

- 
- McLusky D.S. and Elliott M. (2004). The estuarine environment. (Ed). McLusky D.S. and Elliott M. The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management. 1-35.
- Metcalfé CD; Bayen S; Desrosiers M; Muñoz G; Sauvé S; Yargeau V(a) (2022) State-of-the-art monitoring, chemical analysis, and environmental levels of EDCs. Environmental research. 207, 112658.
- Metcalfé CD; Bayen S; Desrosiers M; Muñoz G; Sauvé S; Yargeau V.(b) (2022) Methods for the analysis of endocrine disrupting chemicals in selected environmental matrixes. Environmental Research. 206, 112616
- Mesnage R., Phedonos A., Biserni M., Arno M., Balu S., Corton J.C., Ugarte R., Antoniou M.N. (2017). Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. Food Chem. Toxicol., 08, 30-42
- Moggs JG, Orphanides G. (2001). Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. EMBO rep; 2 ,775-781.
- Nascimento M.T.L., Santos A.D., Felix L.C., Gomes G., De Oliveira L., Da Cunha D., Vieira N., Hauser-Davis R.A., Baptista Neto J.A., Bila D.M.(2018) Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, southeastern Brazil Ecotoxicol. Environ. Saf., 149,197-202.
- Noriega Reyes, Y., & Langley McCarron, E. (2008). Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. Cancerología, 3, 29–40
- Norris, D.O. & Carr, J.A. 2006. Representative EDCs in Animals. En: Endocrine Disruption: Biological Basis for Health Effects in Wildlife and Humans. Norris, D.O. & Carr, J.A. (Eds), 225-463, Oxford University Press, Oxford.
- Li H., Dong Z., Weng Q., Chang C.-C., Liu B. (2015). Emerging Pollutants – Part I: Occurrence, Fate and Transport. Water Environ. Res. 87 (10),1849–1872.
- Lira-Silva, E., Silva-Palacios, A., Roldán-Gómez F.J., Pavón, N. (2022). Estrógenos, su papel más allá de la reproducción. Revisión Mexicana de orientación Educativa. 19 (43),1-15.
- OAS, & CIEMSA. (2012). Sistema de saneamiento Maldonado – Punta del este ESTACIONES DE BOMBEO Y PLANTA DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES MANUAL DE OPERACIÓN.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., & Oehlmann, J. (2004). Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. International Review of Cytology, 236, 1-44.
- Oliveira H.G, Ferreira L.H-, Bertazzoli R., Longo C. (2015). Remediation of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol aqueous solution by photocatalysis and electrochemically-assisted photocatalysis using TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> electrodes irradiated by a solar simulator. In Water Research.72, 305-314.

---

Osborne C. K. (1998). "Steroid hormone receptors in breast cancer management," *Breast Cancer Research and Treatment*, 51, (3), 227–238.

Pal A., K.Y. Gin, A.Y. Lin, Reinhard M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects *Sci Total Environ*, 408, 6062-6069

Papalouand O., Kandaraki E.A. (2023). The Role of the Environment in Female Reproductive Disorders Pivonello R., Diamanti-Kandaraki (Ed). *Environmenta. Environmental Endocrinology and Endocrine Disruptors Endocrine and Endocrine-targeted Actions and Related Human Diseases*. 184-203.

Pereira, S.V., Reis, T., Souza, B.S., Dantas, R.F., Azevedo, D.A., Dezotti, M., Sans, C. & Esplugas, S. (2015). Oestrogenicity assessment of s-triazines by-products during ozonation. *Environmental Technology* 36(9-12), 1538-46.

Piovorello R., Diamanti- Kandaraki E. (2023) *Environmental Endocrinology and Endocrine Disruptors*.

Pérez-Rivero J.J, Aguilar-Setién A., Villa-Godoy A., Serrano H. (2005). Relationship between structure and function of receptors for steroid hormones: Estrogen receptors. *Vet. Méx.*, 36 (4).

Porcher, J.M., Devillers, J. & Marchand-Geneste, N. (2009). Mechanisms of Endocrine Disruptions. A tentative overview. En: *Endocrine Disruption Modeling. QSAR in Environmental and Health Sciences*. James Devillers (Ed), 11-46.

Ramírez-Sánchez, I. M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M. A., & Bandala, E. R. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(5), 31-42.

Robitaille J., Denslow N.D., Escher B.I., Kurita, Marlatt V., Martyniuk C.J., Navarro L., Prosser R., Sanderson T., Yargeau V., Langlois V.S. (2022). Towards regulation of Endocrine Disrupting chemicals (EDCs) in water resources using bioassays – A guide to developing a testing strategy. *Environment Reserch*. 205, 112483.

Routledge E.J. and Sumpter J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241–248.

Russo G., Laneri S., Di Lorenzo R., Neri I., Dini I., Ciampaglia R. and Grumetto L. (2022). Monitoring of Pollutants Content in Bottled and Tap Drinking Water in Italy. *Molecules*. 27, 3990.

Salgado Zamora, H., Azpeitia Hernández, A., Marañón Herrera, S., y Maya Peña, E. (2008). Anabolic and androgenic effect of steroid trenbolone acetate on guppy (*Poecilia reticulata*). *Veterinaria México* 39 (3), 269–277

Salgueiro-Gonzalez, Castiglioni S., Zuccato E., Turnes-Caroua I., Lopez-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S. (2018). Recent advances in analytical methods for the determination of 4-alkylphenols and bisphenol A in solid environmental matrices: a critical review. *Anal. Chim. Acta*, 1024, 39-51

---

Saggioro E.M., Chaves F.P., Felix L.C., Gomes G., Bila D.M. (2019). Endocrine disruptor degradation by UV/chlorine and the impact of their removal on estrogenic activity and toxicity *Int. J. Photoenergy*, 1-9.

Sharma J., Mishra I.M., Vineet K. (2015). Degradation and mineralization of Bisphenol A (BPA) in aqueous solution using advanced oxidation processes: UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> oxidationsystems. In *Journal of Environmental Management*. 156, 266-275

Sharma S., Bhattacharya A. (2017). Drinking water contamination and treatment techniques *Appl. Water Sci.*, 7, 1043-1067

Singhal N., Song Y., Johnson A., Swif. 2009. Estrogenic endocrine disrupting compounds: review and analytical procedures for GC-MS and ELISA. Auckland Regional, Council. Environmental Reserch. New Zelanda

Scaglia, H., Chichizola, C., Franconi, M. C., Ludueña, B., Mastandrea, C., y Scaglia, J. (2009). Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo. *Reproducción*. 24, 74–86

Tamayo F., Agaméz, J., Aparicio D. y Márquez J. (2022). Bisfenol A y efectos de la disrupción endocrina en humanos y animales: Revisión sistemática. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(2), 175 -200.

Tong X., Y. Li, F. Zhang, X. Chen, Y. Zhao, B. Hu, X. (2019). Zhang Adsorption of 17β-estradiol onto humic-mineral complexes and effects of temperature, pH, and bisphenol A on the adsorption process *Environ. Pollut.*, 254, 112924

Thongprakaisang S., Thiantanawat A., Rangkadilok N, T. Suriyo T., J. Satayavivad J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors *Food Chem. Toxicol.*, 59,129-136

UNESCO. (2019) Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los Recursos Hídricos. Francia. 198. ISBN 978-92-3-300108-4

Vasquez V., Giorgi V, Bertone A., García J., Bonfiglio F., Ovsejevi K. , Menéndez P. , Gioia L. (2023). Biotransformación de 17 alfa-etinilestradiol empleando hidrogeles activos de lacasa de *Dichostereum sordulentum*. Poster ENAQUI 8. 8vo Encuentro Nacional de Química - Montevideo, Uruguay.

Wang, L., Ying, G., Zhao, J., Liu, S., Yang, B., Zhou, L., Tao., R. & Su, H. (2011). Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao Riversystem in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution* 159, 148-156.

Wang, Y., Zhou, J. (2013). Endocrine disrupting chemicals in aquatic environments: A potential reason for organism extinction? *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 16(1), 88 – 93

---

Wieczerek M., Kudlak B., Yotova G., Nedyalkova M., Tsakovsk Si, Simeonov V., Namieśnik J. (2016) Modeling of pharmaceuticals mixtures toxicity with deviation ratio and best-fit functions models *Sci. Total Environ.*, 571, 259-268.

Wong C., McNally C., Nickbarg E., Komm B.S., Cheskis B. (2002). Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* ;99, 14783-14788.

Wojnarowski K., Podobiński P., Cholewińska P., Smoliński J.i, Dorobisz K. (2021). Impact of estrogens present in environment on health and welfare of animals. *Animals*, 11, 2152

Xia Z., Gale W.L., Chang X. (2000). Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor  $\beta$ . *General and Comparative Endocrinology*,118, (1),139–149.

Yang, D., Yang, Y., Xia, J. (2021). Hydrological cycle and water resources in a changing world: A review. *Geography and Sustainability* 2, 115-122.

Yazdan, M.M.S.; Kumar, R.; Leung, S.W. (2022). The Environmental and Health Impacts of Steroids and Hormones in Wastewater Effluent, as Well as Existing Removal Technologies: A Review. *Ecologies*, 3, 206–224.

Yu H., D.J., Caldwell, Suri R.P. (2019). In vitro estrogenic activity of representative endocrine disrupting chemicals mixtures at environmentally relevant concentrations *Chemosphere*, 215, 396-403.

Zhou, J., Cai, Z.-H. & Zhu, X.-S. (2010). Are endocrine disruptors among the causes of the deterioration of aquatic biodiversity? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6 (3), 492–498.