

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS**

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

# **ESTROGENICIDAD EN LA CUENCA DEL RÍO SANTA LUCÍA**

**Autora: Lic. Luciana Griffero Ramilo**

**Director: Javier García-Alonso**

**Co-Director: Franco Teixeira de Mello**



# **Estrogenicidad en la cuenca del Río Santa Lucía**

Autora: Luciana Griffero Ramilo ([lugrif@gmail.com](mailto:lugrif@gmail.com))

Director: Javier García-Alonso ([jgalonso@cure.edu.uy](mailto:jgalonso@cure.edu.uy))

Co-Director: Franco Teixeira de Mello ([frantei@fcien.edu.uy](mailto:frantei@fcien.edu.uy))

## RESUMEN

La intensificación en los últimos decenios de las actividades antrópicas ha provocado la liberación de cientos de contaminantes que se han dispersado en el ambiente. Particularmente, existe un gran interés científico en un grupo heterogéneo de sustancias químicas denominadas perturbadores endócrinos (PEs) que, mediante la alteración de las señales químicas internas en los organismos, comprometen la capacidad reproductiva y el desarrollo sexual en numerosas especies. Algunas de ellas pueden actuar imitando las señales estrogénicas, a este conjunto de compuestos se les conoce como xenoestrógenos. Abarcan sustancias con diferentes estructuras, incluyendo hormonas sintéticas y naturales, sustancias naturales y una gran cantidad de sustancias sintéticas como pesticidas, plastificantes y metales pesados. El objetivo general de este trabajo fue determinar la actividad estrogénica en sedimentos de la cuenca del Río Santa Lucía mediante el ensayo *in vitro* YES y analizar su variación a lo largo de la misma. Los principales resultados en este estudio fueron que, se halló estrogénicidad en 13 de los 42 sitios analizados. La cuenca con mayor presencia de estrogénicidad fue la del Colorado con un 55% de los sitios estrogénicos. Si bien la mayoría se asocian a zonas de alta urbanización, y agricultura como ocurre en la cuenca del Colorado, también se encontró estrogénicidad en sitios asociados con otros usos del suelo como la ganadería intensiva. En función de los resultados obtenidos se sugiere incluir como herramienta de monitoreo el uso de este tipo de bioensayos dado a que otorgan medidas rápidas y redituables de una variable como la estrogénicidad que si bien no se incluye dentro de los parámetros establecidos como estándares de calidad de agua, los xenoestrógenos poseen efectos nocivos tanto para la biota asociada a sistemas acuáticos como para la calidad del agua que se consume.

## ABSTRACT

The intensification of human activities in recent decades has resulted in the releasing of hundreds of pollutants into the environment. In particular, there is great concern on a heterogeneous group of chemicals called endocrine disruptor chemicals (EDCs) which, by altering the internal chemical signals in organisms, compromise among other functions the reproductive capacity and sexual development in many species. Some of them act by mimicking estrogenic signals, these compounds are known as xenoestrogens. They include substances with different structures, like natural and synthetic hormones, natural substances and a large number of synthetic compounds such as pesticides, plasticizers and heavy metals. The overall objective of this work was to determine the estrogenic activity in sediments of the Santa Lucia River Basin using the *in vitro* YES assay analysing its variation along the basin. Estrogenicity was found in 13 of the 42 sites analysed. The Colorado creek showed the greater presence of estrogenicity. While most sites with estrogenicity are associated with highly urbanized and agriculture areas, (e.g. Colorado creek), estrogenicity also was found in different sites associated with other land uses such as intensive farming. This is the first time on characterize a basin by its estrogenicity in Uruguay, suggesting the employment of these kinds of bioassays as a tool for environmental monitoring. YES test provides quick and profitable measures of estrogenicity.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director Javier García-Alonso y mi co-director Franco Teixeira de Mello quienes me han guiado, participado en los muestreos y sobre todo han hecho posible el desarrollo de este trabajo, gracias por su dedicación y aportes fundamentales a todo lo que he realizado. A Claudia Fosalba, quien me ha guiado con paciencia y dedicación y ha brindado todo su apoyo en los análisis químicos de laboratorio. A Daniele Bila quien me ha orientado, brindado todo su apoyo y recibido en el Laboratorio de Ingeniería Sanitaria de la Universidad Federal de Río de Janeiro donde fue posible capacitarme y realizar el ensayo fundamental desarrollado en este trabajo. A Giselle Gómez también de la UFRJ por toda su paciencia y compromiso, sin ella hubiese sido imposible analizar mis muestras y realizar el ensayo YES. Al Prof. Edwin Routledge de la Universidad de Brunel, UK por cedernos la levadura para realizar el ensayo a través de la Prof. Marcia Dezotti (UFRJ).

A mi familia, sobre todo a mi madre Raquel Ramilo quien además de su apoyo incondicional me ha ayudado a resolver problemas con cálculos químicos y me ha aportado información relevante para la Tesis.

Finalmente quiero agradecerles a los integrantes del tribunal quienes me hicieron grandes aportes al corregir la Tesis.

## INDICE

<b>Introducción y antecedentes</b> .....	7
Perturbadores endócrinos.....	8
Estrógenos.....	8
<i>Efectos genómicos del receptor estrogénico</i> .....	9
<i>Efectos no genómicos del receptor estrogénico</i> .....	10
Compuestos químicos con actividad estrogénica.....	10
Detección de sustancias con actividad estrogénica.....	12
Situación actual de la cuenca del Río Santa Lucía.....	15
<b>Objetivos e hipótesis</b> .....	16
<b>Metodología y área de estudio</b> .....	17
Área de estudio.....	17
Variables Físico-Químicas y usos del suelo.....	17
Ensayo YES.....	20
<i>Preparación de las muestras de sedimento</i> .....	20
<i>Extracción de compuestos estrogénicos</i> .....	20
<i>Preparación de Soluciones y medios de cultivo y análisis</i> .....	22
<i>Cultivo de la cepa</i> .....	23
<i>Placas de análisis</i> .....	24
<i>Análisis de datos ensayo YES</i> .....	25
Análisis de datos.....	27
Formulación del modelo estadístico.....	27
<b>Resultados</b> .....	30
Caracterización del uso del suelo.....	30
Variables Físico-Químicas.....	31

Caracterización de la cuenca según uso de suelos y variables Fisico-Químicas	32
Estrogenicidad	35
Citotoxicidad	38
Estrogenicidad y variables Fisico-Químicas	39
Asociación entre la estrogenicidad y usos del suelo	37
<b>Discusión</b>	<b>41</b>
Calidad de agua en la cuenca del Río Santa Lucía	41
Actividad estrogénica en la cuenca del Río Santa Lucía	44
Asociación entre parámetros fisico-químicos y estrogenicidad	48
¿Cuáles son las posibles fuentes de xenoestrógenos en la cuenca de Santa Lucía?	50
<b>Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>60</b>

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La intensificación en los últimos decenios de las actividades antrópicas reflejada por el incremento en el tamaño de la población humana, el desarrollo económico y tecnológico y el afán del consumo, ha provocado la liberación de cientos de contaminantes que se han dispersado en el ambiente. Estos compuestos pueden encontrarse en aguas superficiales y subterráneas, e incluso agua potable, pudiendo constituir un riesgo para la salud de los organismos vivos.

Los sistemas fluviales se ven altamente afectados por este tipo de actividades ya que su hidrología, química y biología dependen además de la topología, geología, clima y vegetación (Allan & Johnson, 1997), de las actividades humanas que se realizan en la cuenca de drenaje (Karr & Schlosser, 1978). Muchas de estas actividades tienen un gran impacto sobre los ciclos biogeoquímicos, provocando grandes desequilibrios y una de sus principales consecuencias es el cambio en el uso del suelo (Vitousek, 1994; Pachauri et al., 2014). La calidad del agua de estos sistemas está determinada por procesos naturales, así como por las actividades humanas, ya sean las descargas directas o puntuales de vertidos urbano-industriales y domésticos, o la llegada de contaminantes por escorrentía desde tierras agrícolas (Schindler et al., 2008).

Los sistemas fluviales son vistos como sistemas integrados longitudinalmente, existiendo una fuerte dependencia entre el funcionamiento del río aguas abajo y aquellos procesos que tienen lugar aguas arriba (Vannote et al., 1980). Es por ello, que es importante considerar las actividades o procesos que puedan estar ocurriendo aguas arriba (e.g. descarga de desechos puntal) para evaluar cuáles pueden ser las consecuencias sobre la calidad de agua aguas abajo. Esto provoca que una inmensa cantidad de contaminantes de origen antropogénico se dispersen en el ambiente, particularmente la presencia de contaminantes químicos en el medio ha aumentado progresivamente en los últimos años (Becerril, 2009). Una de las grandes preocupaciones relacionadas a este tipo de sustancias es que pueden producir efectos adversos en los organismos expuestos a concentraciones muy bajas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Gaido et al., 1997). Dentro de estos compuestos, los perturbadores endócrinos afectan a todos los niveles de organización biológica cuando los organismos son expuestos crónicamente a concentraciones subletales, llegando incluso a generar extinciones locales (Kidd et al., 2007).

## Perturbadores endócrinos (PEs)

En particular, existe un gran interés científico en un grupo heterogéneo de sustancias que, mediante la alteración de las señales químicas internas en los organismos, comprometen el normal funcionamiento endócrino, incluyendo la capacidad reproductiva y el desarrollo sexual en numerosas especies (Norris & Carr, 2006). Estas sustancias son conocidas como perturbadores endócrinos (PEs), que se definen como: *“Cualquier agente exógeno que interfiera con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de una hormona natural responsables de la mantención, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos”* (EPA, 1997). Los efectos que pueden tener estos compuestos van desde perturbaciones o desviaciones transitorias y reversibles de la homeostasis, hasta la alteración irreversible en la diferenciación sexual y reproducción, efectos epigenéticos heredables e incluso extinciones locales de poblaciones expuestas a concentraciones subletales (Kidd et al., 2007; Vadja & Norris, 2010). En relación a los humanos, numerosos estudios demuestran la relación de PEs con el desarrollo y proliferación de cánceres (ver review Kabir et al., 2015). Muchos de estos químicos pueden actuar ya sea imitando la acción de hormonas naturales, bloqueándolas, alterando la secreción o el metabolismo de las mismas, modificando los niveles de receptores hormonales, o interfiriendo en otros sistemas de señalización que están directamente relacionados con el sistema endócrino como el sistema inmune o el nervioso (Porcher et al., 2009).

Muchos de los PEs identificados hoy en día poseen actividad estrogénica o antiestrogénica es decir, actúan modificando la vía de acción de los estrógenos naturales ya sea uniéndose a sus receptores, alterando su patrón de síntesis o modificando sus receptores hormonales.

## Estrógenos

Las hormonas esteroideas son lípidos derivados del colesterol, y son secretadas por las gónadas, la corteza adrenal y la placenta. Estas hormonas, controlan la determinación, diferenciación y desarrollo sexual, y pueden dividirse en estrógenos o andrógenos. En mamíferos, los principales estrógenos son la estrona, el estriol, y el  $17\beta$ -estradiol (Singhal et al., 2009). Los estrógenos inducen etapas claves de la ovogénesis y cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina estimulando el crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata (Korach, 1994). Además tienen efectos sobre tejidos del sistema cardiovascular, óseo

y nervioso entre otros. Razón por la cual, niveles elevados de estrógenos se asocian con un menor riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, inicio de enfermedades renales tardío, además de ayudar a mantener la densidad ósea, y el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Barrett-Connor, 1997; Silbiger & Neugarten, 1955; Paganini-Hill & Henderson, 1994).

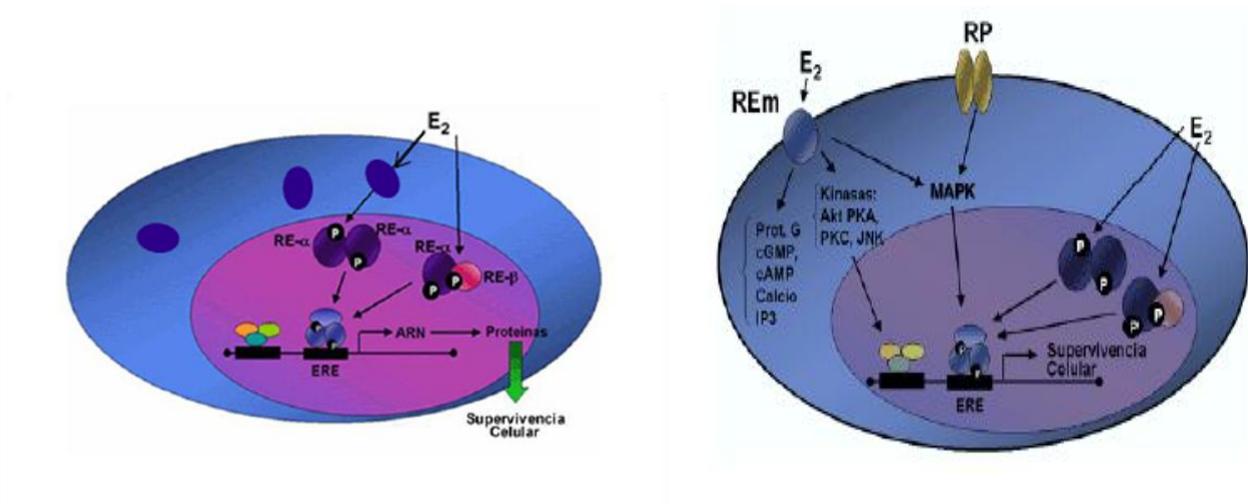
La especificidad de la acción estrogénica depende de la presencia de receptores intracelulares y los estrógenos modulan la concentración de los mismos. Por ejemplo, el estradiol durante la fase folicular, induce la síntesis y el desarrollo de receptores aumentando su concentración (Malgor & Valsecia, 2000). El Receptor de Estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores citoplasmáticos, fue identificado en 1962 por el grupo de Jensen, quienes describieron la presencia de sitios de unión del estrógeno en diferentes tejidos de ratas (Jensen & Jacobson, 1962). En 1996 fue descubierto un nuevo receptor que tenía gran homología con el ya conocido, razón por la cual se los denominó RE- $\alpha$  al primero y RE- $\beta$  al segundo, los cuales poseen diferentes funciones dependiendo del tejido donde ejercen su acción. Esto determina que la fisiología de los estrógenos sea altamente compleja, sin contar que existen receptores localizados en la membrana, que median también funciones de estas hormonas lo que determina la existencia de dos vías principales de estrogénicidad: la genómica y la no genómica.

#### *Efectos genómicos del receptor estrogénico*

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor citoplasmático es activado al unirse al ligando, actuando como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de algunos genes. Inicialmente ocurre una homodimerización ( $\alpha$ -RE/ $\alpha$ -RE) o heterodimerización ( $\alpha$ -RE/ $\beta$ -RE) del complejo hormona-receptor y se da el reconocimiento del elemento de respuesta a estrógeno (ERE). Después de esto se produce la transcripción al formarse el complejo de iniciación que incluye coactivadores, correpresores y proteínas reguladoras de la transcripción (Beato et al., 1996; Evans, 1988) (**Figura 1.1**).

### Efectos no genómicos del receptor estrogénico

Son procesos rápidos que ocurren en minutos o segundos y no requieren la transcripción y síntesis de proteínas para producir un efecto sino que son mediados por un receptor localizado en la membrana. Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana, todos ellos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Kelly & Levin, 2001; Pietras et al., 2001) (**Figura 1.1**). Utilizando diferentes procedimientos se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (RE<sub>m</sub>) en distintos tejidos y líneas celulares (Pietras & Szego, 1977; 1979). Sin embargo, la mayor atención en los últimos 30 años ha sido dedicada a estudiar los efectos genómicos mediados por receptores citoplasmáticos, parte de esto se debe a que no se ha podido aislar hasta el momento y de esta manera caracterizar tanto estructural como funcionalmente, a los receptores de membrana que median los efectos rápidos debidos a hormonas esteroideas.



**Figura 1.1** Efectos genómicos vía receptor citoplasmático (izquierda) y no genómicos vía receptor de membrana (derecha) del receptor del estrógeno.

### Compuestos químicos con actividad estrogénica

Los xenoestrógenos se caracterizan por generar respuestas agonistas similares a las señales estrogénicas; efecto que se ve favorecido por la relativamente baja especificidad de los

receptores de estrógeno (Matozzo et al., 2008). Dentro de los efectos actuales reportados de los xenoestrógenos se encuentran anomalías en el sistema reproductivo de animales (peces, reptiles y aves principalmente), generación de estrés oxidativo, feminización e inducción de la proliferación de carcinomas dependientes del estradiol en humanos, entre otros (Fry, 1995; De Coster & Van Larebeke, 2012; Kabir et al., 2015). Datos epidemiológicos muestran evidencias del incremento en la incidencia y prevalencia de algunas enfermedades asociadas con los PEs tales como el cáncer, principalmente de próstata, testículo y mama (Kabir et al., 2015). Particularmente para el Uruguay, es de destacar que el cáncer de mama es un grave problema sanitario a nivel nacional. Las neoplasias constituyen la segunda causa de muerte en la población uruguaya; el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente de la mujer uruguaya y su primera causa de muerte por cáncer (Barrios et al., 2002; MSP, 1998; Ferlay et al., 2013).

Los xenoestrógenos abarcan un rango amplio de sustancias con diferentes estructuras, incluyendo hormonas (naturales y sintéticas) y una gran cantidad de compuestos químicos. Estos compuestos pueden ser sustancias sintéticas como biocidas (herbicidas, insecticidas, etc), dioxinas, Bifenilos policlorados (PCBs), alquilfenoles, Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bisfenol (A y S), ftalatos, metales traza, estrógenos sintéticos como el Dietilestilbestrol (DES) y el  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $EE_2$ ) entre otros. Dentro de las sustancias naturales se encuentran los fitoestrógenos y los estrógenos naturales ( $17\beta$ -estradiol, estrona y estriol) (De Coster & Van Larebeke, 2012). Pueden ingresar al medio acuático a través de múltiples fuentes de contaminación. Finalmente, se acumulan en los cuerpos de agua, donde los organismos acuáticos están potencialmente expuestos a diversos cóckteles de xenoestrógenos los cuales pueden presentar efectos aditivos o sinérgicos (Norris & Carr, 2006).

Los efectos de los xenoestrógenos en el medio ambiente no dependen únicamente de su concentración, también de otros factores tales como su lipofilicidad, persistencia, bioacumulación, tiempo de exposición, mecanismos de biotransformación y de excreción, entre otros. Cuando estos compuestos ingresan al medio acuático, comienza su partición entre la fase sedimento-agua dependiendo de su contenido de carbono orgánico y de sus propias características fisicoquímicas (e.g. constante de disociación) (Baker et al., 1991; Zhu et al., 2008). Debido a la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de los xenoestrógenos, éstos tienden a ser absorbidos en el sedimento (Wang et al., 2011). Dependiendo de las características específicas de cada cuenca y las características fisicoquímicas de los contaminantes

(coeficiente octanol/agua), serán principalmente los sedimentos quienes acumulen estos compuestos (García-Alonso et al., 2011).

### Detección de sustancias con actividad estrogénica

Una de las dificultades en la detección de este tipo de sustancias, es que los procedimientos para su medición deben ser muy sensibles, ya que los efectos biológicos ocurren a muy bajas concentraciones. Es por ello que se han adoptados distintos enfoques y formas de evaluar la presencia de este tipo de contaminantes en ambientes acuáticos.

En una primera instancia, se han desarrollado ampliamente los métodos analíticos en particular, aquellos basados en la extracción en fase sólida (EFS) y detección por GC- MS, GC-MS-MS, HPLC-MS o HPLC-MS-MS, entre otras técnicas (Petrovic et al., 2002). Esta aproximación provee de alta sensibilidad y precisión para cuantificar la concentración de los PEs. Estos métodos son costosos, particularmente si se trata de una mezcla de compuestos. La limitante radica en que se cuantifica la presencia de compuestos pero no los efectos, los cuales pueden ser producidos por la presencia de un gran número de PEs y esto se encuentra modulado por el ambiente particular. Dicha aproximación también presenta la desventaja de que no toma en cuenta la presencia de nuevos compuestos comercializados con actividad estrogénica desconocida.

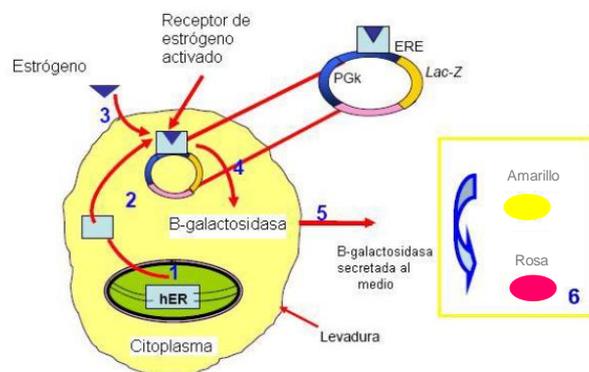
Diversos ensayos *in vivo* también son utilizados tales como la inducción de la expresión y/o síntesis de vitelogenina (Vg) en hepatocitos de machos, un biomarcador temprano de feminización (Flouriot et al., 1995; Mattsson et al., 2011; Yan et al., 2012). Si bien el uso de biomarcadores puede reflejar la integración de las características del ambiente así como los efectos a nivel de organismo que se presentan, se requiere del sacrificio de animales vertebrados (e.g. peces), por lo que aproximaciones *in vitro*, rápidas, de bajo costo y no invasivas con la fauna local, pueden caracterizar el grado de perturbación del ambiente, en armonía con el principio de reducción, reemplazo y ajuste del empleo de animales para monitoreo ambiental ([www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk)).

Los ensayos *in vitro* son en relación a los ensayos *in vivo*, menos costosos, requieren factores de concentración menores, no son invasivos y los límites de detección son mucho más bajos que los de los análisis químicos debido a su alta especificidad. Proporcionan mediciones rápidas y redituables, son altamente sensibles y permiten el análisis de compuestos individuales o pueden ser usados para dar una medida integrada del efecto sinérgico de un

conjunto de compuestos en una muestra dada. Además muchos ensayos *in vitro* son capaces de detectar compuestos para los cuales no hay métodos analíticos disponibles (Routledge & Sumpter, 1996; Frische et al., 2009; Wang et al., 2014b).

Uno de los ensayos más ampliamente utilizados para determinar estrogenicidad, es el ensayo *in vitro* YES (Yeast Estrogen Screen) que utiliza levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) manipuladas genéticamente para detectar estrogenicidad mediante el receptor intracelular del estradiol. Routledge y Sumpter (1996) pusieron a punto el ensayo con la finalidad de analizar los principales grupos de agentes tensoactivos debido a la aparición de daños en el sistema reproductivo, problemas en el desarrollo y la elevada incidencia de cánceres, detectados tanto en los seres humanos como en la vida silvestre, relacionados con los contaminantes ambientales capaces de imitar las actividades biológicas de los estrógenos.

La presencia de un contaminante con potencial estrogénico es detectado por la levadura. Las células de *S. cerevisiae* están transformadas con plásmidos que contienen un promotor del elemento de respuesta a estrógeno (ERE) ligado a un gen reportero (*lacZ*) y, en el núcleo, el gen receptor del estradiol humano (hER). Luego que el compuesto estrogénico se une al receptor hormonal (hER), el cual se transforma en un receptor activo, éste estimula al activador transcripcional (ERE) y se expresa el gen reportero produciéndose la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuya actividad es medida mediante una reacción colorimétrica (**Figura 1.2**). El producto de la reacción se detecta mediante un espectrofotómetro. La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producida, que a su vez se relaciona con la concentración del xenoestrógeno (Noguerol et al., 2006).



**Figura 1.2** *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente mediante la incorporación en su núcleo de un receptor de estradiol (hER) (Routledge & Sumpter, 1996).

La utilización de levaduras para determinar estrogenicidad tiene muchas ventajas por su bajo costo, fácil manipulación y crecimiento rápido en el laboratorio, lo que proporciona la oportunidad de analizar un gran número de muestras o compuestos pobremente caracterizados así como evaluar simultáneamente su toxicidad aguda (Brix et al., 2010; Pereira et al., 2015).

Dos características de la célula de levadura contribuyen al éxito de este tipo de ensayos. En primer lugar, la levadura no tiene un sistema endógeno homólogo a receptores de vertebrados que podrían interferir en el ensayo. En segundo lugar, el proceso de post traducción y plegamiento de la proteína de vertebrado en levaduras es muy similar a la de las células de mamíferos, lo que resulta en la preservación de la estructura del receptor nativo cuando se expresa en la levadura. Esto es de interés primordial, ya que la estructura correcta del dominio de unión a ligando del receptor determina la especificidad del sistema, es decir, su capacidad para distinguir entre los ligandos y los no-ligandos (Noguerol et al., 2006).

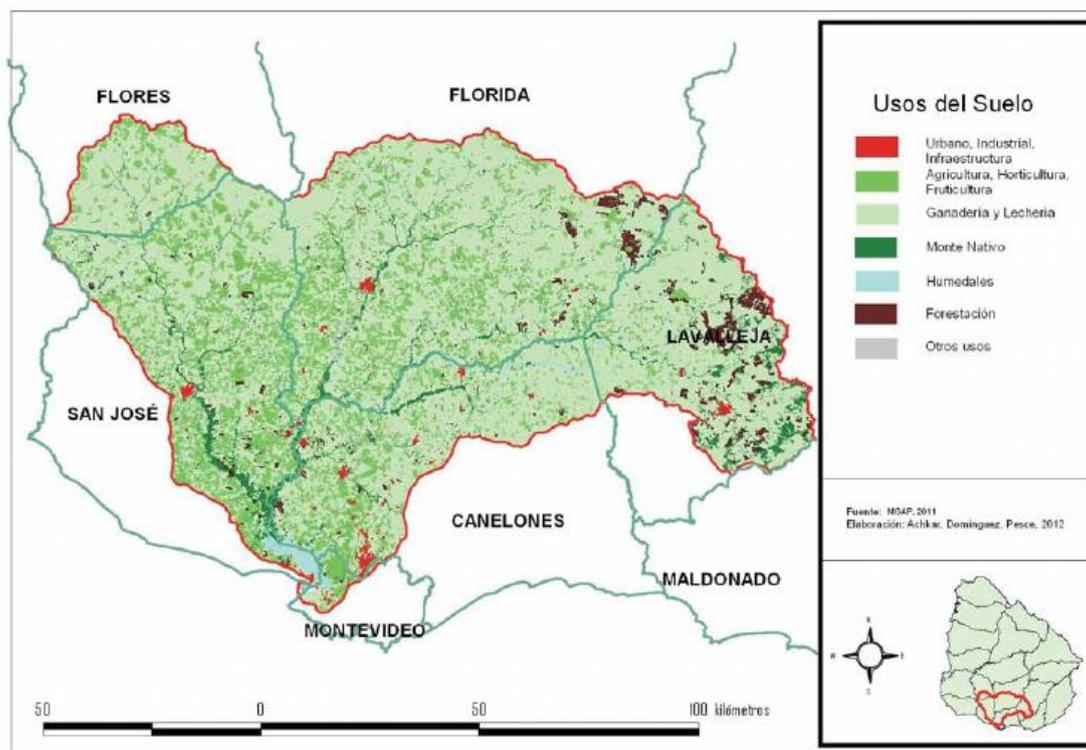
El uso de bioensayos de screening como el YES proporciona información de la estrogenicidad total de una muestra sin la necesidad de conocer todos los compuestos presentes en ella (Soto et al., 1995; Routledge & Sumpter, 1996). Sumado a que permite integrar efectos de compuestos estrogénicos y no-estrogénicos presentes en mezclas heterogéneas de PEs. Los compuestos no estrogénicos son capaces de modular el comportamiento toxicocinético de los xenoestrógenos, por ejemplo aumentando su absorción (Rajapakse et al., 2001). Este tipo de modulación sinérgica es común en los sistemas acuáticos, donde existen distintos disolventes orgánicos para aumentar la solubilidad en agua de algunos componentes y/o también detergentes aniónicos, que por su propiedad surfactante aumentan la permeabilidad de la membrana celular permitiendo la entrada de otros compuestos (Hutchinson et al., 2006). Con este tipo de ensayo se pueden detectar una gran variedad de compuestos estrogénicos ya que el hER no sólo se une a estrógenos, como el  $17\beta$ - estradiol y sus derivados, sino que puede unirse a otros tipos de estructuras químicas con efectos feminizantes (Céspedes et al., 2004).

El ensayo YES es ampliamente utilizado para medir estrogenicidad en agua. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los xenoestrógenos tienden a adsorberse en los sedimentos debido a su moderada naturaleza hidrófoba (Wang et al., 2011). Estudios recientes apuntan a detectar la presencia de xenoestrógenos en el sedimento de los ecosistemas acuáticos (García-Alonso et al., 2011; Tuikka et al., 2011; Schnell et al., 2013; Wu et al., 2015). Existen antecedentes en la detección de estrogenicidad a partir de sedimentos del Río Uruguay, utilizando un método *in vivo* como es la inducción en la síntesis de Vg (Rivas-Rivera et al.,

2014). Sin embargo, en el Uruguay no existen estudios de detección de estrogenicidad tanto en agua como en sedimento de ecosistemas acuáticos a partir de métodos directos.

### Situación actual de la cuenca del Río Santa Lucía

La cuenca del Río Santa Lucía abastece de agua potable para más del 60% de los uruguayos además de ser utilizado como recurso hídrico para regadío en 6 departamentos del país (Achkar et al., 2004). En la cuenca conviven distintos usos del suelo (Achkar et al., 2012; **Figura 1.3**) lo que conlleva a la potencial presencia de un amplio rango de sustancias tóxicas, que se refleja en una importante degradación ambiental de la misma (Teixeira-de Mello, 2007). El uso de la cuenca como fuente de agua potable y a la vez como zona agro-industrial hace que existan conflictos de gran importancia socio-ambiental y política. Resaltando que de continuar con esta tendencia de aportes antrópicos se pone en riesgo la factibilidad de potabilizar el agua (Arocena et al., 2008).



**Figura 1.3.** Distribución de usos del suelo de la cuenca del Río Santa Lucía (Achkar et al., 2012).

Múltiples factores actúan provocando el deterioro de las aguas: la inexistencia de un adecuado sistema de saneamiento urbano, una inapropiada gestión de los residuos sólidos y de los vertidos sin tratamiento de efluentes desde las industrias, la erosión de suelos por prácticas agrícolas inadecuadas, el uso abusivo de agrotóxicos, el vertido de efluentes de tambos sin

previo tratamiento y la forestación con especies exóticas en la cuenca alta (Achkar et al., 2012). Cabe destacar que no existe en nuestro país legislación alguna para regular la comercialización o liberación de compuestos PEs.

Las prácticas mencionadas anteriormente pueden liberar decenas de este tipo de sustancias y su regulación también debería tenerse en cuenta dado los efectos drásticos sobre la salud pública y animal. Esto se traduce en la necesidad de desarrollar nuevas herramientas que permitan detectar este tipo de contaminantes. El uso de bioensayos permitirá evaluar la toxicidad de sustancias como los PEs que son ampliamente liberadas en el Uruguay y sin embargo, no contempladas por los controles de calidad ambiental nacionales. Particularmente, el uso de ensayos como el YES presenta innumerables ventajas, incluyendo la de generar una herramienta de monitoreo no aplicada aún en nuestro país.

El presente estudio se enfoca en el desarrollo de un mapa de estrogenicidad de la cuenca del Río Santa Lucía. La principal hipótesis de trabajo es que los valores de estrogenicidad diferirán entre los sitios según los usos de suelo (urbano-industrial, agrícola y ganadero) debido a que liberan diferente cantidad y tipo de sustancias con potencial estrogénico. Dichas variaciones se espera que se reflejen en las respuestas *in vitro*.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general

Determinar la actividad estrogénica en sedimentos de la cuenca del Río Santa Lucía mediante el ensayo *in vitro* YES y analizar su variación a lo largo de la misma.

### Objetivos específicos

- Establecer el impacto antrópico en los cursos de agua de la cuenca del Río Santa Lucía a través del análisis de parámetros fisicoquímicos y de usos del suelo.
- Puesta a punto de la técnica “Yeast Estrogen Screen” (YES) para medir estrogenicidad en sedimentos.
- Cuantificar los niveles de estrogenicidad por YES y analizar su variación en la cuenca.
- Caracterizar la asociación de la estrogenicidad con diferentes variables ambientales y usos de suelo.

## **METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO**

### Área de estudio

La cuenca del Río Santa Lucía localizada al Sur de Uruguay, comprende un área de 13448 km<sup>2</sup>, posee una altitud máxima de 250 metros sobre el nivel del mar y drena dentro del estuario del Río de la Plata. El sistema fluvial comprende tres ríos mayores: el San José al Oeste, el Santa Lucía Chico en el centro, el Santa Lucía desde el Este y subcuencas menores correspondientes a los Arroyos Canelones (Grande y Chico) y Colorado (Inda & Indarte, 2009). Los principales usos del suelo en la misma son: ganadero (71.3%), agrícola (16.2%), forestal (4.2%) y por último el urbano-industrial (1.1%) (Achkar et al., 2012).

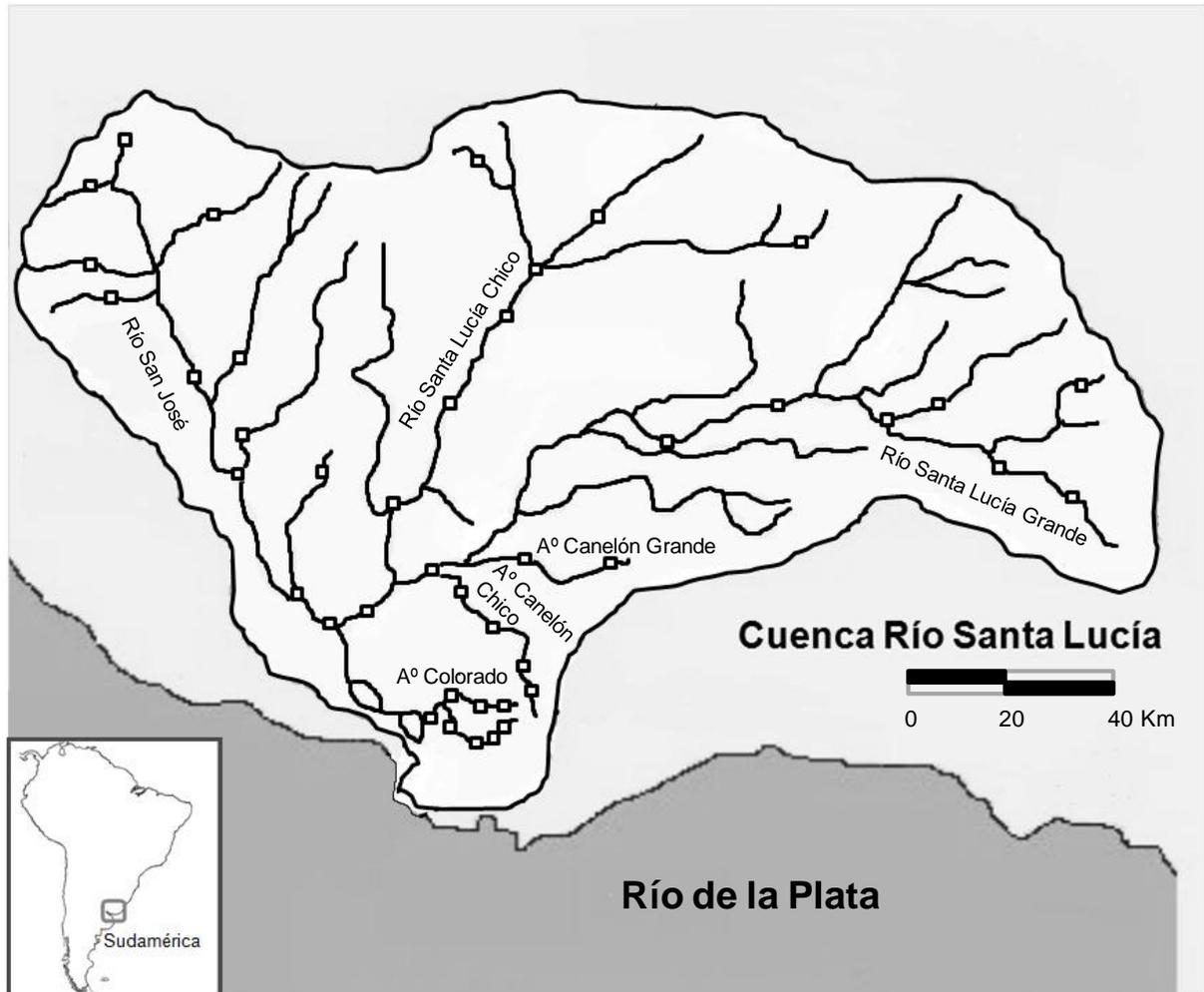
Se seleccionaron 42 puntos de muestreo abarcando el área total de la cuenca (**Figura 2.1**), cubriendo un amplio rango de usos de suelo así como la heterogeneidad de paisajes que podemos encontrar en la misma. Los 42 sitios los podemos agrupar dentro de las siguientes subcuencas: Sta Lucía grande, Sta Lucía chico, San José, Canelón Grande, Canelón Chico y Colorado. En la **Tabla 2.1** se muestra una descripción general de la ubicación de los sitios de muestreo.

### Variables Físico-Químicas y usos del suelo

Para tener una aproximación de la calidad de agua, en cada punto de muestreo se midieron las siguientes variables fisicoquímicas: pH, conductividad, temperatura, porcentaje de saturación de oxígeno (% O<sub>2</sub>) y concentración de oxígeno disuelto. En cada sitio, se tomaron 4 réplicas de agua y sedimento separadas por 25 metros aproximadamente. Se tomaron muestras superficiales de sedimento en frascos de vidrio ámbar para realizar el ensayo YES. Los frascos fueron previamente enjuagados con alcohol y acetona.

En paralelo, se tomaron 4 muestras de agua por cada sitio y se determinó: concentración de Fósforo total (Pt), Nitrógeno total (Nt), Amonio (NH<sub>4</sub>), Sólidos totales disueltos (TSS) y el porcentaje de materia orgánica (%MO) (también como parámetros indicadores de calidad de agua). A partir de las muestras de sedimento además se determinó el %MO (Koroleff, 1970; Valderrama, 1981; APHA, 1995). Se analizó la granulometría del sedimento mediante método láser y la concentración de Plomo en sedimento (como un indicador o marcador industrial), en colaboración con el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la UENF, Río de Janeiro.

Se determinó la cuenca de drenaje de cada sitio de muestreo, su área y el uso de suelo predominante para cada uno de los sitios de muestreo, utilizando el programa Google Earth Pro, definiendo para ello 4 categorías de usos de suelo: Agrícola, Ganadería extensiva, Forestal y urbano-industrial.



**Figura 2.1** Mapa de la cuenca del Río Santa Lucía con sitios de muestreo.

**Tabla 2.1** Descripción de la ubicación de los sitios de muestreo.

<b>Sitio</b>	<b>Descripción</b>
<b>SG1</b>	Desembocadura de A° San Francisco (Minas).
<b>SG2</b>	A° Campanero Chico (nacientes del Sta Lucía Grande).
<b>SG3</b>	Laguna de los Cuervos (nacientes del Sta Lucía Grande).
<b>SG4</b>	Arequita (nacientes del Sta Lucía Grande).
<b>SG5</b>	A° Penitente sobre ruta 8 (nacientes del Sta Lucía Grande).
<b>SG6</b>	Sta Lucía Grande cercano a Fray marcos. Zona de toma de agua Ose.
<b>SG7</b>	Sta Lucía Grande sobre San Ramón.
<b>SG8</b>	A° Casupá. Tributario primer orden Santa Lucía Grande.
<b>CG1</b>	Naciente Canelón Grande (aguas abajo Santa Rosa).
<b>CG2</b>	Canelón Grande. Cercano a su desembocadura.
<b>C1</b>	A° Las Piedras. Aguas abajo ciudad de La paz y Las Piedras.
<b>C2</b>	Naciente A° Las Piedras.
<b>C3</b>	Naciente A ° Colorado.
<b>C4</b>	Cañada al Colorado. Zona aguas abajo de chacinería.
<b>C5</b>	A° Colorado aguas abajo de ciudad de Progreso.
<b>C6</b>	A° Colorado cercano a su desembocadura.
<b>C7</b>	Cañada Conchillas (cañada al Colorado).
<b>C8</b>	Cañada Juncal (cañada al Colorado).
<b>C9</b>	Cañada El Dragón (cañada al Colorado).
<b>SJ1</b>	Cañada al San José. Aguas abajo de ciudad de Libertad.
<b>SJ2</b>	Río San José. Paso Valdéz, cercano a su desembocadura.
<b>SJ3</b>	Cañada cercana a Villa Rodríguez (San José).
<b>SJ4</b>	Tributario segundo orden Río San José.
<b>SJ5</b>	Cañada dentro de la ciudad de San José.
<b>SJ6</b>	Tributario segundo orden Río San José.
<b>SJ7</b>	A ° Chamizo. Tributario primer orden. Río San José.
<b>SJ8</b>	Arroyo Mahoma. Tributario primer orden Río San José (zona de nacientes).
<b>SJ9</b>	Nacientes del Río San José.
<b>SJ10</b>	Nacientes del Río San José.
<b>SJ11</b>	A° San Gregorio. Tributario primer orden Río San José (zona de nacientes).
<b>SJ12</b>	Cañada al San José. Zona de nacientes.
<b>CC1</b>	Cañada al Canelón Chico sobre las nacientes.
<b>CC2</b>	Canelón Chico sobre la ciudad de Canelones.
<b>CC3</b>	Cañada al Canelón chico.
<b>CC4</b>	Canelón Chico. Aguas abajo ciudad de Canelones.
<b>SC1</b>	Aguas corrientes. Toma de agua OSE.
<b>SC2</b>	Río Sta Lucía sobre pueblo 25 de Agosto.
<b>SC3</b>	Cañada en pueblo La Cruz. Nacientes del Santa Lucía Chico.
<b>SC4</b>	Nacientes de Sta Lucía Chico (cercano a San Gabriel).
<b>SC5</b>	Santa Lucía Chico aguas arriba ciudad de Florida.
<b>SC6</b>	A° Pintado. Tributario primer orden Sta Lucía Chico.
<b>SC7</b>	Embalse Paso Severino. Aguas abajo de la represa.

## Ensayo YES

### *Preparación de las muestras de sedimento*

Las muestras de sedimento fueron almacenadas en frascos de vidrio ámbar, transportadas en hielo, y congeladas a -20°C.

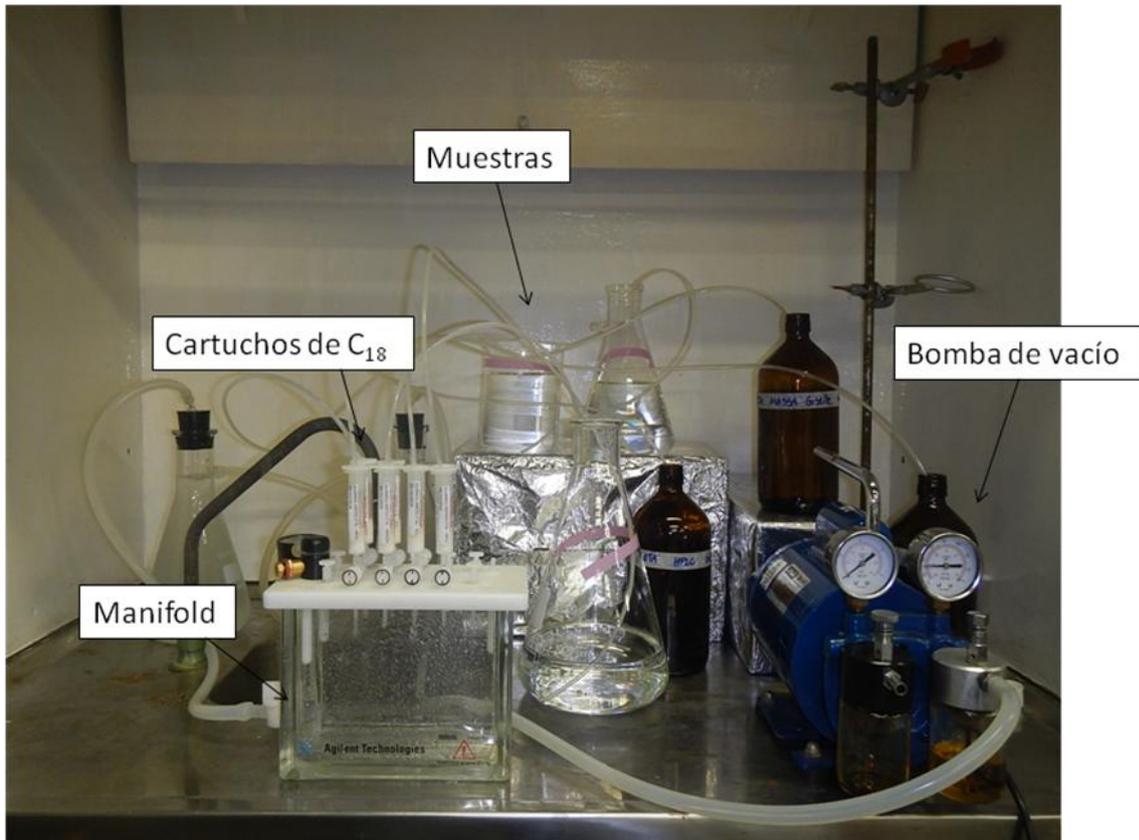
Se removió la fracción soluble hidrofílica con un enjuague del sedimento en 250 mL de agua mili Q durante 24 hs. Se removió el agua por decantación y se realizó el secado completo de las muestras a 60°C durante 24 hs para luego ser almacenadas en el desecador.

Debido a que las impurezas o la contaminación pueden causar falsos positivos en este ensayo, todos los reactivos y los materiales utilizados para la preparación de soluciones para el ensayo deben tener un alto grado de pureza. El material de vidrio utilizado se dedicó exclusivamente al mismo para evitar posibles interferencias o perturbaciones y fue lavado con solución de Extran 10%, enjuagado con agua destilada y Mili-Q. Luego de seco el material de vidrio fue enjuagado con etanol y acetona de grado analítico (Grau GC, Vetec) y nuevamente enjuagado en agua Mili-Q.

### *Extracción de compuestos estrogénicos*

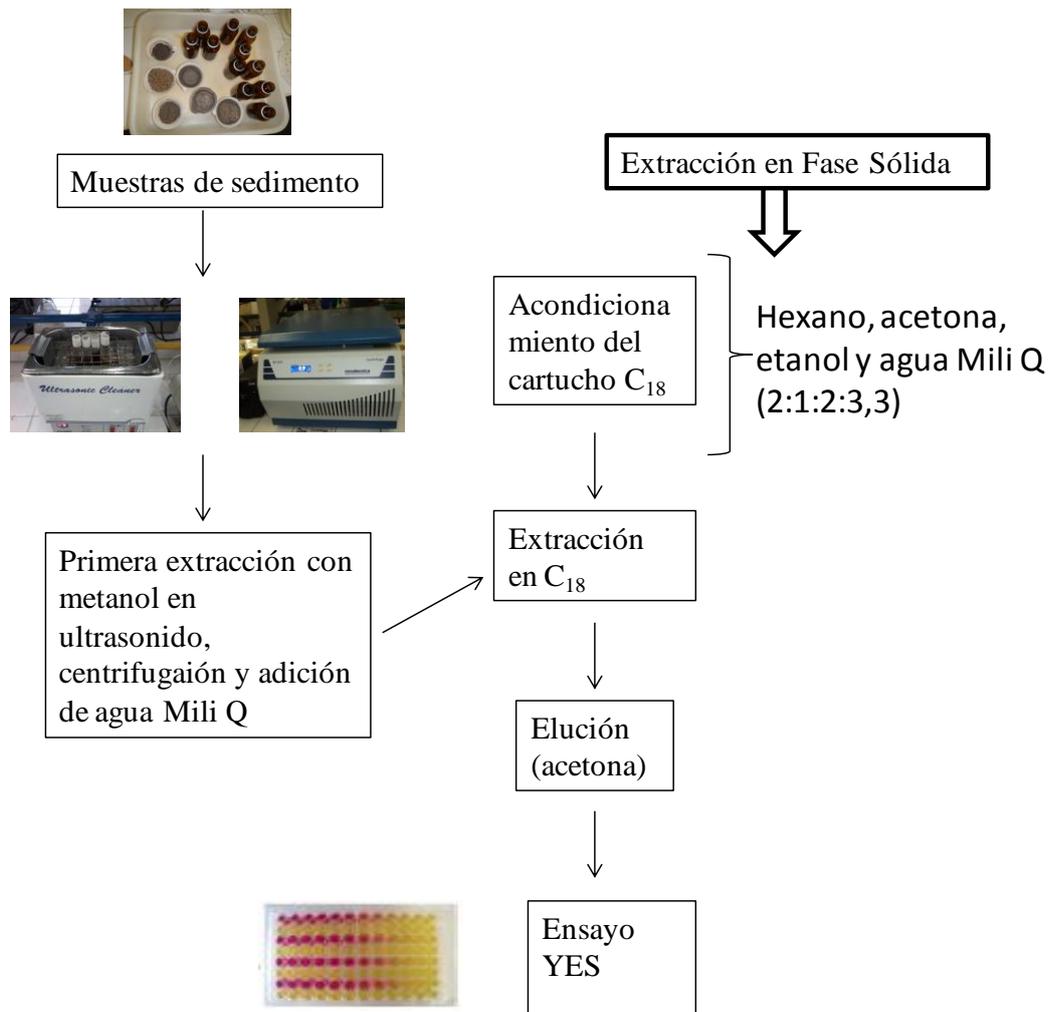
En un mortero se maceraron 10 gramos de sedimento, se adicionaron 10 mL de metanol (J. T. Backer®) y una primera extracción se realizó por ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente, se separó la fase líquida por centrifugación (2500 g) a 5 minutos. Este procedimiento fue realizado 3 veces, llegando a un volumen final de extracto de aproximadamente 30 mL. Se adicionó agua Mili Q hasta llegar a un volumen final de 250 mL. Para mejorar la eficiencia de la extracción se ajustó el pH a 2 con HCL.

El extracto se purificó utilizando columnas de extracción en fase sólida (Solid phase extraction, SPE) C<sub>18</sub> (Strata-X, Phenomenex®) 500 mg/6 mL. Las muestras fueron procesadas en paralelo por medio de una bomba de vacío, utilizando un Manifold de Agilent Technologies® (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2** Sistema utilizado para la Extracción en fase sólida (SPE). Las muestras son procesadas en paralelo utilizando la bomba de vacío y los compuestos de interés retenidos en los cartuchos C<sub>18</sub>.

Los cartuchos C<sub>18</sub> se utilizan como las columnas donde van a ser retenidos los compuestos de interés. Previo a la extracción se realizó el acondicionamiento del cartucho C<sub>18</sub> utilizando la siguiente secuencia de solventes: a pH 3 a un flujo constante (3 mL/min). Luego de realizar el pasaje de 250 mL de muestra, los cartuchos fueron almacenados a -20°C. Por último, las fracciones retenidas en los cartuchos fueron eluidas con 4 mL de acetona (Grau HPLC Merk®) en frascos de vidrio ambar de 10 mL. Para finalmente ser secadas en flujo de nitrógeno y resuspendidas en 2 mL de etanol (Grau HPLC Merk®) (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3** Procedimiento utilizado para la Extracción de las muestras.

### *Preparación de Soluciones y medios de cultivo y análisis*

La metodología utilizada para determinar la actividad estrogénica fue desarrollado por Routledge y Sumpter (1996) con modificaciones de Bila (2005).

Se prepararon las siguientes soluciones en la cámara de flujo laminar utilizadas en la elaboración de los medio de cultivo y análisis (**Tabla 2.2**).

**Tabla 2.2** Soluciones y medios de cultivo y análisis utilizados para el ensayo YES, adoptado de la metodología de Routledge y Sumpter (1996). Ver anexo 1.

Solución	Uso
Vitamina Glucosa Acido L-aspartico L-treonina Sulfato de cobre (II) Medio mínimo	Se utilizan para la preparación de medio de cultivo
Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) Medio de cultivo	Se utilizan para la preparación de medio de análisis

#### *Cultivo de la cepa*

La cepa YES de *Saccharomyces cerevisiae* desarrollada por Routledge y Sumpter (1996) fue proporcionada por el Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Federal de Río de Janeiro (Prof. Marcia Dezotti).

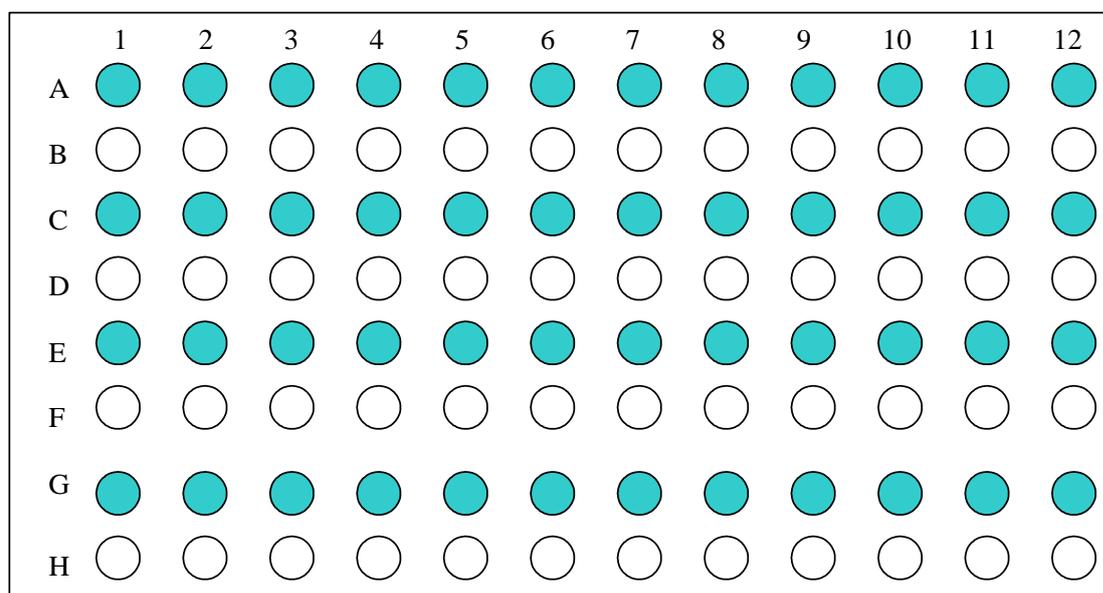
Para su conservación, se adicionaron en un tubo de centrifugación de 15 mL estéril 5 mL de cultivo de levaduras, se centrifugó a 4°C por 10 min a 2000 g, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de medio mínimo con 15% de glicerol para finalmente ser congelado. Previo al ensayo, la cepa se descongeló a temperatura ambiente en cámara de flujo laminar. El sobrenadante se descartó, y las células de levadura se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo para ser transferidas a un frasco para cultivo celular estéril de 50 mL.

La proliferación celular se realizó mediante la adición de 100 µL de cultivo de levadura a un frasco para cultivo celular estéril que contenía 10 mL de medio de cultivo. Los frascos de cultivo se incubaron a 28 ° C y 100 rpm en una incubadora con agitador orbital modelo Quimis Q816M20. Entre 24 y 48 hs antes de la realización del ensayo se repite este procedimiento para que la cepa pueda ser utilizada.

### Placas de análisis

En primer lugar, se preparó la batería de diluciones de las muestras en una placa de 96 pocillos, añadiendo 200  $\mu\text{L}$  del extracto de sedimento al primer pocillo de la fila. Luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de etanol en todos los pocillos excepto el primero y se realizó una dilución seriada de 1:2. En seguida se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  de cada pozo a la fila correspondiente en la placa de ensayo. Para preparar la placa de ensayo inicialmente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de etanol a cada pocillo de las filas correspondientes a los blancos. Luego de la evaporación completa de las muestras se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de medio de análisis con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en cada pozo como se indica en la **Figura 2.4**.

Como curva estándar se utilizó el  $17\beta$ -estradiol (E2) como referencia. Esta curva abarcó el rango de concentración de 26,6 ng/ L a 54,48  $\mu\text{g/ L}$ . La solución se preparó a partir de estándares de E2 (> 98%, Sigma-Aldrich) en etanol (Grado HPLC, Sigma-Aldrich). Al igual que para las muestras, la dilución se realizó en una placa de 96 pocillos realizando diluciones seriadas de 1:2.



**Figura 2.4** Placa de 96 pocillos utilizada en el ensayo YES. Las líneas A y C corresponden a las diluciones de  $17\beta$ -Estradiol por duplicado. Las líneas E y G representan las diluciones de la muestra analizada por duplicado. Las líneas B, D, F y H corresponden a los blancos (sólo etanol).

Las placas fueron agitadas durante 2 min en un agitador de placas de 96 pocillos (IKA, MS-3). Posteriormente se incubaron a 30 ° C durante 72 horas. Luego se dejaron reposar durante 1 hora antes de la lectura. En esta etapa es posible observar el cambio de color en los pocillos,

que pasa de amarillo a tonos de color rosa (indicando actividad estrogénica) y a la vez un aumento de la turbidez como resultado de la producción de  $\beta$ -galactosidasa y del crecimiento de la levadura.

La lectura de absorbancia se realizó en las longitudes de onda de 540 nm para la reacción colorimétrica, y 620 nm para la turbidez en un lector de placa de 96 (Softmax Pro 5 SpectraMax M3).

Luego de la lectura las placas se autoclavaron a 121 ° C durante 15 min antes de ser desechadas al igual que todo el material que haya entrado en contacto con la cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### *Análisis de datos ensayo YES*

En primer lugar, para corregir la respuesta estrogénica obtenida se removió el efecto del crecimiento de la levadura aplicando la siguiente ecuación para los datos de cada pocillo de la placa, adoptada por Bila (2005):

$$A_{\text{corregida}} = A_{\text{muestra540nm}} - (A_{\text{muestra620nm}} - A_{\text{blanco620nm}})$$

Luego, se construyeron los gráficos con las curvas dosis-respuesta que relacionan el valor de la absorbancia corregida con el factor de dilución de la muestra en escala logarítmica. El E2 se utilizó como estándar o control positivo de actividad estrogénica, por lo que para cada ensayo se construyó también una curva dosis-respuesta del E2, relacionando el valor de absorbancia corregida con la concentración. Se obtuvo además el límite de detección (LD), el cual se calculó como la concentración de E2 obtenida en el control negativo, es decir etanol absoluto, más tres desviaciones estándar. Se realizó además, el cálculo del EC<sub>50</sub> que corresponde a la concentración que produce una respuesta igual al 50% de la actividad máxima de la  $\beta$ -Galactosidasa (Bila, 2005; Beck et al., 2006).

La actividad estrogénica de las muestras ambientales se calculó interpolando el valor de absorbancia corregida en la curva dosis-respuesta del E2 y se expresó en equivalentes de estradiol (EQ-E2). La curva de E2 se ajustó (función sigmoideal) utilizando el programa Origin versión 6.0, a partir del cual se obtuvieron los valores mínimos y máximos, la pendiente y el valor de EC<sub>50</sub>.

A partir de esos parámetros se utilizó la siguiente función logística para determinar los EQ-E2 en ng/L:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

Dónde el valor de **y** es la absorbancia corregida; **A<sub>1</sub>** corresponde a la inducción máxima de la actividad estrogénica; **A<sub>2</sub>** corresponde al límite de detección; **p** es la pendiente de la curva; **X** es la concentración de la sustancia estrogénica y **x<sub>0</sub>** corresponde al valor de EC<sub>50</sub>.

Para cada muestra que presentó actividad estrogénica, se escogió aquel valor de absorbancia que se encontraba en la fase lineal ascendente de la curva y por encima del LD, para minimizar los errores a la hora de interpolar los valores en la curva sigmoideal donde se pueden subestimar o sobreestimar valores con mayor probabilidad en las fases de meseta de la misma.

Luego se corrigió el valor de concentración en ng/L por el volumen de resuspensión utilizado y la cantidad de sedimento a partir de la cual se obtuvo el extracto, para obtener la equivalencia final en ng/g de sedimento de EQ-E2. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{EQ-E2 (ng/g)} = \left( \frac{x * \text{FD} * V_R}{1000} \right) * 1/P_s$$

Donde **x** es el valor de EQ-E2 en ng/L, **FD** el factor de dilución que se calcula multiplicando por un factor de 20 (debido a que en todos los casos se tomaron 10 µL y se diluyeron en 200 µL de medio de análisis) y por el cociente entre el volumen total y el volumen de suspensión de muestra en cada pocillo de la placa de dilución. Este último cociente variaba según la dilución que se realizaba, por ejemplo en el primer pocillo fueron 200 µL totales/ 200 µL de muestra, es decir 1. Mientras que en el segundo pocillo fueron 200 µL totales/ 100 µL de muestra, es decir se multiplica en este caso por un factor de 2, y así sucesivamente para todas

las diluciones.  $V_R$  el volumen de extracto resuspendido (2 mL) y  $P_s$  el peso seco de sedimento extraído (10 g).

Debido a que en algunos puntos se observó la ocurrencia de citotoxicidad, se utilizó la relación presentada por Frische y colaboradores (2009) para cuantificar la inhibición del crecimiento de la levadura:

$$\text{Toxicidad} = 1 - \left( \frac{\text{Abs 620 muestra}}{\text{Abs 620 blanco}} \right)$$

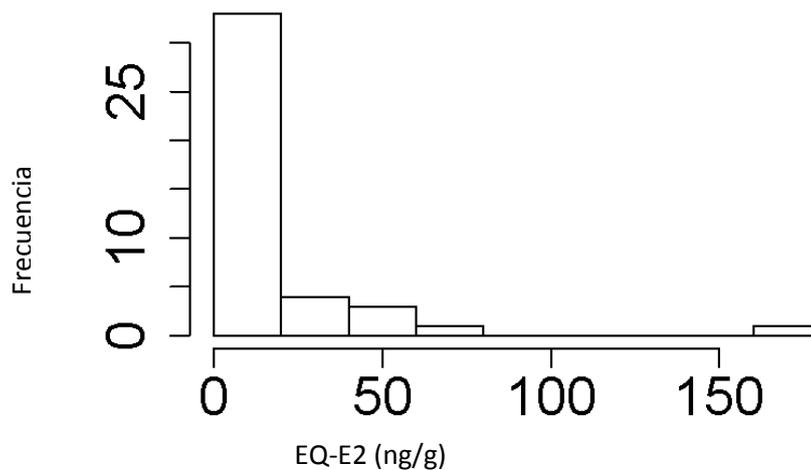
### Análisis de datos

Se realizó un Análisis de componentes principales (ACP) para estudiar la ordenación de los sitios según su clasificación de uso de suelo. Las variables fueron centradas y estandarizadas previamente al análisis.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los valores de los parámetros físico-químicos entre los grupos definidos según la clasificación de usos del suelo se realizó el Análisis de Similitud (ANOSIM,  $p < 0.05$ ). El ANOSIM se basa en una matriz de similitud (en este caso se utilizó el índice de Bray-Curtis para la construcción de dichas matrices) y la significación se basa en la comparación de esa matriz con permutaciones aleatorias (Clarke & Warwick, 1994). Se efectuaron en todos los casos 10000 permutaciones ( $p < 0.05$ ). Para las comparaciones de a pares se corrigió el nivel de significación de acuerdo a Bonferroni (1935). Para dicho análisis se utilizó el software PAST versión 1.68 (Hammer et al., 2001)

### Formulación del modelo estadístico

La variable estrogénicidad no presenta una distribución normal al test de Shapiro-Wilk ( $W = 0.46$ ;  $p = 3.33e-11$ ). Al realizar el histograma de esta variable (**Figura 2.5**) se observa un claro exceso de ceros en la muestra. Además la varianza presenta un valor extremadamente mayor (908.69) con respecto a la media (12.12), lo que indica que existe una gran sobre-dispersión de los datos.



**Figura 2.5** Histograma de la variable estrogénicidad (EQ-E2).

Para investigar si la estrogénicidad se ve afectada por el tipo de uso de suelo y otras variables ambientales, se plantea un GLM (Modelo Lineal Generalizado) con distribución Poisson:

$$Y \sim \text{Poisson}(\mu)$$

1) Parte Sistemática (explicada):  $\mu = X\beta$  donde  $X$  contiene las variables explicativas categóricas.

2) Parte Aleatoria (no explicada): no hay pues  $\mu = \sigma^2$  en este tipo de distribución.

3) Función de conexión:  $g(E(X\beta)) = \log(X\beta) \rightarrow \mu = \exp(X\beta)$

Cabe destacar que para el caso de las variables explicativas continuas se realizó el centrado y estandarizado previo al análisis. Se planteó el siguiente modelo para investigar la relación entre la estrogénicidad y la variable categórica “uso del suelo” **m1 = EQ-E2 ~ Uso del suelo**. Al obtenerse el valor de los parámetros en la escala logarítmica, para la correcta interpretación de los mismos en la escala lineal, se aplicó la función inversa exponencial.

Se planteó un segundo modelo de regresión simple para investigar si la estrogénicidad puede explicarse por la variable continua “concentración de Plomo en sedimento”: **m2 = EQ-E2 ~ Pb**. Teniendo en cuenta que el plomo puede ser utilizado como un marcador industrial. Nuevamente se modelaron los errores aleatorios de la variable de respuesta utilizando la

función de distribución Poisson, aplicándose la función exponencial a los valores de los parámetros.

Para ambos modelos, se utilizaron únicamente los sitios donde se halló estrogenicidad para el análisis de datos, dado a que varias muestras presentaron citotoxicidad y por lo tanto no pudo determinarse la estrogenicidad.

## RESULTADOS

### Caracterización del uso del suelo

El área de las subcuencas que abarcan los sitios de muestreo estudiados fue muy variable, con una extensión mínima de 0.94 Km<sup>2</sup> y máxima de 8929 Km<sup>2</sup>. La cobertura de uso de suelo también difirió entre las subcuencas, predominando el uso agrícola con un promedio por cuenca de 70.42 %, seguido por la ganadería extensiva (21.26 %), el urbano (4.88%) y el forestal (3.49%) (**Tabla 3.1**)

**Tabla 3.1** Área de drenaje y porcentaje del uso del suelo de cada sitio de muestreo sobre la cuenca del Río Santa Lucía. Sitios de muestreo ordenados por su ubicación en la cuenca: Santa Lucía Grande (SG), Canelón Grande (CG), Colorado (C), San José (SJ), Canelón Chico (CC) y Santa Lucía Chico (SC).

Sitio	Area (Km <sup>2</sup> )	Agrícola (%)	Urbano (%)	Gan Ext (%)	Forestal (%)
SG7	2964,83	65,78	0,34	24,96	8,91
SG6	2499,21	62,48	0,33	29,32	10,16
SG1	201,26	5,83	4,12	78,10	11,95
SG4	180,21	23,87	0,00	63,63	12,50
SG8	155,73	33,86	0,00	48,81	17,33
SG3	145,05	21,54	0,00	68,49	9,97
SG5	34,56	6,47	0,00	82,51	11,02
SG2	0,94	9,74	0,00	77,87	12,39
CG1	411,86	97,22	2,23	0,00	0,54
CG2	80,08	12,02	86,67	0,00	1,31
C3	1950,85	100,00	0,00	0,00	0,00
C1	1493,18	69,09	29,94	0,00	0,96
C4	263,17	100,00	0,00	0,00	0,00
C2	224,78	94,95	0,40	0,00	4,65
C5	28,41	50,51	47,67	0,00	1,82
C9	11,95	100,00	0,00	0,00	0,00
C8	3,17	99,58	0,00	0,00	0,42
C7	1,80	98,28	1,72	0,00	0,00
C6	1,61	77,19	22,81	0,00	0,00
SJ6	3290,08	98,71	0,00	0,00	1,29
SJ9	2615,31	58,87	0,00	38,99	2,14
SJ11	302,49	50,78	0,00	48,24	0,98
SJ10	92,64	72,77	0,00	27,23	0,00
SJ1	26,57	100,00	0,00	0,00	0,00
SJ5	16,46	84,44	0,19	14,46	0,91
SJ2	10,19	87,46	0,33	11,49	0,72
SJ8	6,87	35,55	0,00	61,73	2,71
SJ12	6,86	100,00	0,00	0,00	0,00
SJ3	4,54	96,85	3,15	0,00	0,00
SJ7	1,49	73,30	0,00	22,56	4,14
SJ4	1,41	100,00	0,00	0,00	0,00
CC4	8928,97	97,45	2,28	0,00	0,00
CC1	258,70	100,00	0,00	0,00	0,00
CC3	65,21	100,00	0,00	0,00	0,00
CC2	7,15	98,57	1,16	0,00	0,27
SC1	7581,28	78,58	1,07	12,95	7,41
SC6	202,80	67,36	0,00	32,64	0,00
SC5	97,97	65,88	0,03	32,87	1,22
SC3	83,87	98,86	0,00	0,00	1,14
SC4	82,96	17,92	0,00	72,16	9,92
SC7	21,52	69,96	0,18	28,92	0,93
SC2	14,72	76,03	0,40	14,97	8,59

## VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

Todas las variables físicoquímicas mostraron oscilaciones entre los diferentes sitios, destacándose los amplios rangos hallados en las concentraciones de nutrientes: 4.18-1529.67 µg/L para el Fósforo total, 352.48-20538.38 µg/L para el Nitrógeno total y 4.12-10595.90 µg/L para el Amonio (**Tabla 3.2**).

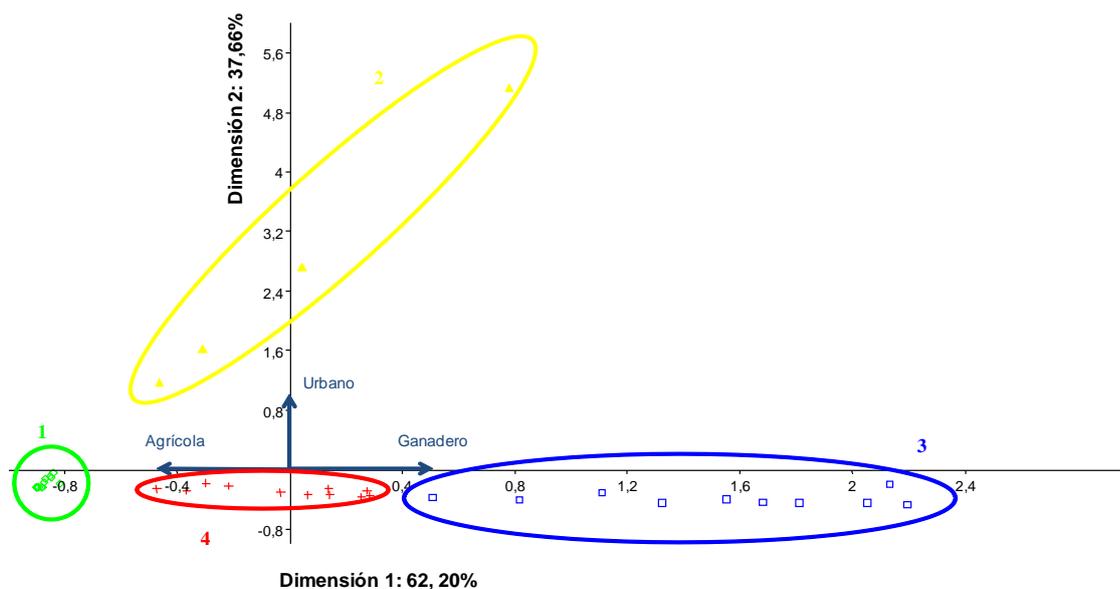
**Tabla 3.2** Parámetros físicoquímicos: sólidos totales en suspensión, (SST), materia orgánica en suspensión (MOS), concentración de oxígeno disuelto (O.D), pH, conductividad (Cond), temperatura (T), concentración de fósforo total (Pt), nitrógeno total (Nt), amonio (NH<sub>4</sub>), materia orgánica en sedimento (MO), diámetro medio de grano (phi) y concentración de plomo en sedimento (Pb). Sitios de muestreo: Santa Lucía Grande (SG), Canelón Grande (CG), Colorado (C), San José (SJ), Canelón Chico (CC) y Santa Lucía Chico (SC).

Sitio	STS (mg/L)	MOS (mg/L)	O.D. (mg/L)	pH	Cond (µS/cm)	T (°C)	Pt (µg/L)	Nt (µg/L)	NH <sub>4</sub> (µg/L)	MO (g)	Diámetro (phi)	Pb (µg/g)
SG1	57,28	15,93	4,08	7,42	221,00	17,00	36,05	575,88	82,85	1,75	0,39	9,75
SG2	64,97	25,79	10,24	7,30	264,00	13,80	22,02	421,16	39,82	5,25	1,63	7,83
SG3	23,52	13,65	9,32	7,69	131,10	19,30	27,97	378,53	76,92	3,50	0,64	8,79
SG4	14,70	4,39	9,40	7,65	119,50	15,90	29,67	369,06	66,12	2,75	0,64	8,31
SG5	5,47	1,93	6,60	7,43	96,20	15,00	4,18	352,48	46,56	1,25	-0,11	6,17
SG6	13,67	5,08	4,80	6,88	176,80	15,20	46,88	646,13	4,12	2,50	0,11	7,40
SG7	15,02	6,29	7,62	7,45	190,30	16,80	63,53	605,87	9,25	1,25	0,11	7,40
SG8	28,25	10,67	7,67	7,65	136,50	15,80	24,15	665,87	18,66	2,75	4,04	6,30
CG1	84,54	19,50	3,79	7,44	838,00	16,30	587,63	2332,26	85,20	7,50	5,96	7,77
CG2	66,53	10,59	8,60	7,50	283,00	11,96	688,28	1102,81	10,20	11,75	1,04	15,70
C1	28,59	9,47	5,50	7,37	631,00	14,45	1529,67	14383,47	327,31	2,50	5,40	9,48
C2	22,35	5,41	9,48	7,88	345,00	13,09	725,83	1527,08	251,20	7,50	1,94	17,55
C3	54,54	8,51	8,08	7,80	595,00	14,27	806,86	1792,74	515,86	6,50	0,80	7,55
C4	58,30	12,64	7,74	7,95	793,00	14,06	773,26	220,58	157,52	5,75	5,97	9,63
C5	14,25	6,42	5,44	7,92	637,00	15,39	1244,11	7043,34	440,16	2,75	-0,34	3,67
C6	22,16	8,45	5,52	7,99	702,00	15,30	717,10	3848,47	350,21	3,75	0,78	9,35
C7	30,65	7,93	8,68	8,04	707,00	14,98	616,10	3641,47	21,55	2,75	3,44	7,55
C8	11,90	5,31	8,71	8,07	610,00	15,58	595,28	1093,34	5,60	6,00	4,49	9,52
C9	41,51	7,33	3,97	7,73	516,00	16,21	502,14	1368,05	10,07	3,75	6,30	9,44
SJ1	96,10	20,11	6,33	7,05	239,00	15,00	472,47	1955,35	51,00	6,25	6,52	6,22
SJ2	35,82	1,93	7,42	7,57	227,00	15,98	944,94	1349,10	66,75	6,25	6,52	6,22
SJ3	40,64	11,08	5,78	7,45	198,00	15,03	836,79	1312,46	390,74	6,00	5,61	9,47
SJ4	80,91	15,00	5,07	7,28	113,00	15,50	529,07	1977,03	176,89	8,25	5,61	6,63
SJ5	31,87	12,60	2,75	7,49	343,00	15,73	1026,91	20538,28	10595,90	5,50	0,31	2,22
SJ6	91,53	16,51	7,21	7,83	379,00	15,70	451,22	1105,55	107,59	9,25	5,77	3,78
SJ7	68,20	12,61	7,89	7,92	177,00	14,59	248,95	811,90	83,97	33,75	6,06	7,28
SJ8	25,15	7,74	9,74	7,56	187,00	11,47	27,97	532,46	48,40	22,25	5,89	5,08
SJ9	55,61	9,52	9,38	7,67	184,00	11,60	133,79	713,23	56,68	13,00	4,07	4,04
SJ10	15,16	3,47	8,44	7,68	238,00	11,87	58,14	610,61	53,00	13,25	4,98	4,56
SJ11	92,41	49,27	5,26	7,43	190,00	11,83	193,85	842,69	315,49	14,25	4,53	4,30
SJ12	70,60	12,66	8,82	7,21	367,00	11,62	262,97	627,98	177,71	21,50	4,05	4,43
CC1	36,98	7,29	7,68	7,21	538,00	9,00	277,14	874,26	12,52	7,25	6,58	6,69
CC2	22,34	4,95	4,70	7,03	486,00	11,04	97,37	755,98	99,42	9,75	1,99	6,69
CC3	90,40	17,84	7,80	7,22	582,00	10,90	656,47	932,68	23,26	10,25	6,58	13,21
CC4	131,02	17,66	8,00	7,58	162,00	18,34	590,18	1003,72	60,56	5,25	1,99	6,61
SC1	32,50	6,78	8,74	7,43	202,00	14,29	140,02	435,37	37,06	17,50	3,69	19,72
SC2	20,88	8,51	10,36	7,35	188,00	12,41	240,31	667,45	59,75	16,25	1,89	15,63
SC3	53,31	13,78	8,79	7,70	260,00	12,82	276,57	915,31	428,56	9,33	5,93	6,81
SC4	12,00	5,60	8,13	7,25	119,40	14,80	56,45	468,52	22,03	2,50	1,68	6,61
SC5	20,02	4,94	8,76	7,30	192,00	16,81	142,00	1568,92	14,57	1,50	0,25	5,99
SC6	51,19	35,02	8,10	7,38	261,00	16,39	198,38	1522,35	71,40	2,75	1,17	4,50
SC7	25,46	6,12	5,79	7,30	99,00	17,22	325,44	1657,33	19,58	4,00	0,09	2,82

### Caracterización de la cuenca según uso de suelos y variables Fisico-Químicas

Los patrones de uso del suelo de los sitios estudiados se muestran en la **Figura 3.1**, donde se puede observar 4 grandes grupos de sitios. Se retuvieron dos dimensiones las cuales explican el 99.86% de la varianza observada, con un valor propio de 1.87 y 1.30 respectivamente. Los aportes de cada sitio y de las variables (usos del suelo) a las dos dimensiones se muestran en la (**Tabla 3.3**). El grupo 1 reúne a los sitios que en general tienen una alta contribución a la dimensión 1 en sentido negativo: **CG1, C2, C3, C4, C7, C8, C9, SJ1, SJ3, SJ4, SJ6, SJ12, CC1, CC2, CC3, CC4** y **SC3**. Esta dimensión a su vez está determinada en sentido negativo por la variable agricultura (**Tabla 3.3**). El grupo 1 estaría conformado por sitios que presentan altos porcentajes de superficie agrícola (rango: 94.95-100%). El grupo 2 (**CG2, C1, C5** y **C6**) está conformado por sitios que presentan altos porcentajes de superficie urbanizada (rango: 22.81-86.67%). El grupo 3 (**SG1, SG2, SG3, SG4, SG5, SG8, SJ8, SJ11, SJ9** y **SC4**) se compone por sitios con altos porcentajes de superficie ganadera (rango: 38.99-82.51%). Finalmente, un cuarto grupo (**SJ7, SG6, SG7, SJ10, SC1, SC2, SC5, SC6, SC7, SJ5** y **SJ2**) está conformado por sitios que no explican la varianza observada para ninguna de las dimensiones.

El grupo 2 presenta un 75% de sitios que mostraron actividad estrogénica y citotoxicidad, seguido por el grupo 3 con un 60%, el 1 con un 47%, y finalmente el grupo 4 con un 45%.



**Figura 3.1** Análisis de Componentes Principales de sitios de muestreo en la cuenca del Santa Lucía. Se observan 4 grupos según los usos del suelo.

**Tabla 3.3** Contribución de los sitios de muestreo y las variables de usos del suelo a los factores considerados en el ACP. Sitios de muestreo: Santa Lucía Grande (SG), Canelón Grande (CG), Colorado (C), San José (SJ), Canelón Chico (CC) y Santa Lucía Chico (SC).

<b>Sitio</b>	<b>Dimensión 1</b>	<b>Dimensión 2</b>
SG1	2,1363	-0,20229
SG2	2,0567	- 0,45381
SG3	1,6849	-0,43436
SG4	1,5551	-0,40133
SG5	2,198	-0,479
SG6	0,27154	-0,28416
SG7	0,13501	-0,26131
SG8	1,1113	-0,31811
CG1	-0,85023	-0,10428
CG2	0,77694	5,127
C1	-0,31343	1,6135
C2	-0,81717	-0,19268
C3	-0,902	-0,24565
C4	-0,902	-0,24565
C5	0,039692	2,7161
C6	-0,46586	1,1663
C7	-0,86911	-0,13918
C8	-0,89503	-0,2431
C9	-0,902	-0,24565
SJ1	-0,902	-0,24565
SJ2	-0,47751	-0,26266
SJ3	-0,84177	-0,050668
SJ4	-0,902	-0,24565
SJ5	-0,37203	-0,28098
SJ6	-0,88059	-0,23782
SJ7	-0,03568	-0,30261
SJ8	1,3256	-0,45374
SJ9	0,512	-0,37452
SJ10	0,060711	-0,34472
SJ11	0,81978	-0,41522
SJ12	-0,902	-0,24565
CC1	-0,902	-0,24565
CC2	-0,87534	-0,17221
CC3	-0,902	-0,24565
CC4	-0,85392	-0,10288
SC1	-0,30087	-0,18164
SC2	-0,22235	-0,22319
SC3	-0,88308	-0,23873
SC4	1,8139	-0,44802
SC5	0,28094	-0,35598
SC6	0,25198	-0,3644
SC7	0,1395	-0,33402
<b>Variable</b>	<b>Dimensión 1</b>	<b>Dimensión 2</b>
Agrícola	-0,7141	-0,2031
Urbano	0,05447	0,938
GanExt	0,6979	-0,281

Al realizar el Análisis de Similitud (ANOSIM,  $p < 0.05$ ) utilizando los cuatro grupos definidos anteriormente, se detectaron diferencias significativas entre los valores de usos del suelo (ANOSIM,  $R = 0.90$ ,  $p < 0.0001$ ). Indicando una clara discriminación entre los sitios.

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los valores de los parámetros físico-químicos, teniendo en cuenta los grupos definidos según los usos del suelo, se realizó el Análisis de Similitud (ANOSIM,  $p < 0.05$ ). Dicho análisis detectó diferencias significativas al utilizar los 4 grupos (ANOSIM,  $R = 0.31$ ,  $p = 0.0001$ ). Es decir, los sitios asociados a los diferentes usos del suelo diferirían en los valores de las variables fisicoquímicas.

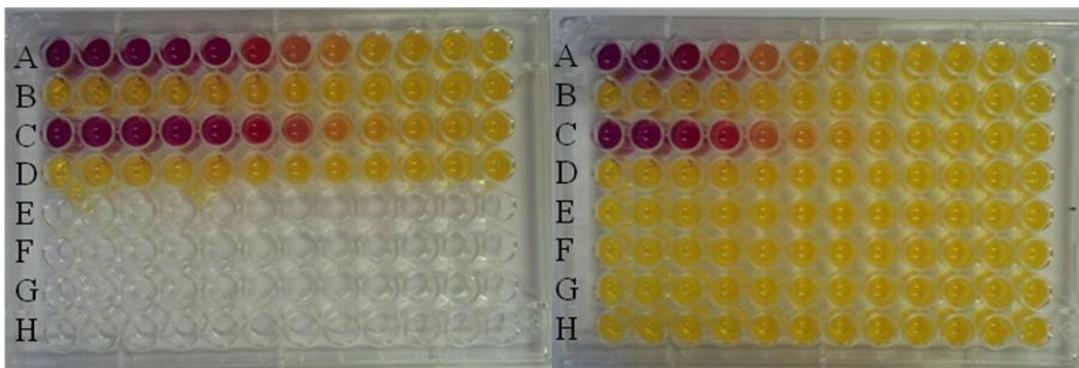
Los diferentes usos del suelo se asocian de manera distinta a algunas variables fisicoquímicas. El porcentaje de urbanización se correlaciona positivamente con la concentración de fósforo y Plomo y negativamente con el oxígeno disuelto. El porcentaje de superficie agrícola se correlaciona también de forma positiva con la concentración de fósforo, la conductividad y con los sólidos totales disueltos. El área de ganadería extensiva y forestación presentaron el mismo patrón, ambas se correlacionaron negativamente con la concentración de fósforo total y con los sólidos totales disueltos (**Tabla 3.4**)

**Tabla 3.4** Correlaciones para las variables ambientales. Para la Temperatura y el pH se utilizó el coeficiente de correlación lineal mientras que para el resto de las variables no paramétricas el coeficiente de correlación de Spearman. Los valores en negrita son significativos ( $p < 0,005$ ).

Variable	Pb	Phi	MO	MOS	STS	K	O2	Amonio	Fósforo	Area	Agr	Urb	Gan	Forest	pH	T
Pb	1															
Phi	0,079	1														
MO	0,003	<b>0,47</b>	1													
MOS	0,14	0,1	0,18	1												
STS	0,14	0,18	0,2	<b>0,82</b>	1											
K	0,26	0,22	0,1	-0,085	0,1	1										
O2	-0,19	-0,09	<b>0,32</b>	-0,096	-0,13	-0,09	1									
Amonio	-0,0068	0,25	0,0013	<b>0,34</b>	0,27	-0,1	-0,2	1								
Fósforo	0,1	0,15	-0,0028	0,18	<b>0,3</b>	<b>0,46</b>	<b>-0,3</b>	<b>0,42</b>	1							
Area	0,003	0,21	0,18	-0,2	-0,22	-0,28	-0,057	-0,18	<b>-0,4</b>	1						
Agri	0,036	0,22	0,2	0,17	<b>0,4</b>	<b>0,37</b>	-0,15	0,19	<b>0,6</b>	<b>-0,4</b>	1					
Urb	<b>0,35</b>	0,0037	-0,1	-0,14	-0,14	0,27	<b>-0,3</b>	0,14	<b>0,38</b>	0,2	-0,15	1				
Gan	-0,18	-0,24	-0,088	-0,14	<b>-0,34</b>	<b>-0,51</b>	0,23	-0,29	<b>-0,82</b>	<b>0,48</b>	<b>-0,81</b>	-0,29	1			
Forest	-0,048	-0,22	-0,32	-0,21	<b>-0,4</b>	<b>-0,46</b>	0,25	-0,22	<b>-0,64</b>	<b>0,41</b>	<b>-0,79</b>	0,017	<b>0,71</b>	1		
pH	0,13	-0,026	0,027	0,0063	0,094	0,29	-0,11	-0,037	0,2	-0,19	0,16	-0,11	-0,11	<b>-0,33</b>	1	
T	-0,098	-0,26	<b>-0,65</b>	0,085	0,12	-0,24	-0,15	0,18	0,13	-0,17	-0,14	0,064	0,024	0,15	0,19	1

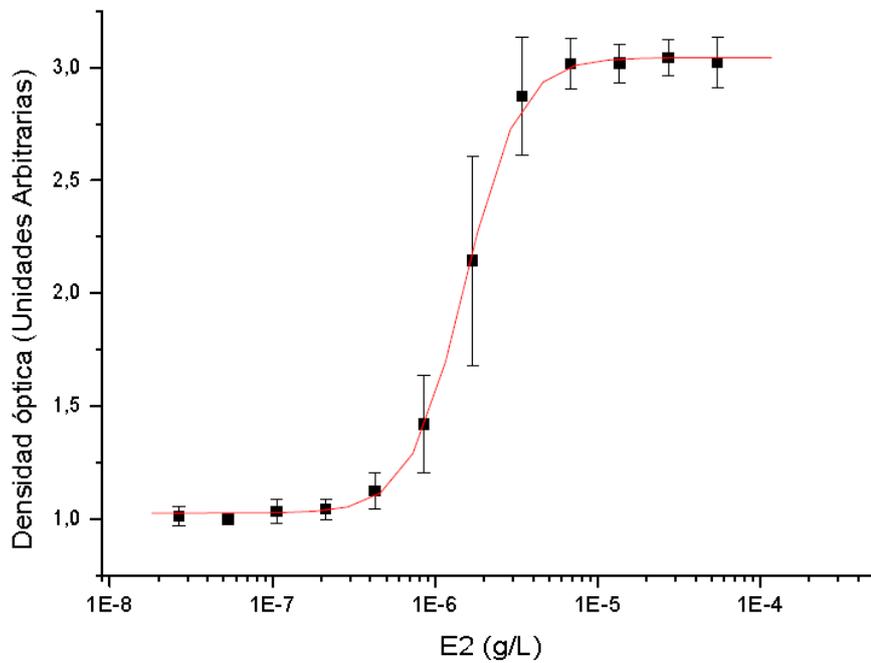
## Estrogenicidad

Se realizaron un total de 6 ensayos, cada uno con la curva de E2 correspondiente. Tanto para el E2 como para las muestras con actividad estrogénica, en las líneas A y C se observa la coloración rosa resultado de la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa. Mientras que, en los pocillos B, D, F y H correspondientes a los blancos o a las muestras sin actividad estrogénica se observa la coloración amarilla típica del medio de análisis (en el caso de la placa de estradiol estos últimos pocillos se encuentran vacíos) (**Figura 3.2**).



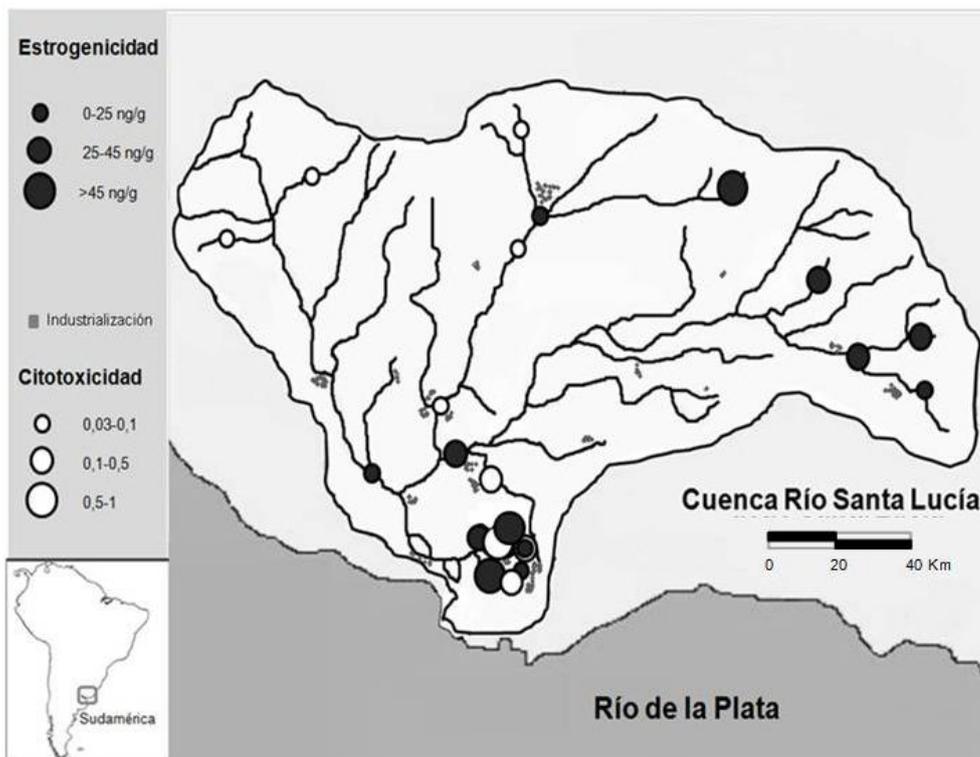
**Figura 3.2** Placa de ensayo del  $17\beta$ -Estradiol (izquierda) y de las muestras C9 (Colorado) y SJ3 (San José) (derecha).

La curva concentración-respuesta para las diferentes concentraciones de E2 (26.6 ng/L a 54.48  $\mu\text{g/L}$ ) muestra una forma sigmoïdal característica con un valor promedio mínimo de absorbancia de 1.03 y máximo de 3.04. Se calculó para cada ensayo el valor de  $EC_{50}$ , revelando un valor promedio de  $1.63 \pm 0.47 \mu\text{g/L}$ . A partir de estos datos, y de acuerdo al rango de diluciones realizadas, se calcularon los valores por gramo de sedimento. El valor del Límite de Detección fue de 0.69 ng EQ-E2 /g de sedimento (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3** Curva de 17 $\beta$ -Estradiol (E2) promedio de los 6 ensayos realizados. Densidad óptica (540 nm) en unidades arbitrarias.

Los resultados de los ensayos de actividad estrogénica a partir de las muestras de sedimento para todos los puntos se muestran en la **Tabla 3.5**. Se observó estrogénicidad en 13 de los 42 sitios analizados. En todas las subcuencas se halló actividad estrogénica excepto en la del Canelón Chico (**Figura 3.4**).



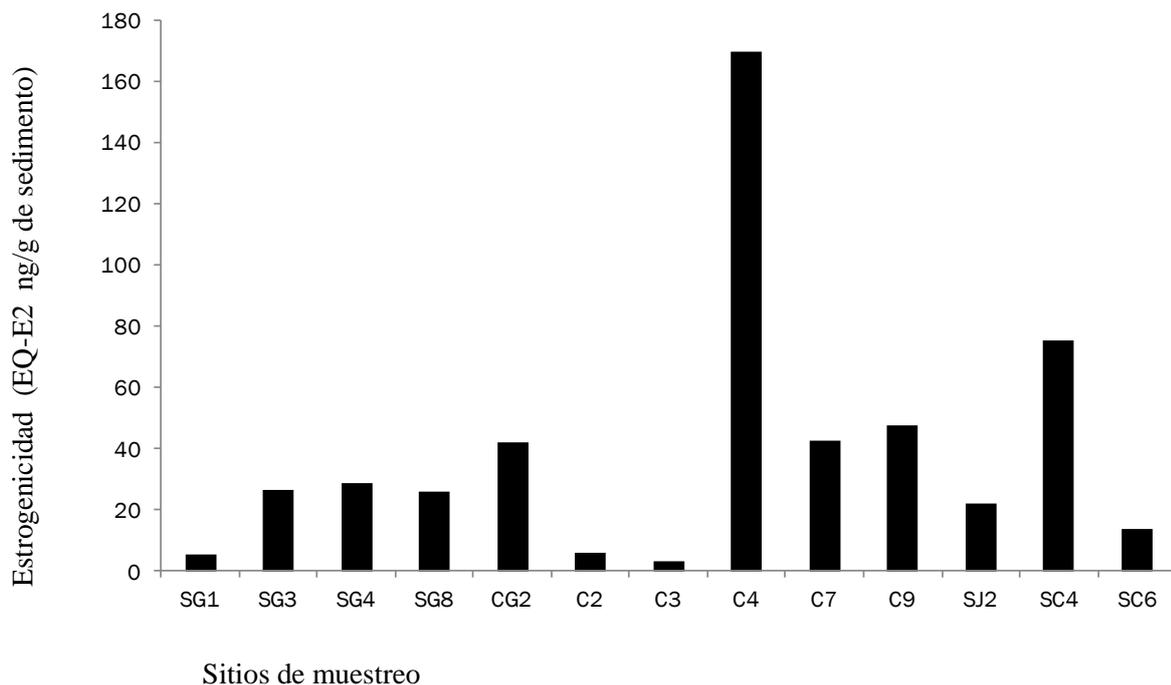
**Figura 3.4** Mapa de estrogénicidad y citotoxicidad en la cuenca del Río Santa Lucía. La estrogénicidad se presenta en 3 rangos de concentraciones al igual que la citotoxicidad de acuerdo a la relación de Frische (2009) teniendo en cuenta el factor de dilución 1.

La cuenca con mayor presencia de estrogenicidad fue la del Colorado con un 55% de los sitios, seguido por Santa Lucía Grande y Canelón Grande (50% ambas), Santa Lucía Chico (28.6%) y San José (8.3%).

**Tabla 3.5** Actividad estrogénica expresada en equivalentes de estradiol (EQ-E2) y citotoxicidad. Santa Lucía Grande (SG), Canelón Grande (CG), Colorado (C), San José (SJ), Canelón Chico (CC) y Santa Lucía Chico (SC).

Sitio	EQ-E2 (ng/g)	Citotoxicidad
SG1	5,32	NO
SG2	<LD	NO
SG3	26,61	NO
SG4	28,64	NO
SG5	<LD	NO
SG6	<LD	NO
SG7	<LD	NO
SG8	26,14	NO
CG1	<LD	NO
CG2	41,94	NO
C1	<LD	SI
C2	6,04	SI
C3	2,92	NO
C4	170,18	NO
C5	<LD	SI
C6	<LD	NO
C7	42,57	NO
C8	<LD	NO
C9	47,59	NO
SJ1	<LD	NO
SJ2	22,30	NO
SJ3	<LD	NO
SJ4	<LD	NO
SJ5	<LD	NO
SJ6	<LD	NO
SJ7	<LD	NO
SJ8	<LD	SI
SJ9	<LD	NO
SJ10	<LD	SI
SJ11	<LD	NO
SJ12	<LD	NO
CC1	<LD	NO
CC2	<LD	SI
CC3	<LD	NO
CC4	<LD	NO
SC1	<LD	NO
SC2	<LD	SI
SC3	<LD	SI
SC4	75,25	NO
SC5	<LD	NO
SC6	13,66	NO
SC7	<LD	SI

Los valores de estrogenicidad teniendo en cuenta únicamente los sitios donde se halló actividad se muestran en la **Figura 3.5**. El valor máximo (170.18 EQ-E2 ng/g de sedimento) se halló en el A° Colorado, mientras que el mínimo (2.92 EQ-E2 ng/g de sedimento) se observó en las nacientes del mismo arroyo.



**Figura 3.5** Valores de equivalentes de estradiol para los sitios que presentaron estrogenicidad: Santa Lucía Grande (SG), Canelón Grande (CG), Colorado (C), San José (SJ), Canelón Chico (CC) y Santa Lucía Chico (SC).

### Citotoxicidad

En nueve muestras se constató inhibición del crecimiento de la levadura adjudicado a la alta toxicidad de las mismas. Esta inhibición se cuantificó de acuerdo a la relación presentada por Frische (2009) y se presenta en la **Tabla 3.6**, para las diferentes diluciones de las muestras donde se observó inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*.

**Tabla 3.6** Estimación de la citotoxicidad (inhibición del crecimiento de la levadura). Colorado (C), Santa Lucía Chico (SC), San José (SJ) y Canelón Chico (CC). Se presentan los sitios donde los valores de absorbancia de las muestras fueron menores a los del blanco

Sitios	Factor de dilución					
	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313
<b>C5</b>	0,92	0,63	0,20	NO	NO	NO
<b>CC2</b>	0,26	0,075	0,063	0,046	0,032	NO
<b>C2</b>	0,23	NO	NO	NO	NO	NO
<b>C1</b>	0,24	0,0038	NO	NO	NO	NO
<b>SC3</b>	0,081	NO	NO	NO	NO	NO
<b>SC2</b>	0,050	NO	NO	NO	NO	NO
<b>SJ8</b>	0,050	0,042	NO	NO	NO	NO
<b>SC7</b>	0,041	0,039	NO	NO	NO	NO
<b>SJ10</b>	0,035	0,021	0,017	NO	NO	NO

Legenda NO: No observado

### Estrogenicidad y variables fisicoquímicas

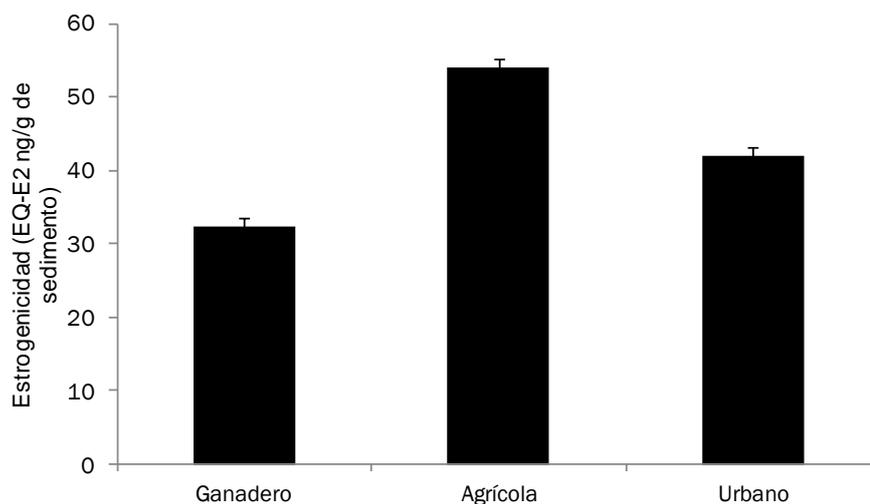
Se realizaron análisis de correlaciones no paramétricos entre la estrogenicidad y las diferentes variables ambientales. Se encontró únicamente una relación negativa entre la estrogenicidad y la materia orgánica en suspensión y marginalmente positiva entre la estrogenicidad y el tamaño del grano (**Tabla 3.7**).

**Tabla 3.7** Correlaciones no paramétricas para las variables ambientales y la estrogenicidad. Los valores de los coeficientes de correlación de Spearman en negrita son significativos ( $p < 0,005$ ).

Variable	Estrogenicidad	<i>p</i>
<b>Pb</b>	0,24	0,11
<b>Phi</b>	0,3	0,056
<b>MO</b>	-0,064	0,69
<b>MOS</b>	<b>-0,31</b>	0,046
<b>STS</b>	0,034	0,83
<b>K</b>	0,0043	0,98
<b>O2</b>	0,067	0,67
<b>Amonio</b>	0,0088	0,96
<b>Fósforo</b>	0,26	0,10
<b>Area</b>	0,016	0,96
<b>Agrícola</b>	-0,096	0,53
<b>Urbano</b>	0,091	0,56
<b>Ganadería</b>	-0,048	0,76
<b>Forestación</b>	-0,076	0,63
<b>pH</b>	0,069	0,66
<b>T</b>	0,27	0,075

### Asociación entre la estrogenicidad y usos del suelo

Al graficar la estrogenicidad para los diferentes usos del suelo, se observa que el nivel agrícola presenta el mayor valor, seguido por el urbano y por último el ganadero (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** Valores de estrogenicidad (para los sitios que presentaron actividad estrogénica) según los diferentes usos del suelo: Agrícola, Ganadería extensiva y Urbano. Las barras corresponden a los valores de error estándar.

Se planteó un GLM para investigar si la estrogenicidad podía explicarse según los diferentes usos del suelo. Para ello se utilizó la ordenación en 4 grupos obtenida mediante el análisis de componentes principales (**Figura 3.1**). El output de este modelo muestra que los valores de estrogenicidad para los sitios donde predomina el uso agrícola difieren significativamente de los valores correspondientes al uso de ganadería extensiva pero no al uso urbano ( $p = 3.16 \times 10^{-7}$  y 0.13 respectivamente) (**Tabla 3.8**).

**Tabla 3.8** Modelos utilizados para evaluar la relación entre la estrogenicidad (EQ-E2 ng/g de sedimento) y la variable categórica uso del suelo, así como la estrogenicidad y la concentración de Plomo en sedimento. Se muestran los valores de ajuste de ambos modelos así como los resultados de los parámetros y errores estándares (SE).

<b>Modelo</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
<b>m1= EQ-E2 ~</b>		
<b>Usuelo</b>	0,064	0,0074
<b>m2= EQ-E2 ~ Pb</b>	0,024	1,35e -06
<b>Usos del Suelo</b>	<b>Medias</b>	<b>SE</b>
<i>Urbano</i>	42,10	1,19
<i>Agrícola</i>	54,05	1,06
<i>Ganadería Extensiva</i>	32,46	1,10
<b>Concentración Pb</b>	<b>Parámetro</b>	<b>SE</b>
<i>Intercepto</i>	66,02	1,17
<i>Pendiente</i>	0,96	1,015

La variable categórica uso del suelo tuvo un efecto significativo sobre la estrogenicidad. Los valores de las medias obtenidos para los diferentes grupos coinciden en general con las tendencias observadas en el análisis exploratorio de los datos (**Figura 3.6**): los sitios que presentaron la mayor estrogenicidad fueron los asociados al uso agrícola seguidos por el uso urbano y por último el ganadero.

Usando el Plomo como marcador industrial en el segundo modelo, se observa una asociación significativa sobre la variable de respuesta ( $p = 2e-16$ ). A partir de los componentes y parámetros del modelo (**Tabla 3.8**) se obtuvo la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{EQ-E2} = 66.02 + 0.96 * \text{Pb.}$$

Esto significa que por cada unidad de aumento de concentración de plomo el valor de estrogenicidad aumenta 0.96 veces.

## DISCUSIÓN

### Calidad de agua en la cuenca del Río Santa Lucía

A partir de la determinación de diferentes parámetros ambientales así como la caracterización de los usos de suelo de la cuenca, se pudo llegar a una aproximación del estado de calidad de agua de la cuenca, que en general concuerda con otros estudios realizados en la misma (Inda

& Indarte, 2010; DINAMA, 2011; Informe Udelar, 2013). Resaltando la sobrecarga de nutrientes sobre todo de Fósforo que existe en varios puntos de la cuenca y que generalmente se ha acompañado con problemas de eutrofización y presencia de blooms algales (Inda & Indarte, 2010)

Los valores de **oxígeno disuelto** difirieron significativamente entre sitios, el sitio que presentó menores valores (2.75 mg/L) se encuentra ubicado sobre una cañada en la ciudad de San José, donde el agua permanecía estancada y con mucha carga de desechos orgánicos lo que favorecía los bajos niveles de OD generando un ambiente con hipoxia. Este valor es inferior al límite de 5 mg/L que establece la legislación como estándar de calidad para aguas naturales de ríos (Decreto 253/79). Sin embargo, solo unos pocos sitios mostraron este comportamiento (valores menores a 5 mg/L) indicando que la mayoría presentaron niveles aceptables de oxígeno disuelto de acuerdo a los valores estándares de calidad de agua. Es importante tener en cuenta que los muestreos fueron realizados durante los meses de abril y mayo (donde en general no se presentaron altas temperaturas) y que niveles más altos de este parámetro en los meses fríos, son esperados de acuerdo a la relación inversa entre temperatura y concentración de oxígeno disuelto en agua.

El **pH** mostró un rango de entre 6.88 y 8.07, cayendo dentro del nivel aceptable para aguas naturales (6.5-8.5) (DINAMA, 2011). A pesar de que este parámetro no mostró una variación significativa ni ningún patrón espacial, existe una pequeña variación del pH que puede tener un efecto sobre la ionización de algunos grupos funcionales de PEs, pudiendo alterar los niveles de sustancias químicas estrogénicas en el medio (Li et al., 2011). Además el valor del pH puede afectar la capacidad de absorción de algunos compuestos estrogénicos como el EE2 (Wang et al., 2014a).

Tanto los valores de materia orgánica en suspensión como los de conductividad en general coinciden, para el caso de la cuenca del Colorado, con aquellos obtenidos en estudios anteriores sobre la misma (Teixeira-de Mello, 2007), indicando poca variación en las condiciones ambientales para dicha subcuenca en la última década.

Los niveles de **Fósforo Total** (exceptuando los sitios de Santa Lucía Grande, dos sitios de la cuenca alta del San José y un sitio en la naciente del Santa Lucía Chico) superaron la concentración máxima de 100 µg/L indicada según la normativa del Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA, 2013. Expte. 2013/08319.), donde

se ajusta la concentración de estos y otros parámetros para ríos y arroyos de cuenca del Río Santa Lucía. De acuerdo a los valores obtenidos, de los 42 sitios analizados, 7 cayeron dentro del rango de aguas eutróficas para la concentración de Pt (35-150 µg/L) y 29 dentro del rango de aguas supertróficas (>150 µg/L) (OCDE, 1982). Si bien no es tan sencillo establecer las causas de este exceso en Fósforo, debe considerarse que muchos de los sitios que presentaron altos valores están establecidos dentro de microcuencas con intensa actividad agrícola, además de la presencia de ciudades importantes en sus cercanías. Por lo cual reciben el aporte difuso de fósforo probablemente de origen agroquímico, además de aportes puntuales de origen doméstico o industrial. El valor mínimo fue hallado en el Arroyo Penitente de la cuenca del Santa Lucía Grande. El valor máximo se encontró en el Arroyo Las Piedras, que fue ligeramente mayor al encontrado por Teixeira-de Mello (2007) sobre el mismo punto. Este sitio, por su ubicación en la subcuenca recibe los aportes de una importante zona con actividad industrial y de las ciudades de La Paz y Las Piedras. Cabe destacar que resultados de Teixeira-de Mello muestran que sobre este mismo Arroyo se registró el valor mínimo del Índice de Calidad Agua dentro de la cuenca del Colorado. Existe una gran preocupación por controlar los efluentes industriales sin tratamiento que se vierten en este arroyo además de los domésticos, teniendo en cuenta sobre todo que solo el 22% de la población de Las Piedras cuenta con saneamiento y que además la cuenca de este arroyo es el destino de la red de saneamiento de la ciudad de La Paz.

Por otro lado, la carga de **Nitrógeno** también fue bastante alta en algunos puntos presentando su valor máximo en el sitio ubicado sobre una cañada en la ciudad de San José (que recibe todos los desechos domésticos de la ciudad y coincide con el punto donde se hallaron menores valores de OD). Otro de los puntos que presento valores altos (14383,47 µg/L) fue el sitio ubicado sobre el Arroyo Las Piedras (donde se halló la máxima concentración de fósforo). Nuevamente, las posibles causas que explicarían estos y otros valores altos encontrados (como son la mayoría de los sitios del Colorado, la cuenca baja del San José, el Canelón Grande y del Santa Lucía Chico cercano a la ciudad de Florida) se relacionan con el efecto de los vertidos urbanos e industriales próximos, así como los aportes desde las tierras cultivadas. El valor mínimo se halló nuevamente en el Arroyo Penitente del Santa Lucía Grande. Dentro de la subcuenca de Santa Lucía Chico, el sitio que presentó la mayor carga de nitrógeno con un valor de 1657.33 µg/L, fue el del embalse de Paso Severino. Este sitio también presento niveles elevados de fósforo (325.44 µg/L) cayendo en el rango de aguas supertróficas. Cabe destacar que este embalse constituye la principal reserva de agua dulce,

que se destina para su potabilización y distribución en el área metropolitana del país. La alta carga de nutrientes en este tipo de sistemas favorece la eutrofización, y la pérdida de calidad de agua. Estos resultados apoyan los publicados en el informe de DINAMA (2011) en donde destacan la importancia de investigar cuál es el origen de la descarga de estos nutrientes a fin de realizar gestiones para reducir el aporte, ya sea desde efluentes puntuales (como descargas domésticas de la ciudad de Florida o desde afluentes provenientes de tambos) o a partir de fuentes difusas (agricultura).

Por último, el valor máximo de **amonio** también fue hallado en el punto sobre la cañada del Río San José superando los estándares establecidos por la legislación nacional (1.5 mg/L) (OSE, 2006). Probablemente estas altas concentraciones estén vinculadas al vertido de aguas domésticas sin tratamiento en este punto. Los valores en los restantes sitios fueron inferiores al límite establecido por dicha legislación.

En resumen, la mayoría de los indicadores de calidad de agua cumplieron con los parámetros establecidos en la normativa nacional, excepto para el fósforo en la mayoría de los sitios. Otros parámetros, presentaron valores puntualmente fuera del rango establecido por dicha normativa. El principal sitio que aparece comprometido en cuanto a su calidad de agua, es el de la cañada que recibe desechos domésticos sin tratamiento de la ciudad de San José (tanto por la sobrecarga de nutrientes, los bajos valores de OD y la contaminación por amonio). Otros puntos donde se hallaron algunas problemáticas son: los sitios de la cuenca del Colorado particularmente sobre el Arroyo Las Piedras, el embalse de Paso Severino y los sitios ubicados sobre el Arroyo Canelón Grande por su alta carga en fósforo total.

Las subcuencas con mayor superficie cultivada (representadas principalmente por las nacientes del Colorado, la cuenca baja del San José, todos los puntos del Canelón Chico y una de las nacientes de Santa Lucía Chico, según los resultados del Análisis de Componentes Principales) se caracterizaron por poseer mayor conductividad, concentración de fósforo y sólidos en suspensión. Esto podría explicarse por una mayor tendencia a la erosión de los suelos cultivados, degradados y sin su vegetación natural (Barreto, 2008), así como por el uso de fertilizantes que generalmente se asocia con el aumento de los nutrientes y de la conductividad (Strayer et al., 2003). Por otro lado, las microcuencas con mayor superficie de urbanización (representadas por sitios asociados a las ciudades de La Paz, Las Piedras y Progreso, así como un sitio sobre la desembocadura del Canelón Grande) también poseen mayores concentraciones de fósforo además de plomo y menores valores de oxígeno disuelto.

Estas zonas estarían caracterizadas entonces por un enriquecimiento de fósforo debido a las descargas puntuales de efluentes domésticos e industriales y a su vez una menor calidad de agua indicada por los valores bajos de OD así como la mayor concentración de Pb que representa un marcador industrial.

#### Actividad estrogénica en la cuenca del Río Santa Lucía

Se observó estrogénicidad en la cuenca a partir del uso del ensayo YES. Se determinó la presencia de xenoestrógenos a partir de compuestos hidrofóbicos presentes en los sedimentos, limitando nuestras observaciones a los compuestos absorbidos al mismo. Dentro de los 13 sitios estrogénicos, se hallaron valores relativamente altos si comparamos con otros estudios. Se resalta que la técnica utilizada es una aproximación bastante conservadora, es decir se obtuvieron valores con límites de detección altos (de 0.69 ng EQ-E2 /g de sedimento) (**Tabla 4.1**).

Si bien la mayoría de los sitios que presentaron estrogénicidad se encuentran en la subcuenca del Colorado asociado a áreas con gran urbanización y agricultura, se halló actividad estrogénica en sitios que eran considerados con bajo impacto antrópico, lo que nos indica que hay múltiples fuentes que pueden estar actuando como xenoestrógenos además de la urbana y la agrícola. Ejemplo de ellos son la Laguna de los Cuervos, el sitio ubicado sobre el Arequita y sobre el Arroyo Casupá, todos localizados cerca de las nacientes del Santa Lucía Grande. En el caso del Arequita puede asociarse con la liberación de productos como detergentes como resultado de las actividades que allí se realicen (e. g. lavado de autos en los pasos de ganado). Para los otros sitios seguramente esté involucrada la liberación de pesticidas asociados a las actividades agrícolas que pueden estar actuando como xenoestrógenos, además de los surfactantes etoxilados que forman parte de la formulación de muchos de ellos.

**Tabla 4.1** Valores comparativos de estrogenicidad (media) en sedimento y agua para diferentes sistemas (lagos, ríos, estuarios y arroyos).

Sistema	País	EEQ E2 sedimento (ng/g)	EEQ E2 agua (ng/L)	Bibliografía
<b>Río Santa Lucía</b>	<b>Uruguay</b>	<b>170.18</b>	-	-
Lago Dlugi Staw	Polonia	140	-	Garcia-Reyero & Piña , 2005
Río Liaohe	China	0.12	1.06	Wang et al., 2011
Laguna Yundang	China	24	14	Zhang et al., 2011
Maryland	USA	-	2.0	Alvarez et al., 2013
Río Danube	Alemania	1	-	Grund et al., 2011
Río Cotia	Brasil	-	3.1	Jardim et al., 2012
Río Paraíba do Sul	Brasil	-	17	Dias et al., 2015
Río Ebro	España	0.3	2.0	Gorga et al., 2015
Peñarrubia	España	0.010 1	-	Schnell et al., 2013
Estuario Darwin Harbour	Australia	6.29	-	Frenc et al., 2015
Arroyo Browns	Australia	-	2.91	Coleman et al., 2008
Río Yeongsan	Korea	-	5.9	Duong et al., 2010

Otro de los sitios donde llamó la atención los altos valores de estrogenicidad hallados (75.25 ng de EQ-E2/g de sedimento) fue en las nacientes del Santa Lucía Chico (cercano al pueblo San Gabriel). Todos estos puntos tienen la característica común de que, además de áreas de cultivo, presentan parches de forestación cercanos. La preparación del terreno para las áreas de forestación incluye el control de malezas, la fertilización y el combate de hormigas, lo cual implica la aplicación de herbicidas, fertilizantes químicos y hormiguicidas. También son aplicados herbicidas para el control de malezas después de la plantación y después de cortados los árboles para eliminar los rebrotes (Cárcamo, 2010). En Uruguay muchas empresas utilizan compuestos que incluyen herbicidas, sustancias como el Agral 90 utilizado como coadyuvante (que en este caso refuerza la acción del herbicidas) y para el lavado de máquinas (que posee concentrado de oxido de etileno nonilfenólico como principio activo), hormiguicidas y fertilizantes (Cárcamo, 2010). Algunos herbicidas utilizados en esta actividad como el acetoclor, oxifluorfen, haloxifop metil y el hormiguicida fipronil, están considerados como potencialmente carcinogénicos según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US/EPA) y la Unión Europea (Pesticide action network UK, 2009). Además, el herbicida acetoclor está catalogado dentro de la lista de potenciales PEs (Pesticide action network UK, 2009). Otro herbicida utilizado durante la forestación es el glifosato, sobre el cual también existen estudios que lo

vinculan con el desarrollo de cánceres además de señalar que puede producir malformaciones neuronales, cardíacas e intestinales (RAP-AL, 2009).

Otro de los sitios considerado de bajo impacto antrópico y que sin embargo presentó estrogenicidad fue sobre el Arroyo Pintado que es un tributario de primer orden del Santa Lucía Chico. Aquí pueden estar involucradas otras actividades dado a que es una zona de ganadería con presencia de tambos. Históricamente, las preocupaciones relativas a zonas donde existe cría de ganado han sido relacionadas principalmente a problemáticas asociadas a la liberación de nutrientes (Jongbloed & Lenis, 1998). Más recientemente, las preocupaciones se han focalizado también sobre otros constituyentes presentes en el estiércol, tales como hormonas de origen natural (Hanselman et al., 2003). Algunos trabajos muestran que la estrona, es el estrógeno natural más comúnmente detectado en aguas superficiales asociadas con actividades ganaderas o campos donde estaba el estiércol animal formando parte del fertilizante aplicado (Céspedes et al., 2004; Thorpe et al., 2006). En el sector agropecuario, algunos animales son tratados con hormonas para optimizar el crecimiento y la fertilidad, como consecuencia de ello, lo que no es tomado por el organismo se elimina en las excretas que puede llegar a los ríos o fuentes de agua más próximas (Daughton, 2006). Estas hormonas sintéticas, como el etinilestradiol, que a diferencia de las hormonas naturales son persistentes, podrían ser fuente de xenoestrógenos.

En la desembocadura del Canelón Grande y Chico también se hallaron valores altos de estrogenicidad, aquí se recibiría la descarga no solo de los residuos de tratamientos del cuero en las curtiembres, los productos de desechos de frigoríficos u otras industrias o la contaminación doméstica de la ciudad de Canelones, sino que también la liberación de desechos desde fuentes difusas agrícolas. Es importante tener en cuenta que estos arroyos desembocan a 1 km aguas arriba de la represa de Aguas Corrientes (OSE), es decir del lugar donde se toma el agua a potabilizar. También se halló estrogenicidad sobre la desembocadura del Río San José, lo que podría estar vinculado al arrastre de los desechos domésticos, industriales y agrícolas que se vierten sobre el mismo. Estos sitios, al igual que el punto ubicado sobre el Arroyo San Francisco en la ciudad de Minas y los del Arroyo Colorado, cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que la estrogenicidad en estos puntos nos habla de la ineficiencia de las mismas para remover este tipo de compuestos.

Como ya se mencionó, la subcuenca del Colorado fue en la que se halló mayor cantidad de sitios con estrogenicidad, donde ocurre algo similar que con el sitio ubicado sobre el Canelón

Grande. A su vez, el punto donde se halló el valor máximo fue en esta misma microcuenca cercano a una zona de curtiembre. Esto se puede relacionar con el tratamiento que se realiza a las pieles usando una variedad de compuestos químicos, los cuales en la mayoría de las ocasiones luego de ser utilizados se arrojan a las fuentes hídricas más cercanas sin previo tratamiento. Por otro lado, en este tipo de actividades se utilizan detergentes etoxilados como productos de limpieza, lo que puede evidenciar la respuesta estrogénica que se encontró en dicha muestra (170.18 ng de EQ-E2/g de sedimento).

Además de las 13 muestras con estrogenicidad, se hallaron 9 sitios con presencia de citotoxicidad. Uno de ellos fue en el embalse de Paso Severino aguas abajo de la represa (donde también se hallaron elevados valores de fósforo). Si bien la citotoxicidad puede estar dada por múltiples tipos de compuestos no necesariamente PEs, es importante tener en cuenta la efectividad del tipo de tratamiento que se realiza en estas aguas.

Para el único caso que se pudo calcular la actividad estrogénica aunque haya habido inhibición del 23% del crecimiento de la levadura, fue para la muestra correspondiente al punto ubicado en la naciente del Arroyo Las Piedras. La muestra perteneciente al sitio ubicado aguas debajo de la ciudad de Progreso, fue la que provocó la mayor inhibición del crecimiento de la levadura con respecto al blanco, llegando a un 92% es decir, el crecimiento de la levadura fue 92% inferior al observado para el blanco. Además, se observa que los diferentes puntos responden distinto en cuanto a su toxicidad a las diferentes diluciones. Esto podría deberse a distintos tipos de compuestos con diferente umbral de toxicidad.

#### Asociación entre parámetros Físico-Químicos y estrogenicidad

Uno de los objetivos de trabajo era buscar posibles correlaciones entre las variables ambientales y la estrogenicidad. Dichas correlaciones no fueron halladas al menos de manera significativa, a excepción de la correlación negativa entre la materia orgánica en suspensión y la estrogenicidad, aunque esa relación se esperaba encontrar para la materia orgánica en sedimento y de manera positiva, dado a que la absorción de algunos PEs puede estar correlacionada con el contenido de carbono orgánico en sedimento (Lai et al., 2000). También se encontró una correlación positiva marginalmente significativa entre la estrogenicidad y el tamaño de grano de sedimento, dicha relación se esperaba fuese inversa teniendo en cuenta que el sedimento fino tiende a retener más los contaminantes.

Si bien se obtuvieron muchos valores por debajo del límite de detección ( $LD = 0.69$  ng EQ-E2/g de sedimento), esto no significa que no exista estrogenicidad, y sumado a los puntos que presentaron alta citotoxicidad en donde tampoco se pudo medir estrogenicidad, encontramos que los resultados muy conservadores, nos permiten asegurar la ausencia de falsos positivos. Además, la ausencia de una correlación entre la estrogenicidad y los parámetros indicadores de calidad de agua, concuerda con la existencia de diversas fuentes con descargas intermitentes de contaminantes, resultado que coincide con los hallados en otros estudios (Lopes et al., 2010).

Se utilizaron dos modelos para investigar si la estrogenicidad podía asociarse a los distintos usos del suelo y/o a la presencia de actividad industrial (concentración de Plomo en sedimento). Si bien se halló cierta asociación entre el Plomo y la estrogenicidad, el modelo planteado no presenta un buen ajuste, lo que impide afirmar que esta variable está directamente vinculada con la actividad estrogénica. De todas formas, sí puede estar asociada de manera indirecta con la misma por ejemplo, los lugares que presentan mayor concentración de plomo pueden estar relacionados con sitios de mayor contaminación urbana y por lo tanto, mayores fuentes puntuales de xenoestrogenos disponibles. De todas formas, resulta interesante el estudio de estrogenicidad ambiental vinculado a la presencia de metales pesados sobre todo teniendo en cuenta el efecto sinérgico que estos pueden tener con otros contaminantes. Estudios experimentales utilizando el ensayo YES demostraron que metales como el Cadmio, Cobre y Zinc eran capaces de potenciar la respuesta del estradiol, de forma dosis-dependiente, disminuyendo el valor del  $EC_{50}$  del estradiol en un factor de 10. Evidenciando que estos metales pueden actuar como PEs modulando la actividad estrogénica de hormonas endógenas (Denier et al., 2009).

Por otro lado, se hallaron diferencias estadísticas entre los distintos usos (eg. ganadero y agrícola), siendo como era de esperar el uso ganadero el que produce una menor liberación de este tipo de sustancias. Si bien el uso agrícola fue el que presentó en promedio los mayores valores de estrogenicidad, se halló estrogenicidad en todas las subcuencas y asociado a los diferentes usos del suelo, reforzando la idea de que la estrogenicidad ambiental es una variable multifactorial, dependiendo de múltiples actividades antrópicas.

### ¿Cuáles son las posibles fuentes de xenoestrógenos en la cuenca de Santa Lucía?

Existen diversos compuestos que pueden estar actuando como fuente de xenoestrógenos, sin embargo algunos de ellos pueden tornarse más importante teniendo en cuenta sobre todo el tipo de descarga o liberación al medio que poseen. La liberación al ambiente desde sitios urbanos (domésticos) por ejemplo, puede asociarse con la descarga de estrógenos sintéticos como el EE2, que si bien se encuentra en concentraciones generalmente casi imperceptibles es altamente estrogénico y persistente (Allinson et al., 2010), o los utilizados por mujeres durante la menopausia para reducir los síntomas. Además de los estrógenos naturales como la estrona y el E2.

Teniendo en cuenta que durante la extracción de las muestras de sedimento las mismas fueron lavadas en agua para eliminar muchas sustancias que podían estar interfiriendo con el crecimiento de la levadura, seguramente los compuestos que fueron retenidos son principalmente hidrofóbicos. De esta forma, nos enfocamos a sustancias estrogénicas como los alquilfenoles polietoxilados (AP), un grupo de surfactantes no iónicos, que en las plantas de tratamiento de aguas residuales, son inicialmente biodegradados derivando en metabolitos persistentes y altamente lipofílicos, incluyendo alquilfenoles etoxilados y finalmente, en alquilfenoles tales como el nonilfenol (NP) y octilfenol (OP) (Routledge & Sumpter, 1996). La solubilidad en agua del octil y nonilfenol es de 3,4 y 1,1 mg/L a 25 °C respectivamente. Debido a su naturaleza hidrofóbica y a que son descargados muchas veces directamente a los efluentes, son encontrados en concentraciones elevadas y en general, sus niveles son mayores en sitios cercanos a grandes ciudades o asociados a la actividad agrícola o industrial (Gorga et al., 2015). Los mismos son surfactantes, es decir bajan la tensión superficial por lo que mejoran la dispersión de los activos que se usan en detergentes, plaguicidas, ceras, detergentes para lavar cueros, lana y los mismos animales en tambos entre otras cosas. Las posibles fuentes de entrada de estas sustancias al medio son durante su producción, uso y deposición. La descarga de este tipo de compuesto va a parar a los cuerpos de agua y dada su alta hidrofobicidad, tienden a acumularse en los sedimentos. En Europa se han catalogado como sustancias peligrosas prioritarias en el ámbito de la política de la Directiva Marco del Agua (DMA) de la Unión Europea (UE) y en el año 2001, se estableció la eliminación progresiva de sus emisiones (Decisión nº 2455/2001/CE). En el año 2003 se prohibió en gran medida la comercialización y el uso del NP y sus etoxilados con un contenido superior al 0.1 por parte de la UE (Directiva 2003/53/CE), Sin embargo, estudios que incluyen países dentro

de la UE demuestran que no hay reducciones en la contaminación por NPs y confirman concentraciones elevadas de los mismos (Scheuer, 2010). La última normativa vigente, restringe el uso de estas sustancias también como productos de consumo, limpieza doméstica y tratamiento de textiles además del uso industrial (Reglamento 2009/552/CE). Sin embargo, los resultados de monitoreo y evaluación de contaminación con NPs por parte de las autoridades no son tan claros, por lo tanto, es difícil determinar si realmente se está logrando la reducción progresiva de estas sustancias al ambiente tal como exige la normativa (Scheuer, 2010).

En Uruguay, son múltiples los productos utilizados que contienen etoxilados en sus formulaciones. De hecho hay 91 productos domisanitarios (productos de limpieza, desinfección, desinfestación que se usan a nivel doméstico, industrial e institucional) registrados en el Ministerio de Salud Pública de uso autorizado que contienen este tipo de compuestos (DIGESA, MSP). Entre ellos se encuentran productos de limpieza, aromatizantes, desinfectantes, insecticidas, desengrasantes, entre otros. De todas maneras, existen muchos otros compuestos químicos que pueden ser perturbadores endócrinos y más aún dependiendo de la presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos, la biodisponibilidad y toxicidad de los mismos puede variar. Es por ello que consideramos el análisis de la respuesta (i.e. estrogenicidad) y no la cuantificación analítica de un compuesto determinado como la mejor herramienta para determinar el grado de calidad de ambiental de un cuerpo de agua.

La regulación de los PEs es escasa, debido al desconocimiento de sus efectos, además de que no se tiene un inventario de “todas” las especies químicas presentes en una muestra ambiental, por limitaciones analíticas. Aunque muchos estudios han mostrado los efectos de los PEs todavía muchos países no tienen establecidos límites de los mismos en el vertido de aguas residuales (Belgiomo et al., 2007). La clave para resolver el problema que se plantea es que las emisiones de estas sustancias químicas sean eliminadas de manera progresiva, y sus usos sustituidos por alternativas más seguras. Es necesario incrementar el conocimiento sobre el origen, la transformación y los efectos de estos contaminantes, para prevenir la comercialización y liberación al medio de estas sustancias y proponer los mecanismos de tratamiento del agua, con el fin de garantizar una calidad idónea y sin efectos para la salud humana y los organismos acuáticos (Liu et al., 2009).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la contaminación en sedimentos por sustancias estrogénicas ocurre en diversos sitios de la cuenca del Río Santa Lucía, asociado a múltiples fuentes de contaminación. Esta tesis describe por primera vez en Uruguay la presencia de sustancias estrogénicas en el ambiente a partir de un método directo como el ensayo YES, muchas veces mostrando valores realmente altos comparado a otros trabajos indicando la pertinencia de estas mediciones en nuestros cuerpos de agua.

Los resultados muestran que el material particulado transportado por los distintos afluentes y efluentes que forman el sistema fluvial del Río Santa Lucía, tiene un alto potencial de efectos de perturbación endócrina. La entrada de contaminantes se da por pulsos liberados al agua, los cuales luego se acumulan en los sedimentos por procesos de especiación y partición, y luego son resuspendidos nuevamente a la columna de agua (e.g. por difusión simple). Es por ello que resulta relevante a la hora de evaluar la calidad de agua, los análisis de estrogenicidad en sedimento ya que la dinámica de acumulación en la columna de agua dependerá de los pulsos de liberación y la resuspensión desde los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts. 2009. [www.pan-uk.org](http://www.pan-uk.org).

Achkar, M., Domínguez, R.A. & Pesce, F. 2004. Diagnóstico socioambiental participativo en Uruguay. Programa: Uruguay Sustentable. REDES, 157 pp. Uruguay.

Achkar, M., Dominguez, A. & Pesce, F. 2012. Cuenca del Río Santa Lucía – Uruguay. Aportes para la discusión ciudadana. Programa: Uruguay Sustentable. REDES, 25 pp. Uruguay.

Allan, J.D. & Johnson, L.B. 1997. Catchment-scale analysis of aquatic ecosystems. *Freshwater Biology* 37: 107-111.

Allinson, M., Shiraishi, F., Salzman, S.A. & Allinson, G. 2010. In vitro and immunological assessment of estrogenic activity and concentrations of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, and ethinyl estradiol in treated effluent from 45 wastewater treatment plants in Victoria, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 576-586.

Alvarez, D.A., Shappell, N.W., Billey, L.O., Bermudez, D.S., Wilson, V.S., Kolpin, D.W., Perkins, S.D., Evans, N.W., Foreman, T., Gray, J.L., Shipitalo, M.J. & Meyer, M.T. 2013. Bioassay of estrogenicity and chemical analyses of estrogens in streams across the United States associated with livestock operations. *Water Research* 47: 3347-3363.

APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA/AWWA/WPCF, 1268 pp. Washington.

Arocena, R., Chalar, G., Fabián, D., De León, L., Brugnoli, E., Silva, M., Rodó, E., Machado, I., Pacheco, J.P., Castiglioni, R. & Gabito, L. 2008. Evaluación ecológica de cursos de agua y biomonitorio. Convenio de Cooperación Técnica y Científica Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) y Universidad de la Republica, Facultad de Ciencias 4-24 pp.

Baker, J.E., Eisenreich, S.J. & Eadie, B.J. 1991. Sediment traps fluxes and benthic recycling of organic carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorobiphenylcongeners in Lake Superior. *Environmental Science and Technology* 25: 500-509.

Barreto, P. 2008. Efectos iniciales de la forestación sobre la calidad de agua de escurrimiento de la cuenca del Río Tacuarembó. Tesis de maestría, Facultad de Agronomía, UdelaR 64 pp.

Barrett-Connor, E. 1997. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 95(1): 252-64.

Barrios, E., Ronco, A., Fierro, L., De Stéfani, E. & Vassallo, J. 2002. Tendencias de la mortalidad por cáncer en Uruguay 1953- 1997. *Revista Médica del Uruguay* 18: 167-74.

Beato, M., Chávez, S. & Truss, M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4): 240-51.

Becerril, J.E. 2009. Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria* 10 (8): 1067-6079.

Bonferroni, C.E. 1935. II calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni, 13-60 pp. Rome.

- Beck, I., Bruhn, R. & Gandrass, J. 2006. Analysis of estrogenic activity in Coastal surface waters of the Baltic Sea using the Yeast Estrogen Screen. *Chemosphere* 63(11): 1870-1878.
- Belgiorno, V., Rizzo, L., Fatta, D., Della Rocca, C., Lofrano, G., Nikolaou, A. & Meric, S. 2007. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination* 215(1-3): 166–176.
- Bila, D.M. 2005. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 $\beta$ -estradiol pelo processo de ozonização. Tesis Doctorado. Engenharia Química, UFRJ 300 pp.
- 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.
- Cárcamo, M.I. 2010. Uruguay: trabajo y agrotóxicos en la forestación. Investigación sobre aplicadores de agrotóxicos en plantaciones de FOSA. RAP-AL, pp. 51 Uruguay. [www.red-uita.com](http://www.red-uita.com).
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Barceló, D. 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 697–708.
- Clarke, K.R. & Warwick, R.M. 1994. Changes in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation, 2nd ed. Plymouth Marine Laboratory, pp. 144 Plymouth.
- Coleman, H.M., Khan, S.J., Watkins, G. & Stuetz, R.M. 2008. Fate and analysis of endocrine disrupting chemicals in some sewage treatment plants in Australia. *Water Science and Technology* 58(11): 2187-2194.
- Daughton, C. 2006. PPCP's as environmental pollutants. [ww.epa.gov](http://ww.epa.gov).
- De Coster, S. & Van Larebeke, N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health* 20(1): 12-24.
- Decisión nº 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Denier, X., Hill, E.M., Rotchell, J. & Minier, C. 2009. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro* 23: 569–573.
- Departamento de alimentos, cosméticos y domisanitarios-División Evaluación Sanitaria-Dirección General de la Salud, MSP.
- Dias, A.C.V., Gomes, F.W., Bila, D.M, Sant'Anna Jr, G.L. & Dezotti, M. 2015. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 41–47.
- DINAMA. 2011. Monitoreo y evaluación de calidad de agua Río Santa Lucía, resultados del rediseño del programa 37 pp.
- Directiva 2003/53/CE del parlamento europeo y del consejo de 2003 por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la

comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento).

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, S.D., Choi, H.K., Park, J.H., Kyoung, W.K., Inam, E. & Kim, S.D. 2015. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* 78: 286–293.

EPA, 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D.C.

Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854): 889-95.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr), accessed on day/month/year.

Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B. & Valotaire, Y. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 15: 143–51.

French, V.A., Codi King, S., Kumar, A., Northcott, G., McGuinness, K. & Parry, D. 2015. Characterisation of microcontaminants in Darwin Harbour, a tropical estuary of northern Australia undergoing rapid development. *Science of the Total Environment* 3(536): 639-647.

Frische, T., Faust, M., Meyer, W. & Backhaus, T. 2009. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science and Pollution Research* 16: 593–603.

Fry, D.M. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives* 7: 165-171.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, 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., 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 (2011): 295-303.

Garcia-Reyero, N. & Piña, B. 2005. Estrogenic activity in sediments from european mountain lakes. *Environmental Science and Technology* 39: 1427-1435.

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* 15 (503-504): 69-86.

Grund, S., Eric, H., Schönenberger, R., Suter, M.J.F. Giesy, J.P., Braunbeck, T., Hecker, M. & Hollert, H. 2011. The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by in vitro bioassays and chemical analysis. *Environmental Sciences and Pollution Research* 18: 446–460.

Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2001. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.

- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental Science and Technology* 37: 5471-5478.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J. & Pickford, D.B. 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquatic Toxicology* 76(1): 69–92.
- Inda, H. & Indarte, E. 2009. Informe de situación sobre fuentes de contaminación difusa en la cuenca del Río Santa Lucía. Convenio JICA-DINAMA.
- Inda, H. & Indarte, E. 2010. Informe de situación sobre fuentes de contaminación difusa en la cuenca del Río Santa Lucía. Convenio JICA-DINAMA.
- Jardim, W.F., Montagner, C.C., Pescara, I.C., Umbuzeiro, G.A., Di Dea Bergamasco, A.M., Eldridge, M.L. & Sodr , F.F. 2012. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology* 84: 3–8.
- Jensen, A. & Jacobson, H. I. 1962. Basic Guides to the mechanism of estrogens action. *Recent Progress in Hormone Research* 18: 387-414.
- Jongbloed, A.W., Lenis, N.P., 1998. Environmental concerns about animal manure. *Journal of Animal Science* 76: 2641-2648.
- 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.
- Karr, J.R. & Schlosser, I.J. 1978. Water resources and the land-water interface. *Science* 201(21): 229-234.
- Kelly, M.J. & Levin, E.R. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12(4): 152-6.
- 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.
- Korach, K.S. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 266(5190): 1524-7.
- Koroleff, F. 1970. Revised version of direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. International Cont Exploration Sea C.M. 1969/C9. ICES, Information on techniques and methods for sea water analysis. *Interlab Rep* 3: 19-22.
- Lai, K., Johnson, K., Scrimshaw, M. & Lester, J., 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environmental Science and Technology* 34: 3890-3894.
- Li, H., Helm, P.A., Paterson, G. & Metcalfe, C.D. 2011. The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83: 271–280.
- Liu, Z.H., Kanjo, Y. & Mizutani, S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *The Science of the Total Environment* 407(2): 731–748.
- Lopes, L.G., Marchi, M.R.R., Souza, J.B.G., Moura, J.A., Lorenzon, C.S., Cruz, C. & Amaral, L.A. 2010. Estrog nios em  guas naturais e tratadas da regi o de Jaboticabal – S o Paulo. *Quimica Nova* 33(3): 639-643.

- Luo, J., Lei, B., Ma, M., Zha, J. & Wang, Z. 2011. Identification of estrogen receptor agonists in sediments from Wenyu River, Beijing, China. *Water Research* 45: 390 -3914.
- Malgor, L. & Valsecia, M. 2000. Farmacología Médica. Vol. 2 Capitulo 26. P. 1-9.
- 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 International* 34: 531–545.
- Mattsson, A., Olsson, J.A. & Brunstrom, B. 2011. Activation of estrogen receptor alpha disrupts differentiation of the reproductive organs in chicken embryos. *General and Comparative Endocrinology* 172: 251–259.
- Ministerio de Salud Pública (Uruguay). 1998. División Estadística. Mortalidad clasificada por causa, sexo y edad. Montevideo.
- Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Expte. 2013/08319. [www.mvotma.gub.uy](http://www.mvotma.gub.uy).
- National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. [www.nc3rs.org.uk/the-3rs](http://www.nc3rs.org.uk/the-3rs).
- Noguerol, T.N., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D. & Piña, B. 2006. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 69: 351–358.
- Norma interna de Calidad de Agua potable, OSE. 2006. [www.ose.com.uy](http://www.ose.com.uy).
- 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), pp. 225-463, Oxford University Press, Oxford.
- OCDE, 1982. Eutrophisation des eaux. Metodes de surveillance d`evaluation et de lutte. Paris.
- Pachauri, R.K. & Meyer, L.A. (Eds.). 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fifth Assesment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, 32 pp. Geneva, Switzerland.
- Paganini-Hill, A. & Henderson, V.W. 1994. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *American Journal of Epidemiology* 140(3): 256-61.
- 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.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J. & Barceló, D. 2002. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A* 18(1-2): 23-51.
- Pietras, R.J. & Szego, C.M. 1977. Specific binding site for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265: 69-72.
- Pietras, R.J. & Szego, C.M. 1979. Estrogen receptors in uterine plasma membrane. *Journal of Steroid Biochemistry* 11(4): 1471-83.
- Pietras, R.J., Nemere, I. & Szego, C.M. 2001. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 14(3): 417-27.

- 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), pp. 11-46, CRC Press, Florida.
- Rajakpse, N., Ong, D. & Kortenkamp, A. 2001. Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Toxicological Sciences* 60: 296–304.
- RAP-AL. 2009. Glifosato, culpable de cánceres y malformaciones. *Revista de la Red de acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina RAP-AL* 84,85: 8-9.
- Reglamento (CE) N° 552/2009 de la comisión de 2009 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) en lo que respecta a su anexo XVII.
- Rivas-Rivera, N., Eguren, G., Carrasco-Letelier, L. & Munkittrick, K.R. 2014. Screening of endocrine disruption activity in sediments from the Uruguay River. *Ecotoxicology* 23(6): 1137-42.
- Routledge, E.J. & 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: 241-248.
- Scheuer, S. 2010. La permisividad Europea ante la contaminación química. El caso del nonilfenol, síntoma del fracaso en la aplicación de las leyes europeas. Greenpeace 12 pp. [www.Greenpeace.org](http://www.Greenpeace.org).
- Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D.L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G., Lyng, M. & Kasian, S.E.M. 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 105: 11254-11258.
- Schnell, S., Olivares, A., Piña, B., Echavarrri-Erasun, B., Lacorte, S. & Porte, C. 2013. The combined use of the PLHC-1 cell line and the recombinant yeast assay to assess the environmental quality of estuarine and coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 77: 282–289.
- Silbiger, S.R. & Neugarten, J. 1995. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 25(4): 515-33.
- Singhal, N., Song, Y., Johnson, A. & Swift, S., 2009. Estrogenic Endocrine Disrupting Compounds. *Auckland Regional Council. Environmental Research*. New Zealand.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernández, M.F., Olea, N. & Olea Serrano, M.F. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103(3): 113-22.
- Strayer, D.L., Beighley, R.E., Thompson, L.C., Brooks, S., Nilsson, C., Pinay, G. & Naiman, R.J. 2003. Effects of land cover on stream ecosystems: roles of empirical models and scaling issues. *Ecosystems* 6: 407-423.
- Teixeira-de Mello, F. 2007. Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del Río Santa Lucía (Uruguay). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UdelaR 46 pp.

- Thorpe, K.L., Gross-Sorokin, M., Brighty, G., Tyler, C.R. 2006. An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents. *Environmental Health Perspectives* 114: 90-97.
- Tuikka, A.I., Schmitt, C., Hoss, S., Bandow, N., von der Ohe, P.C., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barcelo, D., Sormunen, A.J. & Kukkonen, J.V. 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology Environmental Safety* 74: 123–131.
- Udelar. 2013. Informe sobre la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía: estado de situación y recomendaciones, pp. 29. [www.images/pdf/pdf/santa.pdf](http://www.images/pdf/pdf/santa.pdf).
- Vajda, A.M. & Norris, D.O. 2010. Endocrine-active Chemicals (EACs) in Fishes. En: Hormones and reproduction of vertebrates. Norris, D.O. & Lopez, K.H. (Eds). pp. 245-267. Academic Press, San Diego, CA.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. & Cushing, C.E. 1980. The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 130-137.
- Vitousek P.M. 1994. Beyond Global Warming: Ecology and Global Change. *Ecology* 7: 1861-1876.
- 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, S., Rijk, J.C.W., Besselink, H.T., Houtman, R., Peijnenburg, A.C.M., Brouwer, A., Rietjens, M.C.M. & Bovee, F.H. 2014b. Extending an in vitro panel for estrogenicity testing: the added value of bioassays for measuring antiandrogenic activities and effects on steroidogenesis. *Toxicological Sciences* 141(1): 78-89.
- Wang, Y., Hu, L., Wang, Q., Lu, G. & Li, Y. 2014a. Adsorption behaviors of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in sediment-water system in Northern Taihu Lake, China. *The Scientific World Journal* 6 pp.
- Wu, C., Huang, X., Lin, J. & Liu, J. 2015. Occurrence and fate of selected endocrine-disrupting chemicals in water and sediment from an urban lake. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 68: 225–236.
- Yan, Z., Lu, G., Liu, J. & Jin, S. 2012. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. *Environmental Ecotoxicology* 84: 334-40.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Qinghai. & Yan, C. 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 93–100.
- Zhu, L., Chen, Y.Y. & Zhou, R.B. 2008. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and soil in drinking water resource of Zhejiang Province, China. *Journal of Hazardous Materials* 150: 308-316.

## **ANEXO 1. Preparación de soluciones del ensayo YES**

### **Medio mínimo**

Se añadiendo los siguientes reactivos a 1 L de agua ultrapura: 13.61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.98 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4.2 g de KOH; 0.2 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 1 mL de solución de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$  (40 mg / 50 mL de agua ultrapura); 50 mg de L-leucina; 50 mg de L-histidina; 50 mg de 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. La solución fue autoclavada a 121 ° C durante 20 minutos y almacenada a temperatura ambiente en frascos de vidrio.

### **Solución de Vitamina**

Se añadieron los siguientes reactivos a 180 mL de agua ultrapura: 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 ultrapura). La solución se esterilizó usando un kit de filtración estéril con membrana de 0.2 micras y se almacenó a 4 ° C en alícuotas de 10 mL.

### **Solución de glucosa**

La solución de glucosa se preparó al 20% w/v (disolviendo 20 g de glucosa en 100 mL de agua ultrapura). Luego fue autoclavada a 121 ° C durante 10 min para finalmente ser almacenada a temperatura ambiente en frasco de vidrio.

### **Solución de L-aspártico**

La solución de ácido L-aspártico se preparó a una concentración de 4 mg/mL con agua ultrapura, y se autoclavó a 121 ° C durante 10 min. Luego se almacenó a temperatura ambiente

### **Solución de L-treonina**

La solución madre se preparó a una concentración de 24 mg/mL con agua ultrapura y autoclavó a 121 ° C durante 10 min. Luego fue almacenada a 4 ° C.

### **Solución de sulfato de cobre (II)**

Se preparó a una concentración de 20 mM (0,5 g/100 mL) con agua ultrapura. La solución se esterilizó utilizando un kit de filtración estéril con membrana de 0.2 micras y se almacenó a temperatura ambiente.

### **Solución CPRG (Chlorophenol red- $\beta$ -D- galactopyranoside)**

Esta solución se preparaba el mismo día en que se realizaba el ensayo, a una concentración de 10 mg/ mL usando agua Milli-Q. Se almacenó en frascos de vidrio ámbar estériles a 4 ° C. Los frascos fueron cubiertos con papel de aluminio para evitar fotólisis.

### **Medio de cultivo**

Se preparó mezclando: 5 mL de solución de glucosa; 1.25 mL de solución de ácido L-aspartico; 0.5 mL de solución de vitamina; 0.4 mL de solución de L-treonina; 125  $\mu$ L 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 máximo de dos semanas.

### **Medio de análisis**

En un tubo de centrifugación de 50 mL estéril se añadieron 25 mL de medio de cultivo, 250  $\mu$ L de solución de CPRG y 25  $\mu$ L de solución A.

### **Solución A**

En un tubo de centrifugación (50 mL) estéril se añadieron 4.0 mL de medio de cultivo y 1.1 mL del cultivo de levadura (preparado de 1 a 2 días antes). A continuación, se leyó la absorbancia a 620 nm de ese preparado para obtener una cantidad adecuada de células, hasta alcanzar un valor de entre 0.8 y 1.0. Este procedimiento es una adaptación del método original de Routledge y Sumpter (1996) para facilitar el paso de recuento de las células de levadura y ha sido adoptado con éxito en diversos estudios (Beck et al., 2006; Frische et al., 2009).