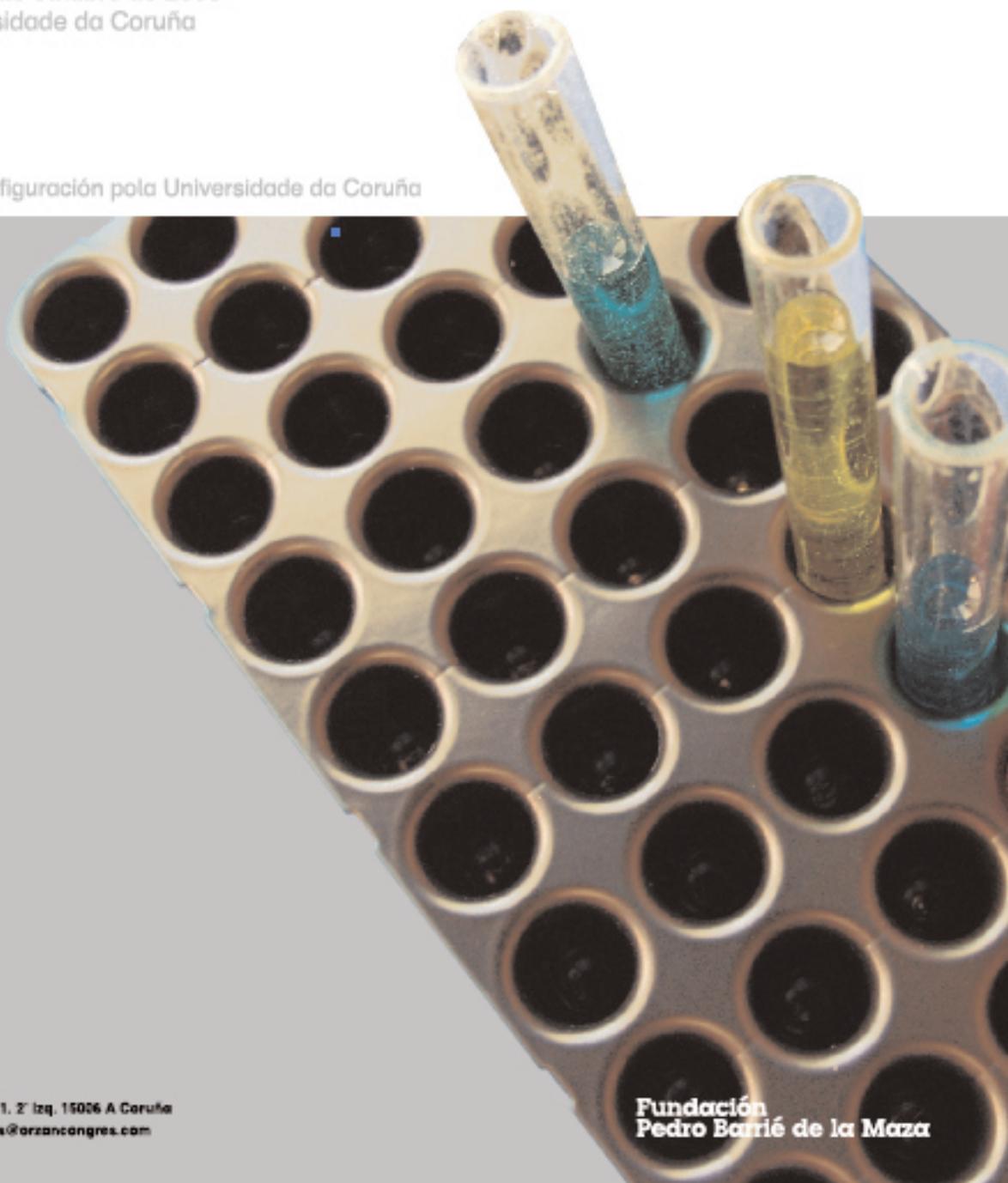


VII conferencia sobre disruptores endocrinos

15 XORNADA TÉCNICA SESA

A Coruña, 27 e 28 de outubro de 2005
Reitoría da Universidade da Coruña

1 crédito de libre configuración pola Universidade da Coruña





VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

COMITÉ CIENTÍFICO Y REPRESENTANTES DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS

- Nicolás Olea (SESA)
- José M. Ruiz (Univ. da Coruña)
- Darío Prada (Inst. Universitario de Medio Ambiente, Univ. da Coruña)
- Ángel Nadal (SED)
- Anunciación Lafuente (AETOX)
- Argelia Castaño (Presidenta REMA)
- Miren Cajaraville (SICTA)
- Francisco Vargas (Ministerio Sanidad y Consumo)
- Eugenio Vilanova-Gisbert (Univ. Miguel Hernández)
- J. Ignacio Elorrieta (Ministerio de Medio Ambiente)
- Jesús M^a Ibarluzea (SEE)
- José V. Martí (Presidente SESA)
- Eduardo de la Peña (Presidente AETOX)

Comité organizador:

- Rodolfo Barreiro Lozano (Coordinador)
- María Quintela Sánchez
- Lucía Couceiro López



Rodolfo Barreiro (Coord.)

Facultad de Ciencias
A Zapateira s/n

15071-A Coruña

Secretaría científica:

Teléfono: 981.167.00

Programa

VII Conferencia sobre Disruptores Endocrinos



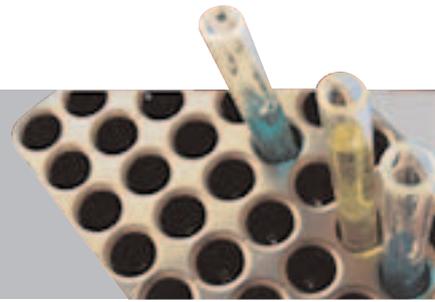
XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE INNOVACIÓN,
INDUSTRIA E COMERCIO
Dirección Xeral de Investigación
e Desenvolvemento



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA
Dirección Xeral de
Universidades



Programa

VII Conferencia sobre Disruptores Endocrinos
A Coruña 27 y 28 de Octubre de 2005

27 de octubre jueves

16.00 Inauguración de las Jornadas / entrega documentación

16.15 Sesión 1. Mecanismos de acción y fisiología de los disruptores endocrinos

Coordina: Anunciación Lafuente (Representante AETOX, Univ. de Vigo)

16.20 Nuevos biomarcadores y mecanismos moleculares de disrupción endocrina por compuestos estrogénicos: Análisis en la rata como especie modelo.
Manuel Tena-Semepere (Univ. de Córdoba)

16.40 El efecto estrogénico del bisfenol-A altera la función de la célula beta pancreática *in vivo* e induce resistencia a la insulina
Ángel Nadal (Univ. Miguel Hernández, Alicante)

17.00 Genómica funcional y proteómica en el desarrollo de testículo expuesto a disruptores endocrinos
Jesús del Mazo (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid)

17.20 El glutamato monosódico actúa sobre los mecanismos neuroendocrinos de control de GH y del apetito
Jesús Fernández Tresguerres (Univ. Complutense, Madrid)

17.40 Discusión

17.50 Descanso

18.00 Sesión posters.

18.30 Sesión 2. Efectos ambientales de los disruptores endocrinos

Coordina: Argelia Castaño (Presidenta REMA, Centro de Investigación en Sanidad Ambiental, INIA, Madrid)

18.35 Disruptores endocrinos en el medio acuático: efectos sobre vertebrados e invertebrados
Cinta Porte (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, CSIC, Barcelona)

18.55 Estudio de los mecanismos subyacentes a procesos de antiestrogenicidad utilizando hepatocitos primarios de trucha arco iris
José María Navas (Dep. Medio Ambiente, INIA, Madrid)

19.15 Evaluación de efectos de disrupción endocrina en el mejillón
Miren Cajaraville (Univ. del País Vasco/Euskal Herriko Unib. UPV/EHU, Bilbao)

19.35 Discusión



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

28 de octubre viernes

9.30 Sesión 3. Niveles de exposición y detección de disruptores endocrinos en el medio ambiente

Coordina: Darío Prada (Instituto Universitario de Medio Ambiente, Universidade da Coruña)

9.35 Exposición a dioxinas y compuestos relacionados a través de la dieta de la población de Cataluña
Ana Bocio Sanz (Univ. Rovira y Virgili, Tarragona)

9.55 Bancos de especímenes ambientales y biomonitorización de disruptores endocrinos
Alejo Carballeira (Univ. Santiago de Compostela)

10.15 Presencia, destino e impacto de compuestos disruptores endocrinos en el medio ambiente acuático de Cataluña
Miren López de Alda (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, CSIC, Barcelona)

10.25 Discusión

10.40 Sesión 4. Disruptores endocrinos y salud

Coordina: Manuel Porto (Delegado SESA, Consellería de Sanidade, A Coruña)

10.45 Biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto
Nicolás Olea (Univ. de Granada)

11.05 Exposición a xenobióticos del vertido del Prestige: posibles repercusiones endocrinas e inmunológicas
Anunciación Lafuente (Univ. de Vigo).

11.25 Exposición prenatal al DDE y desarrollo neuroconductual en niños de 4 años
Nuria Ribas (Inst. Municipal de Investigaciones Médicas, Barcelona)

11.45 Discusión

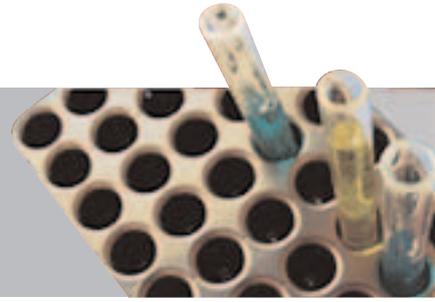
12.00 Descanso

12.15 Sesión pósters.

12.45 Sesión 5. Iniciativas internacionales para evaluar y disminuir el riesgo de los disruptores endocrinos

Coordina: Nicolás Olea (Univ. de Granada)

12.50 La 1ª Conferencia de las Partes del Convenio de Estocolmo y el Plan Nacional frente a los Compuestos Orgánicos Persistentes
José Ignacio Elorrieta Pérez de Diego (Subdir. Gral. de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos, Ministerio de Medio Ambiente)



- 13.15 Opportunities for European research on endocrine disrupters
Peter Pärt (European Commission, DG Joint Research Centre, Institute of Environment and Sustainability, Ispra, Italia)
- 13.40 Discusión
- 14.30 Clausura de las jornadas

VII CONDE



A Coruña 2005

VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

VII CONDE



A Coruña 2005



Ponencias



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

NUEVOS BIOMARCADORES Y MECANISMOS MOLECULARES DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA POR COMPUESTOS ESTROGENICOS: ANÁLISIS EN LA RATA COMO ESPECIE MODELO

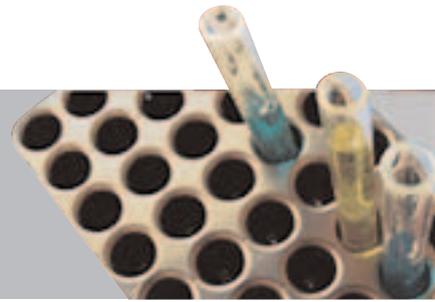
M. Tena-Sempere

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. 14004 Córdoba

En la última década, un número creciente de evidencias epidemiológicas y experimentales sugieren que la exposición ambiental a compuestos sintéticos con actividad estrogénica (xeno-estrógenos) puede resultar en efectos deletéreos sobre el desarrollo y función del sistema reproductor. La unidad hipotálamo-hipofisaria es un elemento esencial en el control de este eje neuroendocrino a lo largo de la vida. Esta unidad es altamente sensible a las acciones organizativas de los esteroides sexuales, que tienen lugar durante periodos tempranos (críticos) del desarrollo y resultan en efectos funcionales perdurables (1). La disrupción de los procesos normales de organización funcional de la unidad hipotálamo-hipofisaria resulta en alteraciones (inmediatas o diferidas) del eje neuroendocrino de la reproducción, que pueden conducir, entre otras, a alteraciones de la pubertad (precocidad, retraso) y ciertas formas de infertilidad. No obstante, nuestro conocimiento de los mecanismos de acción de compuestos disruptores endocrinos (xeno-estrógenos y otros), así como de sus posibles biomarcadores de exposición o efecto, es aún muy limitado.

Mientras en humanos la diferenciación sexual del SNC se completa al inicio del 3^{er} trimestre de gestación, en la rata el periodo crítico de diferenciación sexual de la unidad hipotálamo-hipofisaria se extiende entre el día 17.5E (fetal) y el día 10 post-natal. Ello facilita la manipulación experimental de las señales hormonales responsables de este proceso (mediante su eliminación o administración) durante el periodo perinatal. En concreto, nuestro grupo de investigación ha utilizado ampliamente el modelo de rata estrogenizada neonatalmente (administración de una única dosis de benzoato de estradiol en el día 1 post-natal) con el fin de avanzar en la identificación de mecanismos moleculares de acción y biomarcadores de efecto de compuestos sintéticos con actividad estrogénica (1). Nuestra aproximación ha sido doble. De una parte, hemos evaluado en el modelo de estrogenización neonatal la expresión hipotálamo-hipofisaria y las funciones reproductoras de señales neuroendocrinas relevantes. De otra, hemos aplicado técnicas *high-throughput* de screening de expresión diferencial de genes en hipotálamo e hipófisis tras exposición neonatal al estrógeno sintético. Consideramos que esta doble aproximación es complementaria, y nos permite abordar de un modo integral la identificación de biomarcadores y la caracterización de nuevos mecanismos de acción de compuestos estrogénicos.

Como ejemplo de la primera aproximación, nuestro grupo ha estado particularmente interesado durante el último año en el análisis de las alteraciones del sistema KiSS-1/GPR54 tras la exposición neonatal a altas dosis de estrógenos. Este sistema ligando (KiSS-1)-receptor (GPR54) se ha demostrado muy recientemente como un elemento clave en la activación del eje reproductor durante la pubertad y su regulación funcional a lo largo de la vida (2,3). En la rata estrogenizada neonatalmente se produce una alteración persistente de la función de este eje neuroendocrino, caracterizada por ausencia de pubertad, bajos niveles de gonadotropinas circulantes, alteración de los mecanismos de feedback e infertilidad (1). Es muy destacable que la expresión hipotalámica del gen KiSS-1 aparece persistentemente disminuida en este modelo (2). Este fenómeno se observa en ambos sexos y es dosis-dependiente. Más aún, la administración exógena del péptido KiSS-1 (kisspeptina-10) estimula muy potentemente la secreción basal de LH y normaliza la respuesta a la gonadectomía en ratas estrogenizadas. Todo ello sugiere que la exposición inadecuada a compuestos estrogénicos durante periodos críticos del desarrollo induce una disminución persistente del sistema KiSS-1 a nivel hipotalámico, contribuyendo así a la plétora de defectos reproductores observados. Además de estas implicaciones mecanísticas, la reducción en la expresión hipotalámica de KiSS-1 tras la exposi-



ción temprana a estrógenos podría constituir (eventualmente) un biomarcador diferido de efecto de xeno-estrógenos. Como exemplo de la segunda aproximación, en colaboración con el grupo del Dr. H. Leffers (Rigshospitalet, Copenhagen, DK) hemos aplicado recientemente técnicas de análisis de expresión diferencial (*differential display*), basadas en RT-PCR con primers degenerados, en tejidos hipofisarios e hipotálamicos de ratas sometidas a estrogenización neonatal. En concreto, estas técnicas nos han permitido identificar el incremento persistente de la expresión de los genes de α y β globina en hipófisis de ratas neonatalmente estrogenizadas (4). Este fenómeno ha sido confirmado mediante técnicas de RT-PCR en tiempo-real e hibridación *in situ*, aparece como dosis-dependiente y no se detecta (en forma persistente) en otros tejidos neuroendocrinos. Por otra parte, la administración neonatal del anti-andrógeno flutamida indujo un incremento similar de la expresión hipofisaria de globinas. Aunque las implicaciones mecanísticas de este fenómeno no han sido aún establecidas, la elevación persistente de la expresión hipofisaria de los genes de globinas podría constituir un biomarcador de exposición/efecto de compuestos estrogénicos (y eventualmente anti-androgénicos).

En resumen, los análisis de expresión y estudios funcionales aquí descritos, empleando la rata como especie modelo, pueden contribuir a ampliar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos moleculares de acción de compuestos disruptores con actividad estrogénica, así como a identificar nuevos biomarcadores de exposición y efecto. En último término, unos y otros facilitarán a una mejor comprensión de los fenómenos de disrupción endocrina, incluyendo la caracterización de los efectos de bajas dosis y mezclas de compuestos.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación UE FP-5 EDEN QLK4-CT-2002-00603.

Referencias

Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Aguilar E. *Current Topics Steroid Res.* 3 (2000) 23-37.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. *Endocrinology* 2004;145:4565-4574.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez M, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. *Endocrinology* 2005;146:156-163.

Leffers H, Navarro VM, Nielsen JE, Mayen A, Pinilla L, Dalgaard M, Malagon MM, Castano JP, Skakkebaek NE, Aguilar E, Tena-Sempere M. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 (en evaluación).



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

EL EFECTO ESTROGÉNICO DEL BISFENOL-A ALTERA LA FUNCION DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA *IN VIVO* E INDUCE RESISTENCIA A LA INSULINA

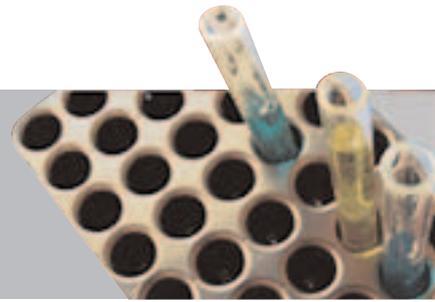
Paloma Alonso-Magdalena, Sumiko Morimoto, Cristina Ripoll, Esther Fuentes y Angel Nadal
Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Sant Joan d'Alacant, Alicante

La función de la célula beta pancreática es el almacenamiento y la liberación de insulina, la principal hormona implicada en la homeostasis de la glucosa en sangre. Aquí mostramos cómo el bisphenol-A (BPA), un agente químico presente en el medio ambiente, imita los efectos del 17 estradiol *in vivo* sobre la homeostasis de la glucosa a través de vías genómicas y no genómicas.

La exposición de un ratón adulto a una única dosis de E2 o BPA 10 µg/Kg provoca un rápido descenso de glucemia que se correlaciona con un aumento en los niveles de insulina plasmática. Exposiciones más prolongadas a E2 o BPA desencadenan un aumento en el contenido de insulina en células beta pancreáticas que es dependiente del receptor de estrógenos. Este efecto es visible tras dos días de tratamiento y comienza a ser significativo a dosis tan bajas como 10 µg/Kg. Tras cuatro días de tratamiento con E2 o BPA, estos ratones presentan hiperinsulinemia así como una alteración en los ensayos de tolerancia a glucosa e insulina. De este modo se establece una estrecha relación entre estrógenos medioambientales y resistencia a la insulina.

Por todo ello concluimos que tanto niveles anómalos de estrógenos endógenos como la exposición a estrógenos medioambientales aumentan el riesgo de aparición de diabetes mellitus tipo 2.

Financiado por: Ministerio de Educación y Ciencia BFI2002-01469 e Instituto de Salud Carlos III, RCMN (03/08) y 03/0178



GENÓMICA FUNCIONAL Y PROTEÓMICA EN EL DESARROLLO DE TESTÍCULO EXPUESTO A DISRUPTORES ENDOCRINOS

Jesús del Mazo, María Paz, Emilio González, Fernando Escolar y Pedro P. López-Casas
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040. Madrid.

El sistema reproductivo es ampliamente conocido como diana de compuestos considerados disruptores endocrinos. En mamíferos, el aumento de los índices de infertilidad y subfertilidad masculina está siendo asociado, entre otros factores, al incremento de exposición a sustancias de naturaleza xenoestrogénica. Existen múltiples datos tanto en modelos animales como en estudios epidemiológicos que demuestran dicha asociación y describen alteraciones anatómicas, fisiológicas o celulares como resultado de exposición a disruptores. Sin embargo, los mecanismos moleculares y las rutas de acción de estos compuestos son escasamente conocidas. Es más, a la complejidad del proceso de espermatogénesis sobre el que actúan se suma la variedad de compuestos, dosis y momento del desarrollo en el que pueden estar operando. Una correcta coordinación de la espermatogénesis es mediada por señales hormonales que indudablemente pueden ser alteradas por el desequilibrio que potencialmente puede generar la exposición a disruptores endocrinos. Tales señales hormonales llevan a cabo su acción reguladora, entre otras, a través del control de la expresión génica que generan a su vez cascadas de señalización. Consecuentemente, un desequilibrio hormonal inducido por xenoestrógenos o antiandrógenos va a inducir fenómenos de desregulación génica y/o postranscripcional.

Para poder evaluar la complejidad, en su conjunto, de los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos sobre el desarrollo y función testicular, hemos diseñado un modelo experimental murino, considerando el alto nivel de conservación evolutiva del genoma de ratón y el humano. Así, ratones expuestos a diferentes dosis y tiempos en el desarrollo, de compuestos tales como 17β estradiol (como actividad estrogénica clásicamente conocida), bisfenol A, zearalenona, lindano, y ftalato (MEHP) son analizados desde la perspectiva de la genómica funcional y de la proteómica. Es decir, caracterizando patrones de expresión génica y de proteínas de testículo de ratones expuestos a disruptores en comparación con los correspondientes controles. Para ello se están analizando los patrones de expresión génica y de proteínas mediante, básicamente, dos tecnologías experimentales: microarrays (micromatrices) de DNA y patrones proteicos de geles bidimensionales (2D) seguidos de identificación proteica mediante huella peptídica (espectrometría de masas, MALDI-TOF). Análisis de las modificaciones de la expresión génica, indicadores de desregulación en la expresión de genes específicos, se generan en base a *microarrays* en los que están representados la práctica totalidad del transcriptoma de ratón (en nuestro estudio 24.878 genes) (ver presentación adicional en poster). Los patrones proteicos 2D nos permiten identificar cientos de proteínas simultáneamente en cada experimento.

El diseño experimental que se presenta implica que, considerando tiempos de exposición, dosis (al menos tres diferentes) para cada compuesto a analizar, al menos 45 variables deben ser analizadas en conjunto, valor que habría que multiplicar por el número de genes (24.878) que se analizan en cada caso. Es decir, más de un millón de datos están siendo evaluados en este estudio a nivel de expresión génica. Los primeros resultados nos indican que el efecto de exposición a disruptores puede operar en testículo mediante múltiples mecanismos de desregulación génica. Ello es dependiente tanto del nivel de exposición como del compuesto específico al que han estado expuestos los ratones. Estos resultados iniciales también parecen indicar que el periodo embrionario es un momento crítico de sensibilidad en el desarrollo con manifestaciones posteriores en la vida adulta.

A esta multiplicidad de datos, ahora en elaboración, hay que añadir los obtenidos por análisis proteómico. La valoración comparativa de ambos estudios paralelos nos podrán indicar tanto mecanismos de alteraciones transcrip-



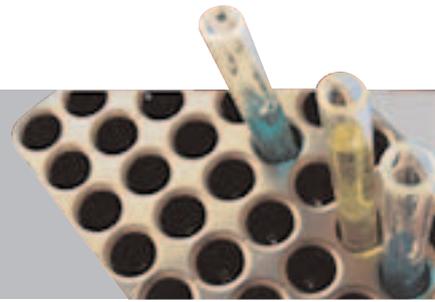
VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

cionales de genes específicos, de rutas metabólicas o de señalización, como otras modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales afectando a nivel de proteínas o su degradación selectiva.

Este estudio, enmarcado en el proyecto GENDISRUPT de la CE, conlleva también la valoración de los datos resultantes con otros de análisis histopatológico y hormonal (Dr. D. de Rooij), análisis de afectación a nivel de células germinales primordiales (PGCs) (Dr. M De Felici) y valoración comparativa de susceptibilidad genética en humanos (Dr. A. Ruíz).

Finalmente, como ejemplo de análisis funcional de proteínas específicas, presentamos un estudio a nivel génico y proteico de proteínas implicadas en interacciones célula-célula en espermatogénesis (ver presentación adicional en poster): vinexina, vinculina y flotilina y sus alteraciones consecuentes a la exposición a estrógenos.

Proyecto financiado por: la CE (QLK4-CT-2002-02403) (GENDISRUPT).



EL GLUTAMATO MONOSÓDICO ACTUA SOBRE LOS MECANISMOS NEUROENDOCRINOS DE CONTROL DE GH Y DEL APETITO

J.A.F. Tresguerres, A.P. García, M.Hermanussen, V. Salazar, A.C. F. Tresguerres, C. Ariznavarreta.
Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense Madrid

El glutamato monosódico (MSG) se utiliza en muchos alimentos para realzar su sabor pues en el hombre, es el mayor estímulo para el sabor umami glutamato. La producción mundial de MSG se ha incrementado desde 200000 toneladas/año en 1969 a 800000 toneladas/año en 2001. Los autores han postulado muy recientemente como hipótesis que el consumo cada vez mayor de MSG, utilizado como saborizante, genere un efecto de disrupción neuroendocrino que determina déficit de GH, alteraciones hipotalámicas y obesidad. Para comprobar esta hipótesis se han llevado a cabo en ratas una serie de experimentos que pretenden analizar el efecto de la administración oral de MSG sobre una serie de hormonas hipofisarias con actividad sobre la composición corporal como son GH, IGF1, insulina y leptina y su repercusión en el control del apetito. La administración oral de MSG se ha llevado a cabo en ratas gestantes durante la última mitad de la preñez y toda la fase de crecimiento y desarrollo de las crías hasta los 90 días de vida. Se comparan los efectos con la administración parenteral neonatal de la que se tienen datos desde hace mucho tiempo. Se han estudiado las lesiones generadas a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo y los efectos sobre los niveles plasmáticos de insulina LH, GH, IGF-1 y leptina. Se ha hecho especial hincapié sobre el consumo de alimento y agua. Tras el sacrificio de los animales por decapitación a los 30, 90 y 180 días de vida se observa una destrucción del núcleo arcuato que es máxima en la administración parenteral neonatal pero también está afectado en la dosis más alta oral. Hay una disminución significativa de los niveles de GH e IGF1 que es más evidente a los 30 días y también baja la LH. Disminuyen los niveles de leptina en los dos grupos con MSG oral y se incrementa la ingesta de alimento y de agua. Todos estos datos confirman que la administración oral de MSG durante los periodos de desarrollo tienen un efecto deletéreo sobre el funcionamiento hipotalámico con afectación especial del núcleo arcuato que conduce a alteraciones en la secreción de hormonas hipofisarias e incrementa el apetito. Esto obliga a realizar una llamada de atención contra el uso indiscriminado de un producto como el MSG, que no tiene reconocida ninguna actividad perniciosa sobre la salud y cuyos efectos deletéreos puede ser muy importantes especialmente en la infancia.



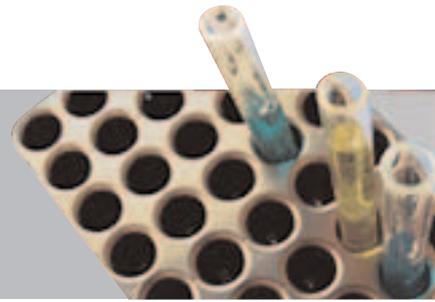
VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIO ACUÁTICO: EFECTOS SOBRE VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS

Cinta Porte, Gemma Janer, Ramón Lavado, Rebeca Martin-Skilton, Rémi Thibaut
Departamento de Química Ambiental. IIQAB-CSIC, C/ Jordi Girona 18. 08034 Barcelona

En la última década, hay entre la comunidad científica un interés creciente por investigar las posibles alteraciones en el funcionamiento del sistema endocrino de vertebrados e invertebrados como consecuencia de la exposición a productos químicos. El fenómeno de imposex en gasterópodos expuestos a tributilestaño, malformaciones en los genitales de aligatores como consecuencia de la exposición a DDE, o procesos de feminización en peces afectados por los vertidos de plantas depuradoras, han puesto de manifiesto que algunos productos químicos pueden actuar como disruptores endocrinos (DEs). Entre estos DEs se encuentran hormonas naturales y sintéticas, constituyentes de plantas, pesticidas, productos utilizados en la industria de plásticos, subproductos industriales, etc. El medio acuático es el destino final de muchos de estos compuestos, y la fauna acuática -tanto vertebrados como invertebrados- estará inevitablemente expuesta. En España tenemos múltiples evidencias de la presencia de DEs en el medio acuático, y de sus efectos sobre peces. Un estudio reciente ha mostrado la existencia de alteraciones severas en el sistema endocrino de carpas capturadas en el curso medio-bajo del río Ebro, en áreas con influencia urbana e industrial (TAAP 196 (2004) 247-257). Las alteraciones encontradas (presencia de vitelogenina en plasma de peces macho, retrasos en la maduración sexual, alteraciones histopatológicas en gónadas, bajos niveles de hormonas circulando en plasma) se relacionan con la exposición a contaminantes tales como nonilfenoles, compuestos organoclorados, o pesticidas de uso agrícola, y ponen de manifiesto la necesidad de tratar eficientemente los efluentes urbanos e industriales para asegurar la supervivencia de los organismos que viven en ese tramo del río Ebro. Aunque la mayor parte de estudios sobre el fenómeno de disrupción endocrina se han efectuado en aguas continentales, también hay algunas evidencias de alteraciones endocrinas en peces marinos de ecosistemas costeros. Así en un estudio efectuado en el Mediterráneo Noroccidental, se detectaron alteraciones significativas en el sistema endocrino de salmonetes de fango -*Mullus barbatus*-, muestreados en las proximidades de la ciudad de Marsella y de su emisario, y se relacionaron con una exposición a concentraciones elevadas de PCBs y nonilfenoles, entre otros compuestos.

Aunque tanto vertebrados como invertebrados pueden ser susceptibles a la acción de DEs, la información disponible para estos últimos es mucho más limitada, con la única excepción del fenómeno de imposex en gasterópodos, que ha sido ampliamente estudiado. La razón para esta falta de información se debe a la complejidad y diversidad de estrategias reproductoras utilizadas por los invertebrados, y al casi total desconocimiento de los diferentes sistemas endocrinos de los diferentes grupos taxonómicos. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de vías de síntesis y metabolismo de esteroides, receptores, y mecanismos de regulación similares a los descritos en vertebrados. Así, los niveles endógenos de esteroides en el crinoide *Antedon mediterranea* se alteran por exposición a compuestos androgénicos (metil-testosterona, trifenilestaño -TPT-) y antiandrogénicos (acetato de ciproterona), y responden de un modo similar a cómo lo hacen en vertebrados. Por ejemplo, la exposición a metil-testosterona o a TPT causa una elevación de testosterona en el organismo, mientras que la exposición a acetato de ciproterona baja los niveles endógenos de testosterona sin alterar los de estradiol. También experimentos recientes, han demostrado que TPT, a concentraciones similares a las que se detecta en el medio ambiente, es capaz de modular el metabolismo de andrógenos en gónadas y tubo digestivo del equinodermo *Paracentrotus lividus* (incrementa la reducción de testosterona en posición 5 α -, inhibe la actividad P450 aromatasas, incrementa la conjugación de testosterona con ácidos grasos o grupos sulfato), y causa un incremento de la concentración de testosterona en fluido celómico.



ESTUDIO DE LOS MECANISMOS SUBYACENTES A PROCESOS DE ANTIESTROGENICIDAD UTILIZANDO HEPATOCITOS PRIMARIOS DE TRUCHA ARCO IRIS

José María Navas

*INIA, Departamento de Medio Ambiente, Laboratorio de Ecotoxicología, Ctra. de la Coruña, Km 7,
E-28040 Madrid*

Las perturbaciones causadas por los xenobióticos sobre el control hormonal del proceso reproductor es actualmente causa de una gran preocupación. Debido al papel fundamental que juegan los estrógenos en la regulación del crecimiento, desarrollo sexual y reproducción animales se está prestando especial atención a las alteraciones relacionadas con la función de estas hormonas. Concretamente, la capacidad de ciertos xenobióticos de imitar la acción de los estrógenos en sus células diana, causando efectos estrogénicos, ha sido objeto de numerosos estudios científicos. En los peces, como en otros animales ovíparos, un fenómeno dependiente de los estrógenos, particularmente del 17β -estradiol (E2), es el de la producción de la vitelogenina (VTG) en el hígado (Mommsen and Walsh, 1988). Esta lipoglucofosfoproteína migra por la corriente sanguínea y llega hasta el ovario en desarrollo donde se internaliza en los oocitos en crecimiento mediante receptores específicos de membrana. Aquí es transformada y acaba formando el vitelo, es decir las reservas del futuro huevo. La VTG por lo tanto aparece únicamente en hembras y alcanza concentraciones muy altas en plasma, de modo que cualquier inducción de su producción es fácilmente detectable por técnicas bioquímicas convencionales como ELISA o RIA. La presencia de niveles anormalmente altos de VTG en el plasma de machos de peces, se ha considerado como un buen marcador de la exposición de esos peces a contaminantes estrogénicos.

Junto a estos fenómenos estrogénicos, en muchas ocasiones lo que realmente se observa son procesos de antiestrogenicidad debidos a xenobióticos que interfieren con o antagonizan la expresión de genes estrógeno dependientes (Navas and Segner, 1998; Safe, 1995). (También podría considerarse como un efecto antiestrogénico la inhibición de la síntesis de estrógenos debido a un bloqueo de la ruta metabólica o de los enzimas responsables de este proceso, pero este aspecto no se trata aquí). Se ha visto que la exposición a ciertos xenobióticos, como las dioxinas, los bifenilos policlorados y compuestos relacionados provoca una reducción de la expresión de genes estrógeno dependientes (Safe, 1995), es decir un efecto antiestrogénico. Además, la potencia de tal efecto está directamente relacionada con la potencia de inducción del citocromo P4501A1 (CYP1A1). La expresión del CYP1A1 está regulada por el denominado receptor de hidrocarburos poliaromáticos (AhR), de modo que se ha postulado la idea de que es el AhR activado el que interfiere con la vía de acción de los estrógenos.

El objetivo del trabajo que aquí se presenta fue determinar si los inductores del CYP1A en peces son capaces también de provocar un efecto antiestrogénico, como es el de reducir la producción de VTG. Se utilizaron hepatocitos de trucha arco iris aislados mediante perfusión de colagenasa y mantenidos en cultivo durante 96 horas en placas de cultivo de 24 pocillos. El medio de cultivo se renovó cada 24 horas. En una primera tanda de experimentos se utilizaron diversos hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) para establecer si su potencia de inducción del CYP1A era paralela a su capacidad de reducción de la producción de VTG. Después de las primeras 24 horas de cultivo se comenzó la exposición a diversas concentraciones de varios PAHs. Para estimular la producción de VTG las células fueron simultáneamente expuestas a una concentración $1 \mu\text{M}$ de E2. Tras 72 horas de exposición se recogió el medio de cultivo y se determinó en él la concentración de VTG mediante ELISA. En las células se estimó la inducción del CYP1A mediante medidas de una actividad enzimática dependiente de este citocromo, la etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD). Tanto la actividad EROD, como la concentración de VTG se refirieron al contenido total de proteínas de cada pocillo de la placa. Efectivamente se observó que el aumento en la capacidad de inducción de la



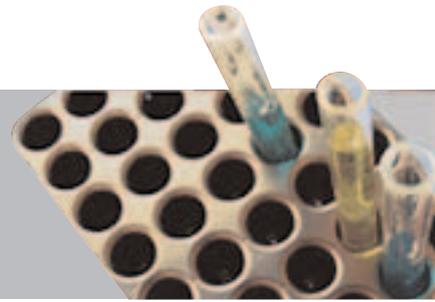
VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

actividad EROD fue paralela a la capacidad de reducción de la producción de VTG estimulada por E2. Cuando se realizaron incubaciones simultáneas de los diferentes PAHs, E2 y un antagonista del AhR (*a*-naftoflavona) se inhibió la inducción del CYP1A y la reducción de VTG. Por lo tanto estos resultados corroboran la idea de que la activación del AhR puede estar mediando un efecto antiestrogénico (Navas y Segner, 2000).

Los activadores del AhR son normalmente ligandos de este receptor que cumplen con una serie de requerimientos estructurales: se trata de moléculas planas, policíclicas y poliaromáticas. Sin embargo se ha visto que ciertas moléculas que no cumplen con tales características son también capaces de inducir diversas respuestas mediadas por el AhR (Backlund et al., 1999). En nuestro caso nos hemos concentrado en el estudio de los imidazoles. Se trata de diversos compuestos muy utilizados como fungicidas, tanto en medicina como en agricultura. En hepatocitos de trucha arco iris en cultivo estos compuestos fueron capaces de inducir la actividad EROD y la transcripción del gen del CYP1A de un modo dosis-dependiente. Además, a las concentraciones más altas utilizadas también provocaron una reducción de la producción de VTG inducida con E2. Las características conformacionales de los imidazoles estudiados se establecieron mediante cálculos computacionales (se utilizó el programa Sybyl 7.0 y se realizó primero una búsqueda conformacional aleatoria y después una búsqueda conformacional sistemática estudiando las conformaciones que correspondían a un número concreto de rotaciones de los enlaces) y se observó que en ningún caso estas moléculas poseían una conformación plana. Por lo tanto no cumplen con las características de los ligandos del AhR. Además, la coincubación de los imidazoles con *a*-naftoflavona no tuvo ningún efecto sobre la respuesta ocasionada por el AhR. Todo ello abre el interrogante de los mecanismos por los que estos compuestos activan el AhR y pueden llegar a provocar una reducción de la producción de VTG.

Referencias.

- Backlund M, Weidolf L, Ingelman-Sundberg M. 1999. Structural and mechanistic aspects of transcriptional induction of cytochrome P450 1A1 by benzimidazole derivatives in rat hepatoma H4IIE cells. *European J. Biochem.* 261:66-71.
- Mommsen TP, Walsh, PJ. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds), *Fish Physiology, XIA*, Academic Press, New York, pp. 347-406.
- Navas JM, Segner H. 1998. Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 5: 75-82.
- Navas JM, Segner H. 2000. Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicol.* 51:79-92.
- Safe S. 1995. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmac. Ther.* 67: 247-281.



EVALUACIÓN DE EFECTOS DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA EN EL MEJILLON

Miren P. Cajaraville y Maren Ortiz-Zarragoitia

Laboratorio de Biología Celular e Histología; Departamento de Zoología y Biología Celular; Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, 644 PK, 48080 Bilbao. E-mail: zopcabem@lg.ehu.es

Las hormonas naturales y sintéticas así como numerosos compuestos químicos que interfieren con dichas hormonas pueden causar disrupción endocrina y otros efectos de reprotoxicidad en los organismos vivos. Estos compuestos entran en el medio acuático a través de efluentes de plantas depuradoras, industriales, derivados de la agricultura etc y pueden acumularse en los sedimentos, desde donde podrían ser transferidos a los organismos bénticos (Langston et al., 2005). El mejillón es un organismo béntico, filtrador, con una gran capacidad de acumular compuestos de distinta naturaleza y de mostrar respuestas sensibles a dicha exposición. Por esta razón se utiliza en todo el mundo como bioindicador y centinela de la contaminación marina. En el marco de la Península Ibérica, se ha propuesto utilizar el mejillón (y otras especies de moluscos bivalvos en los lugares sin mejillones) para realizar un seguimiento de la contaminación marina mediante una aproximación combinada química y biológica de medida de biomarcadores (Cajaraville et al., 2000). Pese al interés del estudio de los posibles efectos de disrupción endocrina en mejillón, existen muy pocos estudios en este y otros invertebrados marinos. Por tanto, los objetivos de nuestro trabajo han sido 1) determinar el ciclo reproductor "normal" de distintas poblaciones de mejillón, 2) determinar los niveles de proteínas similares a vitelogenina en distintas poblaciones de mejillón mediante el método indirecto de los fosfatos liberados en medio alcalino (ALP) (Gagné et al., 2003) y 3) evaluar los efectos de distintos compuestos químicos y de mezclas complejas como el crudo del Mar del Norte (NSO) y el fuel derramado en el accidente del Prestige sobre la reproducción y los niveles de ALP en mejillones. Según los resultados obtenidos, el ciclo gametogénico es significativamente distinto en mejillones de Txatarramendi (Reserva de la Biosfera de Urdaibai) en comparación con los del puerto deportivo de Arriluze (Getxo). El desarrollo gametogénico (índice gonadal, GI) está correlacionado significativamente con cambios en los niveles de ALP en las hembras pero no en machos. Cabe destacar que los machos muestreados en marzo de 2003 mostraron valores de ALP anormalmente altos y que en marzo de 2004 se encontró una prevalencia anormalmente alta (3/20) de mejillones hermafroditas en la localidad de Txatarramendi. En los experimentos de laboratorio, los efectos sobre GI y ALP dependieron del sexo y del grado de maduración sexual de los animales. Así, la exposición en invierno durante 3 semanas a NSO causó una reducción del GI y de los niveles de ALP en hembras, mientras que una mezcla de NSO+alquilfenoles+PAHs produjo un aumento de los mismos parámetros en machos. En ambas exposiciones se detectó un aumento significativo de oocitos atrésicos. La exposición en primavera durante 3 semanas a bisfenol A, dialilftalato y tetrabromodifenileter no tuvo efectos sobre GI o ALP, aunque sí se observó un efecto de reabsorción de la gónada en un 35% de los animales expuestos a bisfenol A. Puesto que el vertido del Prestige empezó en noviembre de 2002, durante el periodo de gametogénesis activa, es posible que el fuel provocara efectos reprotóxicos en las poblaciones afectadas, posibilidad que se está investigando mediante estudios de campo y de laboratorio.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Europea (BEEP, EVK3-CT2000-00025), MEC (acciones urgentes y vem2003-20082-C06-01 PRESTEPSE), Gobierno Vasco (ETORTEK-IMPRES) y la Universidad del País Vasco UPV/EHU (Grupos Consolidados de Investigación).

Referencias

Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C & Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Tot Environ* 247: 295-311.

VII CONDE



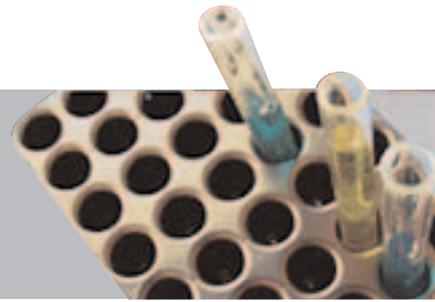
A Coruña 2005

VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

Langston WJ, Burt GR, Chesman BS & Vane CH. 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *J Mar Biol Ass UK* 85: 1-31.

Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Pelletier E, Douville M, Gauthier-Clerc S et al. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). *Comp Biochem Physiol C* 134: 189-198.

Ortiz-Zarragoitia M & Cajaraville MP. 2005. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch Environ Contam Toxicol* 49: 1-10.



EXPOSICIÓN A DIOXINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS A TRAVÉS DE LA DIETA DE LA POBLACIÓN DE CATALUÑA

Ana Bocio

*Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental, I Facultad de Medicina,
Universidad "Rovira i Virgili", Reus*

En las modernas sociedades industrializadas, la exposición a numerosas sustancias químicas está siendo cada vez más importante. Aunque estas sustancias tienen orígenes muy diversos, una buena parte llegan hasta el hombre, principalmente, a través de la cadena alimentaria.

Los alimentos contienen una amplia gama de contaminantes químicos diversos que, en determinadas ocasiones, según su potencial toxicológico y debido a la acumulación en el organismo pueden llegar a ser tóxicos (Kimbrough, 1995; De Boer y Denneman, 1998; Kogevinas, 2001; Walkowiak y cols., 2001; Domingo, 2004a, Domingo 2004b). Debido a la globalización general del mercado, en estos últimos años se han producido en Europa ciertos episodios que han sido factores de alarma social, y que conllevan que los contaminantes alimentarios estén alcanzando cada vez un mayor protagonismo. Algunos de estos episodios han sido: el incidente de los pollos belgas contaminados con dioxinas y PCBs en 1999 (Van Larebeke y cols., 2001), los niveles de benzopireno en el aceite de orujo, o la reciente polémica sobre la presencia de ciertos contaminantes en el salmón de piscifactoría (Hites y cols., 2004). Por otra parte, existe una creciente preocupación de la población en materia de seguridad alimentaria. Es decir, aumenta el interés de los consumidores por el qué y cómo se come, habiendo cada vez más demanda de alimentos seguros y controlados. Es necesaria por tanto una importante prevención a diversos niveles, a fin de reducir, en la medida de lo posible, las concentraciones de aquellos residuos o contaminantes químicos que por su toxicidad pueden suponer un potencial riesgo para la salud de los consumidores (Domingo y cols., 1999; Schecter y cols., 2001; Parzefall, 2002).

Con el objetivo de determinar los niveles de exposición a diversos contaminantes ambientales a través de la dieta de la población general, en el año 2000 se inició en Cataluña un amplio estudio al respecto. Los contaminantes evaluados incluyeron una serie de compuestos que, por su potencial toxicológico y su posible presencia en los alimentos a determinadas concentraciones, podían suponer un riesgo sobre la salud. Se analizaron, entre otros, los niveles de: dioxinas y furanos (PCDD/PCDFs), bifenilos policlorados (PCBs), difenil éteres polibromados (PBDEs), difenil éteres policlorados (PCDEs) y naftalenos policlorados (PCNs). Todos ellos forman parte de los llamados compuestos orgánicos persistentes (COPs) (Breivik y cols., 2004; Eljarrat y Barcelo, 2004), los cuales presentan una gran persistencia ambiental por su resistencia a la degradación y son bioacumulables, llegando así con facilidad a la cadena alimentaria.

Aunque las fuentes de emisión de los COPs son diversas, todos ellos, por transporte de las emisiones atmosféricas, por deposición en suelos, plantas, y a través del agua, llegan a pastos, animales terrestres y peces, pasando así a la cadena alimentaria. Debido a su carácter lipofílico, se acumulan principalmente en productos con un alto contenido en grasas. Otra vía de contaminación alimentaria importante de estos compuestos se produce también a través de piensos y productos para alimentación animal. En todo caso, la dieta es sin duda alguna, la principal fuente de exposición humana a la mayoría de estos contaminantes. Estos COPs pueden alterar la actividad hormonal, por lo que se incluyen en los llamados "disruptores endocrinos". En general, los episodios de toxicidad aguda de estos compuestos son poco frecuentes, siendo los efectos adversos debidos principalmente a la acumulación en el organismo durante largos períodos de tiempo.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

En el conjunto de alimentos analizados, la concentración más elevada de dioxinas, furanos y PCBs se detectó en el pescado y marisco. Éste fue también el único grupo de alimentos donde los niveles de PCDEs se encontraron por encima del límite de detección analítico. Por su parte, los PCNs mostraron las concentraciones más elevadas en los cereales. Tanto para PCDD/Fs, PCBs, PBDEs y PCDEs, el grupo de alimentos que supone una mayor aportación a la dieta es el pescado y marisco, seguido de los derivados lácticos para dioxinas, furanos y PCBs, y de grasas y aceites para los PBDEs.

La ingesta diaria de dioxinas, furanos y PCBs "*dioxin-like*" se encuentra por debajo de los niveles de Ingesta Diaria Tolerable (TDI) propuestos por la OMS, a excepción de algunos grupos de población que presentan niveles de ingesta superiores a estos límites. De acuerdo con la normativa establecida, no es posible establecer actualmente, un riesgo global para la salud de la población debido a la exposición conjunta a todos los contaminantes evaluados en el presente trabajo. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que, ciertos grupos de la población catalana, como los niños menores de 10 años, o los grandes consumidores de pescado, podrían estar especialmente expuestos a estas sustancias y llegar a superar la TDI en algunos casos.

En general, en la mayoría de alimentos analizados, las concentraciones más elevadas se encuentran en aquellos que presentan un porcentaje de grasas más importante. Por tanto, la reducción del consumo de alimentos con un alto contenido en lípidos podría disminuir de manera sustancial la exposición dietética a residuos de compuestos orgánicos persistentes. Otra medida que podría ayudar a reducir la exposición a través de los alimentos a estos residuos, sería seguir una dieta lo más variada y equilibrada posible y que incluya productos de distinto origen, aunque con garantías. En cuanto al pescado y marisco, probablemente los beneficios para la salud derivados de un consumo moderado de estos alimentos, compensarían los riesgos de los contaminantes que en ellos se puedan encontrar. No obstante, ésta es una cuestión francamente difícil de responder teniendo en cuenta la limitación de los conocimientos actuales (Schmidt, 2004).

En términos generales, los resultados obtenidos sugieren que solamente algunos grupos de población, como los grandes consumidores de pescado, podrían estar anormalmente expuestos a ciertos contaminantes, llegando a superar la Ingesta Diaria Tolerable en determinados casos.

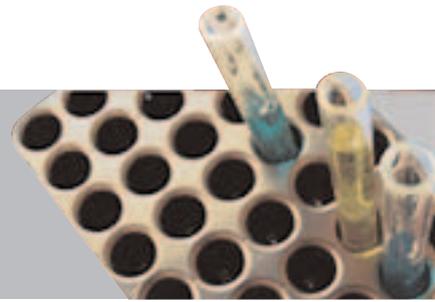
A pesar de la reducción en las concentraciones de dioxinas, furanos y PCBs, tanto a nivel medioambiental, como en su consecuencia más directa, la ingesta dietética, es aún necesario establecer nuevas estrategias que incluyan medidas medioambientales que garanticen una exposición a dioxinas y otros compuestos orgánicos persistentes por debajo de los límites propuestos por los diferentes organismos oficiales. La Convención de Estocolmo sobre COPs profundiza en este sentido. Con todo, debemos reconocer que todavía existen numerosos interrogantes sobre los potenciales efectos adversos de la exposición a bajas concentraciones, aunque prolongadas en el tiempo, a los contaminantes aquí evaluados.

Para concluir, cabría indicar que pese a que el presente estudio ha sido llevado a cabo en Cataluña, los alimentos analizados no corresponden a productos locales en su mayoría, por lo que los resultados serían extrapolables al resto de Comunidades Autónomas Españolas, con las diferencias específicas de los respectivos hábitos dietéticos.

De los resultados obtenidos en el estudio, se han realizado las siguientes publicaciones:

Llobet JM, Domingo JL, Bocio A, Casas C, Teixido A, Muller L (2003). Human exposure to dioxins through the diet in Catalonia, Spain: carcinogenic and non-carcinogenic risk. *Chemosphere* 50: 1193-1200.

Llobet JM, Bocio A, Domingo JL, Casas C, Teixido A, Muller L (2003). Levels of Polychlorinated Biphenyls in Foods from Catalonia, Spain: Estimated Dietary Intake. *J Food Protec* 66: 479-484.



Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A, Casas C (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Foodstuffs: Human Exposure through the Diet. *J Agric Food Chem* 51: 3191-3195.

Bocio A, Llobet JM, Domingo JL. (2004). Human Exposure to Polychlorinated Diphenyl Ethers through the Diet in Catalonia, Spain *J Agric Food Chem*. *J Agric Food Chem* 52: 1769-1772.

Domingo JL, Falcó G, Llobet JM, Casas C, Teixido A, Müller L (2003) Polychlorinated naphtalenes in foods: estimated dietary intake by the population of Catalonia, Spain. *Environ Sci Technol* 37: 2332-2335.

El presente trabajo ha sido financiado por: El Departamento de Sanidad y Seguridad Social de la Generalitat de Catalunya.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

BANCOS DE ESPECIMENES AMBIENTALES Y BRIOMONITORIZACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS

Alejo Carballeira Ocaña

Grupo de Ecotoxicología, Área de Ecología. Universidad de Santiago de Compostela

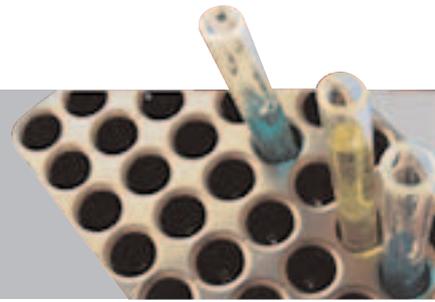
Un creciente número de contaminantes afectan al medio ambiente. En la década de los ochenta (Iyengar & Subramanian, 1997) se estimaba en más de sesenta mil los compuestos químicos que eran utilizados en el mundo, de los cuales el 30% eran tóxicos, y que cada año ingresaban en el mercado entre 1.000 y 2.000 compuestos nuevos. Según el registro del Chemical Abstracts Service (USA) el número de xenobióticos que pueden alcanzar los ecosistemas crece exponencialmente. Se produce gran variedad de compuestos y en grandes cantidades, superando la producción mundial de sustancias orgánicas los 300 106 Tn/año (Kayser et al., 1982; Schladot et al., 1993). El estudio integral de las sustancias que se van sintetizando es muy lento por su alta complejidad y elevado coste. Además, estas sustancias tienen contaminantes de producción que pueden generar efectos combinados desconocidos, lo que multiplica el número de compuestos y situaciones a investigar. En consecuencia, la distancia entre la producción de nuevos compuestos y el grado de conocimiento sobre los mismos, cada día aumenta más rápidamente.

En este contexto, desafortunadamente, nuestra capacidad de análisis y de detección en muchas matrices naturales está muy limitada, lo que nos impide reconocer los agentes causales del daño biológico observado. Las exposiciones crónicas, aún a muy bajas concentraciones, pueden derivar en problemas biológicos graves, incluida la salud humana (mutagenicidad, disruptores endocrinos, etc.).

Esta situación ha estimulado el interés por clarificar los parámetros que gobiernan los destinos y las acciones de estas sustancias (Stoeppler et al., 1987). Las investigaciones ecotoxicológicas, la vigilancia ambiental (*monitoring*) y los bancos de especímenes ambientales (BEA) son los instrumentos para la identificación y la evaluación del riesgo que conlleva la liberación de numerosas sustancias químicas al medio ambiente (Giege y Odsjö, 1993; Roosbach y Kniewald, 1997a).

La recolección, preparación y almacenamiento de muestras ambientales para el seguimiento y el análisis retrospectivo están motivados por poderosos argumentos (Roosbach y Kniewald, 1997b) y los BEA son el mejor procedimiento para la obtención y la gestión de la información. Un BEA, además de constituir una red de vigilancia periódica, permite la realización de seguimientos retrospectivos, de tal forma que son capaces de establecer, identificar y cuantificar los agentes químicos que en el momento del almacenamiento no habían sido: 1/ previamente identificados, es decir, no se conocía la existencia del compuesto; 2/ reconocidos como tóxicos; y 3/ analizados porque no existía la metodología adecuada o debido a problemas económicos. Asimismo un BEA es una fuente de obtención de niveles de referencia (*base-line values*) para la evaluación de riesgos; permite comprobar la eficacia de la gestión y de las medidas legislativas ambientales; y son un instrumento de apoyo a la investigación (ecológica, genética, epidemiológica, etc.).

Desde 1999 el Grupo de Ecotoxicología (USC) viene instrumentalizando el Banco de Especímenes Ambientales de Galicia (BEAG) adaptado a las características naturales y humanas de ésta comunidad autónoma (Carballeira y Aboal, 2000). La recolección de especímenes para el BEAG se realiza en dos modalidades: 1/ periódica (bienal), basada en la realización de cuatro campañas de muestreo de ecosistemas (terrestres, acuáticos continentales, marinos litorales y espacios conservados) y sobre redes fijas de localidades; y 2/ no periódica, que consiste en la



recolección continua de espécimes procedentes de diversas fontes (centros de recuperación de fauna silvestre, cesións, trozas forestais, etc.). Os espécimes seleccionados pertencen a un amplo grupo de organismos: plantas (briófitos, macroalgas e árbores), invertebrados (moluscos bivalvos, gasterópodos, poliquetos e nemátodos) e vertebrados (peces, aves e micromamíferos).

Por súas especiais características (sésiles, cosmopolitas, capacidade bioacumuladora, etc.) os briófitos (musgos e hepáticas, terrestres e acuáticos) se consideran os biomonitores "estrela" do BEAG. Su utilidade na biomonitorización de microcontaminantes (metales pesados, metaloides, halóxenuros, isótopos radioactivos, plaguicidas, etc.) ha sido amplamente demostrada desde os primeiros traballos realizados por Rühling e Tyler en 1968 hasta a actualidade (Fernández e Carballeira, 2001; Fernández et al., 2002; 2004a; Couto et al., 2003; Real et al., 2003). Existe unha Red Europea de Biomonitorización da Calidade do Aire con Musgos, en cuxa última edición participaron 36 países recolectando mostras en unos 7000 puntos (Buse et al., 2003). Ademais, a facilidade de trasplante llos fai especialmente útiles en biomonitorización activa (Fernández e Carballeira, 2000; Fernández et al., 2000; 2004b). Recientemente estudiamos su utilidade como biomonitores de dioxinas e furanos explorando distintas fontes de emisión, lo que nos permitiu: 1/ demostrar su elevada capacidade bioconcentradora, lo que simplifica el análisis químico; 2/ definir los niveles de fondo regionales; 3/ reflejar con precisión los cambios espacio-temporales en los niveles atmosféricos de estos compuestos; y 4/ caracterizar focos de emisión mediante la composición relativa de los distintos congéneres (Abad et al., 2003; Carballeira et al., en imprenta).

BIBLIOGRAFÍA

Abad, E., Caixach, J., Rivera, J., Real, C., Aboal, J., Fernández, A. e Carballeira, A. (2003). Study on the use of mosses as biomonitors to evaluate the environment impact of PCDDs/PCDFs from combustion processes-Preliminary results. *Organohalogen Compounds* 6: 283-287.

Buse, A., Norris, D., Harmens, H., Büker, P., Ashenden, T. e Mills, G. (2003). Heavy metals in European mosses: 2000/2001 survey. Bangor, United Kingdom: UNECE ICP Vegetation.

Carballeira, A. e Aboal, J. (2000): Bancos de Especímenes Ambientales. Una proposta para Galicia. Ed Serv. Pbl. Univ. de S. de Compostela.

Carballeira, A., Fernández, J.A., Aboal, J.R., C. Real e Couto, J.A. Moss: a powerful tool for dioxin monitoring *Environmental Science & Technology* (en imprenta).

Couto, J.A., Fernández, J.A., Aboal, J.R., e Carballeira, A. (2003). Annual variability in heavy-metal bioconcentration in moss: sampling protocol optimization *Atmospheric Environment* 37: 3517-3527.

Elaine, W. e Gunter, B.S. (1997). Biological and Environmental specimen banking at the centers for disease control and prevention. *Chemosphere* 34 (9/10): 1945-1953.

Fernández, A. e Carballeira, A. (2000). Differences in the responses of native and transplanted mosses to atmospheric pollution. A possible role of selenium. *Environmental Pollution* 110/1: 73-78.

Fernández, A. e Carballeira, A. (2001). Evaluation of contamination, by different elements in terrestrial mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 461-468.

Fernández, A. Aboal, J. e Carballeira A (2000). Use the native and transplanted mosses as complementary techniques for biomonitoring mercury around an industrial facility. *Science of the Total Environment* 256: 151-161.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

Fernández, J.A., Aboal, J.R., Couto, J.A. y Carballeira, A. (2002). Sampling optimization at the sampling-site scale for monitoring atmospheric deposition using moss chemistry. *Atmospheric Environment* 36/7: 1163-1173.

Fernández, J.A., Aboal, J.R., Couto, J.A., y Carballeira, A. (2004a). Moss bioconcentración of trace elements around a FeSi smelter: modelling and cellular distribution. *Atmospheric Environment* 38:4319-4329.

Fernández, J.A., Aboal, J.R y Carballeira, A. (2004b). Identification of pollution sources by means of moss bags. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 76-83.

Giege, B. y Osdjö, T. (1993). Coordination of environmental specimen banking in the Nordic countries, its mission and strategy. *Science of the Total Environment* 139/140: 37-47.

Iyengar, G.V. y Subramanian, K.S. (1997). Environmental Specimen Banking and Analytical Chemistry. An Overview. In: *Environmental Biomonitoring. Exposure Assessment and Specimen banking*. 1st ed. (Eds: Subramanian,KS; Iyengar,GV) American Chemical Society, Washington, DC, 288 pp., ACS Symposium Series 654: 220-246.

Kayser, D., Boehring, U.R. y Schmidt-Bleek, F. (1982). The environmental specimen banking project of the Federal Republic of Germany. *Environmental Monitoring and Assessment* 1: 241-255.

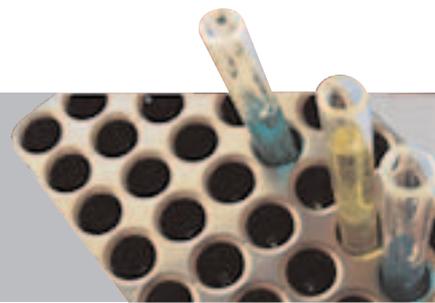
Osdjö, T. (1997). Manual and Standard Operating procedures in nordic environmental specimen banking. *Chemosphere* 34 (9-10): 1955-1960.

Real, C.; Aboal, J.R., Fernández, J.A., y Carballeira, A. (2003). The use of native mosses to monitoring fluorine levels and associated temporal variations in the vicinity of an aluminium smelter. *Atmospheric Environment* 37: 3091-3102.

Roosbach, M. y Kniewald, G. (1997a). Environmental Specimen Banking - Marine Monitoring Strategies and Oceanographic Perspectives. *Croatia Chemica Acta* 70(1): 459-472.

Rosbach, M. y Kniewald, G. (1997b). Concepts of marine specimen banking. *Chemosphere* 34 (9/10): 1997-2010.
Schladot, J.D., Stoepler, M. y Schwuger, M.J. (1993). The Jülich Environmental Specimen Bank. *The Science of the Total Environment* 139/140: 27-36.

Stoepler, M., Backhaus, F., Schladot, J.D. y Commerscheidt, N. (1987). Environmental specimen bank specific reference materials - main aims and preparation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 326: 707-711.



PRESENCIA, DESTINO E IMPACTO DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIO ACUÁTICO DE CATALUÑA

Miren López de Alda y Damià Barceló

Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB-CSIC)

Desde la publicación en el año 2000¹ de los primeros datos sobre la presencia de compuestos disruptores endocrinos (EDCs) en el medio ambiente acuático español, concretamente en las aguas y sedimentos de los ríos Anoya y Cardener, afluentes ambos del río Llobregat, y de poner en evidencia la relación positiva de ésta con los fenómenos de feminización observados en peces (carpas) capturados en las mismas áreas, han sido varios los estudios que se han llevado a cabo en los últimos años en el área de Cataluña con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la presencia, destino e impacto de los EDCs en el medio acuático²⁻⁷. Estos estudios se han centrado, sobre todo, en la investigación de los estrógenos naturales y sintéticos (que se caracterizan por exhibir una gran potencia estrógenica), los detergentes no iónicos de tipo alquilfenol etoxilado (menos potentes que los estrógenos pero presentes a concentraciones muy superiores), y los fármacos (los efectos de los cuales no están aún claros). Estos compuestos han sido investigados en una variedad de matrices y compartimentos ambientales que incluyen aguas y sedimentos de varios ríos catalanes, así como del litoral mediterráneo catalán, aguas residuales de distintas plantas de tratamiento, y aguas procedentes de plantas potabilizadoras. Asimismo, para evaluar el posible impacto de estos compuestos en el medio ambiente acuático, los datos químicos obtenidos en los programas de vigilancia llevados a cabo se han correlacionado con datos resultantes de aplicar distintos ensayos de estrogenicidad (ensayo con levaduras recombinantes y test de la vitelogenina) a las mismas muestras. En esta presentación se sumarán los resultados más relevantes obtenidos en estos estudios, según los cuales, algunos de los EDCs investigados se encontrarían presentes en el medio ambiente acuático de Cataluña a niveles con frecuencia superiores a los que se estima suficientes para producir efectos estrogénicos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la UE a través del proyecto MODELKEY (SSPI-CT-2003-511237-2), por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto CTM2004-06265-C03-01/TECNO) y por Aguas de Barcelona (AGBAR).

¹M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076-5083, 2000.

²N. García-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152-1158, 2001.

³M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura and D. Barcelo, *Anal. Chem.* 73, 5886-5895, 2001.

⁴M.J. López de Alda, A. Gil, E. Paz, D. Barceló. *Analyst* 127, 1299-1304, 2002.

⁵M Petrovic, M. Solé, M.J. López de Alda, D. Barceló. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146-2156, 2002.

⁶S. Gonzalez, M. Petrovic, D. Barceló. *J. Chromatogr. A* 1052, 111-120, 2004.

⁷R. Céspedes, S. Lacorte, D. Raldua, A. Ginebreda, D. Barceló, B. Piña. *Chemosphere* (in press).



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN, SUSCEPTIBILIDAD Y EFECTO.

Nicolás Olea

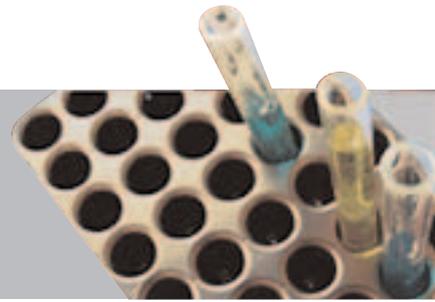
Laboratorio de Investigaciones Médicas. Hospital Clínico. Universidad de Granada. 18071 Granada.

Para la estimación de la exposición a disruptores endocrinos (DE) se ha sugerido que la cuantificación en muestras biológicas de los compuestos químicos de interés se debería acompañar del estudio de las interacciones existentes entre ellos y el desarrollo de biomarcadores de susceptibilidad y efecto. Tres tipos diferentes de biomarcadores serían de utilidad en disrupción endocrina: i) biomarcadores de exposición que hacen referencia a la cuantificación de DE y a su interacción con células o moléculas diana pertenecientes a un compartimento corporal determinado; ii) biomarcadores de susceptibilidad que definen la capacidad del organismo, inherente o adquirida, para adaptarse a las consecuencias derivadas de la exposición a DE, y iii) biomarcadores de efecto que se definen en términos de la alteración hormonal, bioquímica, fisiológica que pueda ser medida, cuantificada y reconocida como una desviación del patrón normal, un efecto adverso o un signo de enfermedad.

En lo que concierne al caso particular del empleo de biomarcadores de exposición a DE con actividad estrogénica, la estrategia debería considerar aspectos metodológicos de diferente orden: i) el establecimiento del test(s) biológico con el que verificar la actividad hormonal responsable del efecto, ii) la selección de la muestra biológica -sangre, suero, tejido, entre otros- en términos de accesibilidad, y iii) la posibilidad de extracción, limpieza, separación de hormonas endógenas de xenobióticos y preparación óptima para poder ser utilizada en el test elegido.

Así mismo, el diseño de estudios sobre la relación existente entre la exposición a los DE de carácter xenoestrogénico y el desarrollo último de enfermedad estrógeno-dependiente, basados en biomarcadores de exposición debe tener en cuenta: i) la hipótesis a ser testada, ii) los compuestos químicos que van a ser medidos, y iii) la actividad biológica que vaya a ser analizada. A pesar de lo evidente, estas consideraciones no suelen ser tenidas en cuenta de forma sistemática, de tal manera que: i) muchos estudios incluyen la medida de compuestos químicos que no son hormonalmente activos, obviando la hipótesis hormonal de partida; ii) otros estudios se limitan a la medida de un único compuesto, ignorando la interacción entre DE; y iii) la mayoría de los estudios no consideran los efectos acumulativos y las interacciones con las hormona endógenas. Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar marcadores de exposición estrogénica que vayan más allá de la cuantificación de xenoestrógenos aislados.

Nuestro grupo de trabajo adoptó hace tiempo esta aproximación y desarrolló un sistema para estimar la carga estrogénica de xenobióticos en muestras de suero humano usando el test E-Screen, y un bioensayo *in vitro* de probada actividad para identificar xenoestrógenos. Este bioensayo compara el rendimiento celular entre cultivos de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama tratadas con estradiol y aquellas tratadas con diferentes concentraciones de xenobióticos sospechosos de ser estrogénicos. Posteriormente, se desarrolló la metodología de extracción de xenoestrógenos de muestras humanas de tejido adiposo y la separación de las hormonas sexuales de los xenoestrógenos bioacumulados para así poder probar estos compuestos en el bioensayo E-Screen. De esta forma, el ensayo biológico de estrogénicidad E-Screen utilizado por nuestro grupo de trabajo para la medida de la carga estrogénica total efectiva (TEXB) asigna un valor de estrogénicidad a las muestras biológicas analizadas (tejido adiposo, sangre, leche materna, placenta) y convierte un marcador de exposición, tipo dosis interna, en un marcador de equivalencia biológica y por tanto de efecto biológico. Este marcador está siendo aplicado con éxito en estudios epidemiológicos de muy diferente índole, en los que la exposición a DE estrogénicos se cuantifica mediante la medida individual de residuos químicos y la estimación de la actividad estrogénica del extracto tisular. Como la aplicación del concepto de biomarcador de exposición a TEXB, y a otros ensayos de características similares, puede ser excesivamente restrictiva (puesto que su expresión no se limita a indicar exposición sino que establece un vínculo con el efecto biológico producido) creemos que la medida de TEXB en muestras biológicas es, al mismo tiempo, un marcador de exposición y un marcador subrogado de efecto.



EXPOSICIÓN A XENOBIÓTICOS DEL VERTIDO DEL PRESTIGE: POSIBLES REPERCUSIONES ENDOCRINAS E INMUNOLÓGICAS.

Anunciación Lafuente

Área de Toxicología, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus de Ourense

En las tres últimas décadas Galicia ha sufrido siete de las once mayores catástrofes marítimas de Europa, con los naufragios del *Polycommander*, *Andros Patria*, *Erkowit*, *Urquiola*, *Casón*, *Mar Egeo* y *Prestige*. El 19 de noviembre de 2002 este último buque petrolero se partió en dos a unas 130 millas de la costa, hundiéndose a 3.500 m de profundidad. Esto sucedía seis días después de haber lanzado un SOS frente a las costas de Finisterre y haber deambulado durante 435 Km por la costa occidental gallega. Sus bodegas albergaban 77.000 Tn de fuel pesado (residuo de la destilación del petróleo crudo), de las cuales se vertieron 20.000 antes del hundimiento. Solamente en Galicia se vieron afectados más de 900 Km de costa por las sucesivas mareas negras. Esto supuso una catástrofe de enorme magnitud que generó una gran alarma social. De hecho, se registraron unas 330.000 acciones de voluntarios entre noviembre de 2002 y julio de 2003.

En lo que respecta a las características y a la composición del fuel vertido por el Prestige, cabe destacar que es un fuel oil pesado con un 22,9 % de hidrocarburos saturados, un 52,7% de hidrocarburos aromáticos, un 12,0% de resinas y un 12,4% de asfaltenos. Asimismo, contiene 59,2 mg/Kg de benceno, 60,3 mg/Kg de etilbenceno, 123 mg/Kg de tolueno y 326 mg/Kg de xilenos. Su contenido de metales es importante. Así, aluminio, calcio, hierro, potasio, magnesio y titanio están presentes en concentraciones de 100-1000 ppm; bromo, níquel y vanadio, en concentraciones de 10-100 ppm; boro, bario, manganeso, molibdeno, estroncio y zinc, en concentraciones de 1-10 ppm; y arsénico, cobalto, cromo, cobre, litio y selenio, en concentraciones de 0,1-1 ppm.

Ante estos hechos, se realizó el trabajo "*Recogida y limpieza de fuel del Prestige. Evaluación de la exposición y daños sobre la salud en voluntarios y trabajadores*". Dicho trabajo fue realizado, gracias a la financiación de la Fundación Arao, por investigadores de las tres universidades gallegas (Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Santiago de Compostela, Área de Genética de la Universidad de La Coruña y por el Área de Toxicología de la Universidad de Vigo). En este marco, se encuadra la tarea realizada por el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Vigo, cuyos resultados más sobresalientes se presentan en esta ponencia.

Teniendo en cuenta la composición de metales en el fuel vertido por el Prestige, los niveles de estos metales en sangre podrían ser buenos indicadores de la exposición al mismo. Por otro lado, se desconocen los efectos biológicos que conlleva la exposición a una mezcla de compuestos tan compleja como la que constituye este fuel. No obstante, el sistema inmunológico es uno de los sistemas fisiológicos que primero responde a cualquier xenobiótico, por lo que todo apuntaba a que algunos parámetros inmunológicos podrían ser útiles como posibles indicadores de la exposición a este fuel. Además, si tenemos en cuenta que la secreción de prolactina y cortisol responde inmediatamente ante situaciones de estrés como las sufridas por el personal que contribuyó a la limpieza de playas y rocas en este episodio, y que hay una estrecha relación entre dichas hormonas y la actividad inmunológica, era de esperar que los niveles plasmáticos de prolactina y cortisol variaran tras la exposición al fuel que se estaba recogiendo.

Ante los hechos comentados más arriba, los objetivos de nuestro trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar si la concentración sanguínea de níquel, aluminio, plomo y zinc es un buen marcador de exposición a este tipo de fuel.
2. Ensayar potenciales marcadores del efecto biológico derivado de la exposición a este fuel. Concretamente se



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

determinaron los siguiente parámetros inmunológicos y hormonales:

- a. Porcentaje de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.
- b. Respuesta de linfocitos Th1/Th2, para lo cual se cuantificaron los niveles plasmáticos de interleukina-2 (IL-2), interleukina-4 (IL-4), interleukina-6 (IL-6), interleukina-10 (IL-10), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).
- c. Concentración plasmática de prolactina y cortisol.

Para la consecución de estos objetivos, se estudiaron cuatro grupos de sujetos: voluntarios venidos de diversas universidades españolas expuestos al fuel durante 5 días, trabajadores que retiraron a mano el fuel (empresa Tragsa), trabajadores que limpiaron las costas de fuel mediante máquinas especiales a base de vapor a presión, y un grupo de sujetos no expuestos al fuel, que se utilizó como grupo control. En total, se estudió una población de 240 sujetos, siendo $n = 60$ en cada grupo.

Se extrajeron 2 mL de sangre de cada persona (500 μ L para la determinación de metales, 400 μ L para el estudio de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, 100 μ L de plasma para la cuantificación de citocinas y 50 μ L de plasma para las determinaciones de los niveles plasmáticos de prolactina y cortisol).

Se determinó la concentración de metales por espectrometría de absorción atómica, las poblaciones linfocitarias y las citocinas se cuantificaron por citometría de flujo, y los niveles hormonales se cuantificaron mediante radioinmunoensayo.

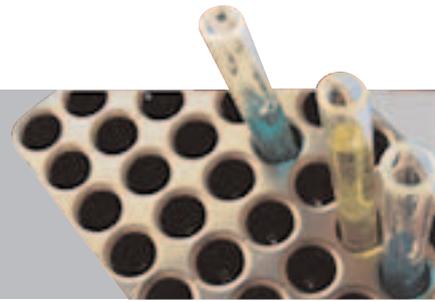
Entre los resultados obtenidos más sobresalientes cabe destacar un aumento de la concentración de níquel ($P \leq 0,001$ vs. grupo control), aluminio ($P \leq 0,01$ vs. grupo control) y plomo ($P \leq 0,01$ vs. grupo control) en los trabajadores que limpiaron playas y rocas de modo manual, sin ningún tipo de máquinas. Asimismo, en los trabajadores que utilizaron hidrolimpiadoras (máquinas de vapor a presión) aumentó la concentración de níquel ($P \leq 0,001$ vs. grupo control) y aluminio ($P \leq 0,001$ vs. grupo control), descendiendo la de plomo ($P \leq 0,01$ vs. grupo control) y zinc ($P \leq 0,01$ vs. grupo control). En los voluntarios, tras trabajar 5 días, se observó un descenso de zinc ($P \leq 0,01$ vs. grupo control).

El porcentaje de linfocitos T positivos disminuyó en los empleados que limpiaron de forma manual playas y rocas ($P \leq 0,001$ vs. grupo control). Este descenso fue debido a una disminución del porcentaje de linfocitos CD4⁺ en estos mismos sujetos ($P \leq 0,001$ vs. grupo control), al mismo tiempo que aumentó el porcentaje de linfocitos CD8⁺ ($P \leq 0,01$ vs. grupo control).

Tanto los trabajadores que recogieron manualmente el fuel como los que lo hicieron con máquinas hidrolimpiadoras presentaron niveles elevados de IL-2 ($P \leq 0,05$ vs. grupo control), IL-4 ($P \leq 0,05$ vs. grupo control) e IL-10 ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$ vs. grupo control para los primeros y segundos respectivamente). Los niveles de IFN- γ sólo se vieron incrementados en los trabajadores que recogieron a mano el fuel ($P \leq 0,001$ vs. grupo control).

Los niveles plasmáticos de prolactina se vieron incrementados en las mujeres que recogieron manualmente el fuel ($P \leq 0,001$ vs. grupo control), mientras que la concentración de cortisol descendió en los hombres que utilizaron máquinas de vapor a presión para limpiar de fuel las rocas y las playas ($P \leq 0,001$ vs. grupo control).

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, podemos afirmar de forma global que la exposición al fuel vertido por el buque Prestige conlleva variaciones en la concentración de algunos de los metales analizados así como en diversos parámetros inmunológicos y hormonales estudiados. Por lo tanto se podría afirmar que los metales analizados pueden utilizarse como indicadores de exposición a este tipo de fuel y que los parámetros inmunológicos y hormonales estudiados podrían ser útiles como indicadores del efecto biológico. Asimismo, la mezcla de xenobióticos que constituye este fuel podría considerarse como un disruptor endocrino e inmunotóxico.



EXPOSICIÓN PRENATAL AL DDE Y DESARROLLO NEUROCONDUCTUAL EN NIÑOS DE 4 AÑOS

Núria Ribas-Fitó

Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, Barcelona

Introducción. La exposición a compuestos organoclorados (OCs) como el DDE, el HCB y los PCBs durante las primeras etapas de la vida se produce a través de la placenta y a través de la lactancia materna. Dado que el crecimiento y maduración del cerebro continua después del nacimiento, los períodos pre y postnatal aparecen como ventanas críticas de vulnerabilidad para el sistema nervioso. La lactancia materna favorece la transferencia de OCs al niño pero también se asocia con un mejor neurodesarrollo. El objetivo de este trabajo es el de evaluar la asociación entre la exposición prenatal a DDE y a otros OCs con el neurodesarrollo del niño a los 4 años, y evaluar el papel modificador de la lactancia materna.

Métodos. Se establecieron dos cohortes de niños nacidos entre 1997 y 1999 en las regiones de la Ribera d'Ebre (Cataluña) y la isla de Menorca (Islas Baleares) (n=475). El neurodesarrollo de los niños se evaluó a los 4 años con el test de McCarthy. Los OCs se midieron en suero de cordón. Se obtuvo información de la dieta del niño y de las variables sociodemográficas de los padres a través de cuestionarios.

Resultados. Los niveles de DDE al nacer se asociaron negativamente con las habilidades Perceptivo-Manipulativas del niño (disminución del 1.6% por cada incremento de la dosis de DDE). Esta asociación fue más fuerte entre los niños que lactaron menos de 16 semanas (disminución de -3.93 puntos (SE:1.90) en los niños que lactaron de 1 a 16 semanas y disminución de -4.27 puntos (SE:2.08) en los niños que hicieron lactancia artificial). Los PCBs y el HCB no se asociaron con el neurodesarrollo del niño.

Conclusiones: La exposición prenatal al DDE se asocia con un retraso en las habilidades Perceptivo-Manipulativas del niño a los 4 años de edad. La lactancia materna de larga duración aparece beneficiosa para el desarrollo neurológico del niño equilibrando el impacto negativo de los contaminantes.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

LA 1ª CONFERENCIA DE LAS PARTES DEL CONVENIO DE ESTOCOLMO Y EL PLAN NACIONAL FRENTE A LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

Dr. Ignacio Elorrieta

Subdirección General de calidad del aire y prevención de riesgos, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid

El Convenio de Estocolmo (2001) regula con el objetivo final de su eliminación, los contaminantes orgánicos persistentes (en la actualidad solo 12 sustancias) que son compuestos químicos, resistentes a la degradación, altamente tóxicos, que se acumulan en los tejidos de los seres vivos y pueden ser transportados a larga distancia de su lugar de origen, suponiendo por ello un grave riesgo para la salud humana y el medio ambiente de todo el planeta.

El objetivo final de dicho Convenio es la eliminación progresiva de estas sustancias y se sustitución por otras menos dañinas.

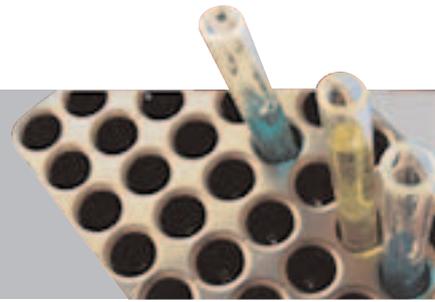
En Mayo de 2005 tuvo lugar en Punta del Este (Uruguay) la 1ª Conferencia de las Partes, en la que España jugó un papel muy importante, tanto como impulsora de políticas de salud como aportaciones de carácter técnico.

En cuanto a las políticas España ha jugado un papel de puente entre la Unión Europea y Latinoamérica en cuestiones relacionadas con la gestión de sustancias químicas a la vez que apostaba por el Multilateralismo, aportando 100.000 euros para crear capacidad en los países latinoamericanos para que puedan implantar los correspondientes Planes Nacionales de Implementación frente a los COPs.

En el plano técnico, España ha sido líder en la preparación de la postura europea sobre Planes Nacionales de Aplicación, consiguiendo junto con la Unión Europea, el objetivo de que se aprobara un documento base para el diseño de estos planes, que serán el pilar fundamental para la aplicación del convenio en los países signatarios.

España ha conseguido que la UE respalde a Méjico en su propuesta de que se analice el Lindano como nueva sustancia a incluir en el Convenio y apoyado a Noruega para que se introduzcan 3 sustancias adicionales (Pentabromo difenil eter, clordecona y hexabromo difenil).

El Plan Nacional de Aplicación Español, que se analiza en la ponencia, es un claro ejemplo de cómo aplicar los principios de prevención y de sustitución en la gestión de los químicos como herramientas para proteger la salud y el Medio Ambiente frente a esas sustancias. De hecho, puede considerarse un auténtico Plan Piloto de cómo



Gestionar en el futuro las sustancias CMR, BPT, vBvP y los disruptores endocrinos.

OPPORTUNITIES FOR EUROPEAN RESEARCH ON ENDOCRINE DISRUPTERS

Peter Pärt

European Commission, DG Joint Research Centre

European Commission has supported research on endocrine disruptors (EDs) for more than 10 years. Already the Fourth Research Framework Programme (1994-1997) contained some projects on ED because the topic had emerged as a research priority in response to rising public concerns. Around 12 million euros were spent. Many of the projects focused on fish and other aquatic animals because of alarming observations from the aquatic environment. The projects aimed to understand the mechanisms involved, to develop test methods and to identify potential endocrine disruptors. The Weybridge conference in December 1996 resulted in a strong boost for European ED research by putting the issue on the public- and political agendas. A Community Strategy on Endocrine Disruptors was adopted 1999 and research activities in this field were greatly enhanced. Within the Fifth Framework Programme of Research (1998-2002), ED research received approximately 60 million Euro - 5 fold increase compared to FP4. Research topics were broadened and included:

- exposure of humans to endocrine disruptors and possible health effects (including low-dose and combined effects)
- risk assessment of various groups of EDC
- development of test methods
- monitoring of endocrine disruptors in the environment
- fish and invertebrate endpoints

Some projects are still on-going. Endocrine disruption has not been forgotten in the Sixth Research Framework Programme (2002-2006) although the level of funding in FP 6 is lower than in FP 5. ED issues are being specifically addressed by Priority 5 (Food quality and safety, sub-areas 'Environmental health Risks' and 'Methods of Analysis, Detection and Control'; and, to a lesser extent, by Priority 6 (Sustainable development, global change and ecosystems) and Priority 1 (Life Sciences, genomics, and biotechnology for health). There are still calls open within FP6 which may involve research on EDs. For the coming FP 7, which will be a program spanning 7 years instead of the current 4 years, the budget has not been agreed upon yet. There is potential space for ED research within the three of the "themes" - Health, Food Agriculture and Biotechnology and Environment. Basic and fundamental research will be supported by a new European body - the European Research Council. Fundamental research in endocrinology may also be supported by ERC.

VII CONDE



A Coruña 2005

VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

VII CONDE



A Coruña 2005



Comunicaciones Posters



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

PROPUESTA DE MÉTODOS PARA LA MONITORIZACIÓN DE PESTICIDAS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN AGUAS

**Estefanía Concha Graña; M^a Isabel Turnes Carou, Soledad Muniategui Lorenzo; Purificación López Mahía,
Darío Prada Rodríguez, Esther Fernández Fernández**

*Departamento de Química Analítica e Instituto de Medio Ambiente, Universidad da Coruña
Facultad de Ciencias, Campus A Zapateira. A Coruña 15701*

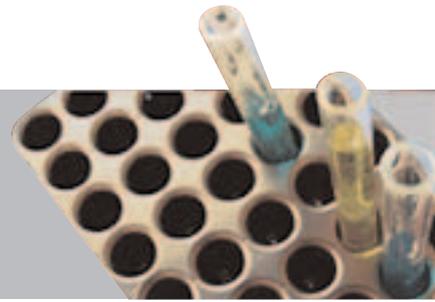
La toxicidad y el peligro que suponen algunos pesticidas para la salud humana se empezó a descubrir en los años 60. Posteriormente se relacionaron ciertos problemas reproductivos en pájaros piscívoros con la presencia de DDE, comprobándose a partir de entonces la capacidad de algunos de estos contaminantes para interferir en la función endocrina. Desde entonces numerosos estudios han asociado las patologías reproductivas y endocrinas observadas en distintas especies animales con la exposición a contaminantes medioambientales.

Dentro de los pesticidas organoclorados, DDT, clordano (cis y trans), lindano, aldrín, dieldrín, endrín, endosulfán (alfa y beta) y heptacloro están clasificados como disruptores endocrinos y su presencia en el medioambiente se encuentra regulada por diversas directivas europeas. Por este motivo, y teniendo en cuenta que muchos de ellos producen alteraciones endocrinas a muy bajas concentraciones, cada vez es más necesario el desarrollo de métodos analíticos altamente sensibles, eficaces, rápidos y limpios que permitan su monitorización en distintas matrices.

En este estudio se proponen dos métodos para el análisis a niveles traza de pesticidas organoclorados disruptores endocrinos y metabolitos en aguas. Uno de ellos, consiste en la extracción en fase sólida empleando discos laminares de fase C18, y que incluye varias etapas. El otro método propuesto, más rápido y sencillo, pero restringido a muestras relativamente "limpias", consiste en llevar a cabo una microextracción líquido-líquido con 2 mL de disolvente y agitando 1 min. Ambos métodos han dado resultados satisfactorios con límites de detección suficientes para determinar los compuestos a los límites requeridos por la legislación. Por lo que la elección entre uno u otro dependerá del tipo de muestra a analizar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la financiación de la Xunta de Galicia (PGIDT00PXI10304PR). E. Concha Graña agradece al Ministerio de Ciencia y Tecnología la concesión de un contrato de investigación con cargo al proyecto REN 2003-08603-C04-01/CLI.



EFFECTOS TÓXICOS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA MULTIGENERACIONAL A DISRUPTORES ENDOCRINOS ALQUILFENÓLICOS

Octavio P. Luzardo (1), Luis D. Boada (1), Manuel Zumbado (1), Guayarmina Hernández (1), Muriel Goethals (1), Alfonso Blanco (2), José G. Monterde (2), Juan J. Cabrera (3)

(1) Unidad de Toxicología, Dpto. de Ciencias Clínicas y (3) Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Morfología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. (2) Dpto. de Anatomía y Anatomía Patológicas Comparadas, Universidad de Córdoba, Apdo. de Correos 550. 35080 - Las Palmas de Gran Canaria

Los alquifenoles (AFs), octifenol (OF) y nonilfenol (NF) son contaminantes ambientales estrogénicos de las aguas, derivados de surfactantes de uso industrial y doméstico. Son productos químicos capaces de unirse al receptor de estrógenos citosólico y a los lugares de unión membranales para estrógenos (mEBS) del hepatocito sufriendo metabolización hepática por el citocromo P450. Todo ello y la conocida hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad inducida por estrógenos nos ha llevado a estudiar las acciones ejercidas por los AFs sobre el hígado.

MATERIAL Y MÉTODOS: Ratas macho y hembra fueron expuestas a agua de bebida contaminada con OF o NF (25 ppm) durante tres generaciones ininterrumpidamente. Los hígados de los animales tratados fueron sometidos a estudios histopatológicos y bioquímicos.

RESULTADOS: Los hígados de los animales expuestos a AFs, mostraron importantes cambios degenerativos indicativos de alteraciones metabólicas. Los hígados de los animales de la segunda y tercera generación mostraban moderada degeneración grasa e intensa degeneración glucogénica (células en cebolla y glucógeno beta y gamma); dicha degeneración se acompañaba de aumento de células binucleadas (endomitosis) e incremento del índice de apoptosis. Asimismo fue evidente un incremento en los niveles de peróxidos lipídicos (MDA) y disminución de glutatión reducido GSH. Los cambios eran más evidentes en la tercera generación y en los animales tratados con OF.

CONCLUSIONES: Los AFs, como otros muchos contaminantes ambientales, ejercen acciones tóxicas sobre el tejido hepático. Tales efectos hepatotóxicos no parecen relacionarse con la estrogénicidad de los AFs como son los cambios degenerativos hepáticos, en ese sentido los AFs se comportan como disruptores metabólicos (variando la homeostasis glucídica) y el hecho de que los AFs, al contrario que los estrógenos, aumenten el índice apoptótico. A su vez el incremento en el índice apoptótico parece ser debido a un incremento en los niveles de estrés oxidativo presente en el tejido hepático de los animales expuestos de forma crónica a estos compuestos.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido subvencionado por los Proyectos de la Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno de Canarias con referencias 1998/068 y 2003/045.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS MODIFICAN LA SEÑAL DE Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS α - PANCREÁTICAS A TRAVÉS DE UN RECEPTOR DE ESTRÓGENOS DE MEMBRANA

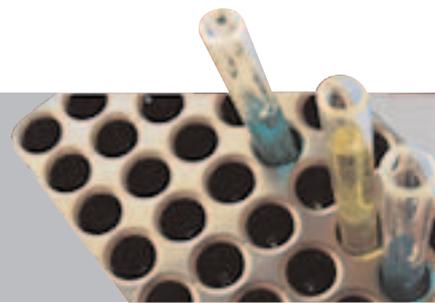
Paloma Alonso-Magdalena, Ana B. Ropero, Cristina Ripoll y Angel Nadal

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Sant Joan d'Alacant, Alicante

El glucagón, hormona secretada por las células del islote de Langerhans, está implicada en la regulación del metabolismo glucídico y lo hace incrementando la síntesis y movilización de glucosa hepática. Además desempeña otra serie de funciones extrahepáticas como son la lipólisis en tejido adiposo o el control de la saciedad a nivel del SNC. En este trabajo mostramos cómo tanto el disruptor endocrino bisphenol A (BPA) como el dietilestilbestrol (DES) a una concentración $10^{-9}M$, bloquean las oscilaciones de Ca^{2+} en célula pancreática, señal que desencadena la secreción de glucagón. Se trata de un efecto rápido, que es mimetizado por la molécula impermeable E2 conjugada a peroxidasa (E-HRP). Estudios de competición de unión a E-HRP en células previamente identificadas como mediante Inmunocitoquímica, indican que $17\beta-E_2$, BPA y DES comparten un sitio de unión a membrana cuyo perfil farmacológico difiere del de los receptores clásicos.

El efecto del BPA, DES y E2 es bloqueado por la pertussis toxin (un inhibidor de $G\alpha_i$ y $G\alpha_o$), así como por el inhibidor específico de la guanilato ciclasa 1H-[1,2,4oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, y por el inhibidor de la óxido nítrico sintasa N-nitro-L-arginine methyl ester. Sin embargo éste es reproducido por el 8-bromo-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate y se abole en presencia del inhibidor de la protein quinasa dependiente de GMPC, el KT-5823.

Por todo ello concluimos que el efecto del E2, BPA y DES sobre la célula α pancreática podría explicar algunos de los efectos que sobre el metabolismo glucídico y lipídico tiene los disruptores endocrinos.



VARIACIONES EN LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS EN SANGRE DE RATA PREPUBER EXPUESTA A ENDOSULFÁN

T. Cabaleiro, C. Ulibarrena*, A. Lafuente

*Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus de Ourense, Las Lagunas s/n,
32004 - Ourense.*

**Complejo Hospitalario de Ourense*

El endosulfán es un insecticida organoclorado, disruptor endocrino que posee actividad inmunotóxica y neurotóxica. Su inmunotoxicidad ha sido evidenciada en diversas especies animales como rata, rana y pollo. No obstante, el número de trabajo sobre este tema es muy escaso. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo es evaluar las posibles alteraciones inmunológicas que induce la exposición a este plaguicida durante la gestación y la lactancia en las crías en edad prepuber. Para ello el día 15 de vida se sacrifican las crías (machos y hembras) nacidas de las madres expuestas a endosulfán (dos dosis diferentes: 0.612 y 6.12 mg/Kg/día) y de madres no tratadas con el plaguicida (grupo control). En estos animales se estudian las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica mediante inmunocitometría de flujo. En los machos, la dosis inferior del plaguicida no modifica el porcentaje de las poblaciones linfocitarias estudiadas. Sin embargo, la dosis de 6,12 mg/Kg/día induce un descenso del porcentaje de todas ellas. En las hembras nacidas de las madres tratadas con la dosis de 0,61mg/Kg/día se observa un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de linfocitos T positivos, CD4⁺ y CD8⁺. En estos mismos animales, la administración del plaguicida a la dosis de 6,12 mg/Kg/día conlleva un descenso del porcentaje de linfocitos B positivos y T positivos.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la exposición al endosulfán durante la gestación y la lactancia conlleva alteraciones inmunológicas importantes durante la pubertad. Estas modificaciones se observan tanto a nivel humoral como celular y son distintas en machos y en hembras. Estas diferencias podrían ser debidas al estatus hormonal durante esta etapa de desarrollo.

Proyecto Ref. AGL2004-04543/ALI, del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, perteneciente al Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA TESTICULAR GENERADOS POR LA EXPOSICIÓN A 17- β -ESTRADIOL, ZEARALENONA Y BISFENOL-A DURANTE EL DESARROLLO DE RATÓN. ANÁLISIS POR MICROMATRICES (MICROARRAYS).

Lopez-Casas, P.P.; Paz, M.; Lopez-Fernandez, L.A.; Gonzalez, E.; Escolar, F.; del Mazo, J.
*Centro de investigaciones biológicas (CSIC),
 C) Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid*

Existen abundantes evidencias de que la exposición de los organismos a compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente provoca alteraciones génicas a distintos niveles. Los Disruptores Endocrinos (DEs), que actúan como desestabilizadores del equilibrio hormonal, poseen la potencialidad de generar cambios en la expresión génica dependiendo de la susceptibilidad del sistema genético. En este sentido, la espermatogénesis de mamíferos, como proceso de diferenciación celular altamente regulado por señales endocrinas, ha sido considerada como paradigma del efecto de los DEs.

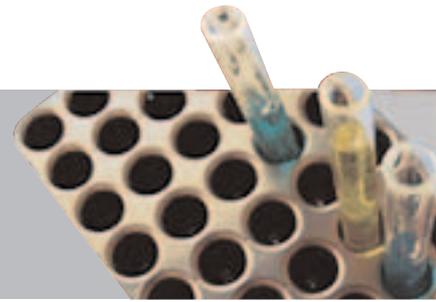
En este estudio hemos utilizado micromatrices de alta densidad, donde se halla representado el transcriptoma de ratón, para definir los patrones de expresión génica testicular de ratones expuestos a diferentes dosis de compuestos xeno-estrogénicos. Los compuestos analizados en este trabajo fueron: 17- β -Estradiol (E2), Zearalenona y Bisfenol-A.

Los animales fueron expuestos a los DEs siguiendo un protocolo definido: las madres estuvieron expuestas desde 2 semanas antes del apareamiento, la exposición se mantuvo durante toda la gestación y después del nacimiento de las crías hasta 4 semanas de vida. Tras 4 semanas, la descendencia masculina fue analizada. También fueron analizados animales sometidos a periodos de exposición más cortos. Para ello, se extrajo el RNA total de los testículos de los animales expuestos y de los controles. A partir de este RNA se generaron cDNAs que portaban el promotor T7. Esta estrategia permitió llevar a cabo la transcripción *in vitro* de los cDNAs mediante la T7-RNA-Polimerasa para amplificar los mensajeros originales. El RNA amplificado (aRNA) se utilizó como sustrato para incorporar los fluorocromos Cy3 y Cy5, siguiendo procedimientos estándar. Estas sondas se utilizaron en la hibridación de micromatrices impresas con 31.769 oligonucleótidos (70 bases) correspondientes a 24.878 genes conocidos o fruto de los programas de predicción génica.

Los resultados de expresión génica obtenidos tras la hibridación fueron analizados utilizando diferentes filtros estadísticos. Hemos observado que el número de genes cuya expresión está alterada se incrementa con exposiciones más largas y dosis mayores de E2. La exposición a E2 constituye el eje central de este análisis por erigirse como modelo de disrupción endocrina, puesto que es el ligando natural del receptor de estrógenos y, por tanto, el que activa la respuesta transcripcional. En general, también hemos encontrado una preponderancia de genes que se reprimen sobre genes que se inducen en los testículos expuestos a E2. Además, hemos comparado los perfiles de expresión resultantes de la exposición a E2 con aquellos obtenidos con Zearalenona y Bisfenol-A, hallando notables diferencias que sugieren modos de acción divergentes o, como mucho, solapantes.

Mediante esta metodología estamos identificando potenciales marcadores de desregulación génica por efecto de la exposición a EDs. Además, los resultados obtenidos en este trabajo ayudarán a definir las rutas moleculares involucradas en el efecto de los DEs sobre la expresión génica durante la espermatogénesis.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de la CE: QLK4-CT-2002-02403. "GENDISRUPT"



NIVELES SÉRICOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS CICLODIENOS EN UNA MUESTRA REPRESENTATIVA DE LA POBLACIÓN DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.

Luis D. Boada (1), Eva Álvarez-León (2), Manuel Zumbado (1), Octavio P. Luzardo (1), Muriel Goethals (1), Félix Cabrera (1), Guayarmina Hernández (1) y Lluís Serra-Majem (3)

*(1) Unidades de Toxicología y (3) Medicina Preventiva y Salud Pública. Departamento de Ciencias Clínicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. (2) Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Servicio Canario de Salud
Apdo. Correos 550. 35080 - Las Palmas de Gran Canaria*

Los plaguicidas organoclorados (OCs) son compuestos químicos muy liposolubles y altamente persistentes en el medio ambiente. Se acumulan en el tejido adiposo humano y permanecen inalterados durante décadas. Debido a su bajo coste y alta eficacia insecticida se usaron masivamente a partir de la década de 1940 hasta su prohibición, por su bioacumulación, biomagnificación y toxicidad, en los años 70-80 del pasado siglo. En el contexto de la Encuesta Nutricional de Canarias (ENCA, 1998) se evaluó la presencia de residuos de OCs en una muestra representativa de la población canaria (682 muestras de suero procedentes de habitantes del Archipiélago con edades comprendidas entre 6 y 75 años). Se evaluaron los niveles séricos de aldrín, dieldrín y endrín. Un elevado porcentaje de muestras presentaban niveles detectables de alguno de los OCs medidos, siendo el endrín el más frecuentemente detectado (72% de las muestras) y con concentraciones más elevadas (media = 136.72 ng/g grasa).

Las concentraciones medias encontradas en la población canaria para los derivados ciclodienos (aldrín, dieldrín y endrín) fueron más bajas (media = 6.69 ng/g grasa para dieldrín) que las descritas en otras poblaciones occidentales (media = 38.41 ng/g grasa de dieldrín para poblaciones danesas). En nuestro trabajo evaluamos si los niveles de residuos de OCs se relacionaban con condicionantes geográficos y/o sociodemográficos. Nuestros resultados mostraron que las poblaciones urbanas presentan niveles más elevados de dieldrín, mientras que las no urbanas presentan los niveles séricos más elevados de aldrín y endrín. Es de destacar que los valores séricos de aldrín y dieldrín eran más elevados en los estratos de población más joven; de tal modo que los individuos menores de 18 años presentaban casi el doble de niveles séricos de estos OCs ciclodienos si los comparamos con los individuos de edades entre 65 y 75 años. Estos resultados nos permiten concluir que la población del Archipiélago Canario ha estado y está expuesta a los OCs evaluados en este estudio. El tipo y la fuente de exposición parecen variar en función de la isla estudiada y el tipo de hábitat del individuo. La presencia de alimentos contaminados por estos OCs y/o la existencia de una importante contaminación ambiental podrían ser la causa de esta preocupante situación.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido subvencionado por los Proyectos de la Fundación Canaria de Investigación en Salud (FUNCIS) con referencias PI19/99 y PI76/04 y por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC) referencia 04/2004.



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

ANÁLISIS DE NONILFENOLES Y SUS DERIVADOS HALOGENADOS EN MUESTRAS AMBIENTALES

Carles Planas, Josep Caixach, Josep Rivera

*Laboratori d'Espectrometria de Masses (Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals - CSIC)
C/Jordi Girona 18-2608034-Barcelona*

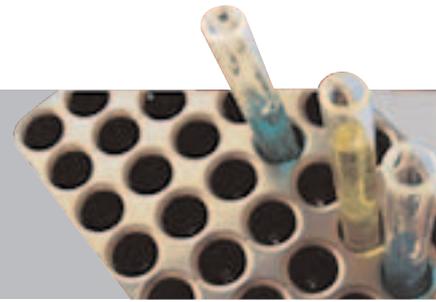
Los nonilfenoles polietoxilados (NPnEO) son detergentes no iónicos ampliamente utilizados en los ámbitos doméstico e industrial. En el medio ambiente estos compuestos dan lugar a productos de degradación más tóxicos y persistentes y clasificados como disruptores hormonales, tales como nonilfenol (NP), nonilfenol monoetoxilado (NP1EO), nonilfenol dietoxilado (NP2EO) y los ácidos nonilfenoxiacético (NP1EC) y nonilfenoxietoxiacético (NP2EC). En los procesos de cloración en plantas depuradoras o potabilizadoras se ha observado la formación de derivados clorados y bromados de estos compuestos, que presentan también actividad estrogénica.

Los metabolitos de NPnEO mencionados (halogenados y no halogenados) se han analizado por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en modo de ionización Electrospray (LC/ESI-MS). Sin embargo, debido a su dificultad de ionización, el análisis por GC/MS ha resultado ser la técnica más adecuada para su identificación y cuantificación en muestras ambientales.

En el presente trabajo se ha investigado la presencia de estos compuestos en 5 fangos de una planta potabilizadora (2 tomados a la entrada de la planta de fangos y 3 después de atomizar), 4 sedimentos de depósito de agua potabilizada y 2 sedimentos de río. Las muestras se analizaron por GC/MS, previa extracción por ultrasonidos con diclorometano y purificación con columna de sílica. Se utilizó el método de la dilución isotópica, con el uso de patrones internos marcados (d8-NP y 13C6-NP1EO).

Los compuestos NP y NP1EO se detectaron en todas las muestras analizadas, dándose las concentraciones máximas en un sedimento de depósito (19.915 µg/g de NP) y en un sedimento de río (6.040 µg/g de NP1EO). Por otra parte, los derivados halogenados (ClNP, BrNP, Cl₂NP, ClBrNP, Br₂NP y BrNP1EO) se detectaron en 4 fangos de planta potabilizadora y 2 sedimentos de depósito, hallándose las concentraciones más altas en un sedimento de depósito y comprendidas entre 2.24 µg/g de BrNP1EO y 8.86 µg/g de Br₂NP.

Los autores agradecen a la "Agència Catalana de l'Aigua" y a las empresas "Aigües de Girona, Salti Sarrià de Ter" y AGBAR, S.A. el suministro de las muestras y el soporte financiero del estudio realizado.



VINEXINA: FUNCIÓN EN ESPERMATOGÉNESIS Y ALTERACIONES DE SU EXPRESIÓN POR EXPOSICIÓN A 17-BETA-ESTRADIOL

María Paz, Pedro Pablo López-Casas, Jesús del Mazo

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

C) Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

Durante la espermatogénesis de mamíferos, en el epitelio seminífero se establecen diferentes tipos de interacciones entre las células de Sertoli y las células germinales, claves en el proceso de diferenciación de los espermatozoides. En ellas participan proteínas especializadas en adhesión y comunicación celular. Se ha sugerido que uno de los efectos de la exposición a disruptores endocrinos es la alteración de las interacciones entre células de Sertoli y células de Sertoli-células germinales.

En trabajos previos, describimos que flotilina-1 (flo-1), una proteína localizada en balsas lipídicas (especializaciones de la membrana plasmática), está relacionada con el establecimiento de interacciones celulares (López-Casas and del Mazo, FEBS Lett., 2003, 555, 2). Se ha demostrado que flo-1 puede interactuar con vinexina (vnx), una proteína adaptadora implicada en la regulación de la adhesión celular a través de su unión a vinculina (vnc). Vinexina, además, regula la fosforilación y actividad del receptor de estrógenos alfa.

En este contexto, el presente trabajo se planteó con el objetivo de caracterizar la expresión de vnx, flo-1 y vnc durante el desarrollo del testículo de ratón, para, consecuentemente, valorar los posibles cambios en el patrón de expresión de estos genes en el testículo de ratones expuestos a 17-beta-estradiol (E2).

Hasta hoy, se han descrito tres formas de vinexina (alfa, beta y gamma) en humanos. En nuestro laboratorio, mediante RT-PCR y Northern blot hemos detectado en testículo de ratón las formas alfa y gamma, además de una nueva forma de vinexina, vnx-t. Resultados preliminares apuntan a que esta nueva forma es específica de testículo.

El análisis mediante RT-PCR y Western blot mostró una disminución en los niveles de vnx-gamma durante el desarrollo postnatal del testículo, en consonancia con la disminución de las proteínas flo-1 y vnc. Esta disminución coincide con la reducción de la población relativa de células de Sertoli durante el desarrollo, lo que sugería la posible localización de estas proteínas en dichas células. El análisis de cultivos primarios de células de Sertoli y de subpoblaciones de células germinales, confirmó que estas proteínas se acumulan en células de Sertoli. Es interesante destacar que las formas alfa y t de vnx sólo se detectan en espermátidas.

Evaluamos el efecto sobre las tres proteínas objeto de estudio tras la exposición a E2. No observamos ninguna variación significativa en los niveles de flo-1 y vnc en el testículo. Sin embargo, el E2 provocó la desaparición de una de las formas de vnx asociada a espermátidas, que inicialmente consideramos como la forma t testículo-específica.

Los avances en el estudio de este fenómeno podrán arrojar luz sobre uno de los mecanismos de acción del E2 y de otros disruptores endocrinos en la espermatogénesis, a nivel de interacciones celulares.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de la CE: QLK4-CT-2002-02403 (GENDISRUPT)



VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

UNA DÉCADA DE SEGUIMIENTO DE LA DISRUPCIÓN ENDOCRINA EN GALICIA: IMPOSEX

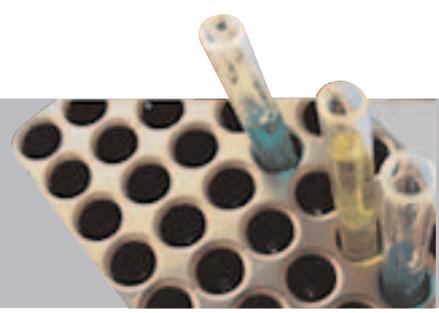
Quintela Sánchez, María; Couceiro López, Lucía; Ruiz de la Rosa, José Miguel; Barreiro Lozano, Rodolfo
Área de Ecoloxía, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña
Campus da Zapateira S/N, 15071 A Coruña

El imposex, i.e. superimposición de caracteres sexuales masculinos sobre las hembras de gasterópodos marinos, es el ejemplo más consistente de disrupción endocrina con efectos sobre las poblaciones. Se produce en respuesta a la contaminación por tributilo de estaño o TBT, un biocida usado en pinturas anti-fouling. La manifestación más extrema registrada en algunas especies consiste en la esterilización funcional de las hembras, con el consiguiente declive de las poblaciones.

En la última década, nuestro grupo ha realizado un seguimiento de la contaminación por TBT empleando dos especies bioindicadoras: *Nucella lapillus* y *Nassarius reticulatus*. En ambas se registró un descenso medio de bioacumulación de TBT de 150 ng Sn/g PS en más del 80% de las localidades; tendencia que concuerda con la experimentada en otras zonas costeras europeas, Australia y Canadá. Los índices de imposex también decrecieron en ambas especies. Es reseñable, desde el punto de vista de la pervivencia de las poblaciones, la caída de la esterilidad funcional femenina en *N. lapillus* que se registró en el 81% de los puntos de muestreo.

El uso del TBT está prohibido en España desde el año 1990 para barcos de eslora inferior a 25 metros y nuestros resultados revelan que la contaminación por TBT está experimentando una tendencia decreciente en los últimos años. Sin embargo, la presencia del TBT no sólo sigue siendo detectable en toda la costa gallega 15 años después, sino que en ciertos puntos existe en concentraciones lo suficientemente altas como para provocar un efecto severo sobre las poblaciones de gasterópodos. Este hecho revela que, desde que el uso de un determinado compuesto se regula y/o prohíbe hasta que sus efectos desaparecen del medio ambiente, puede transcurrir un período de tiempo prolongado.

El apoyo financiero para este trabajo fue proporcionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (referencia CTM2001-00899), parcialmente sufragado por FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional), Xunta de Galicia (referencia PGIDT01MAM10301PR) y la Universidade da Coruña.



A Coruña, 27 e 28 de outubro de 2005 Reitoría da
Universidade da Coruña

VII CONDE



A Coruña 2005

VII CONFERENCIA SOBRE DISRUPTORES ENDOCRINOS

NOTAS

A series of horizontal dotted lines for taking notes, spanning the width of the page.

