



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Evaluación *in vitro* de la Inducción Proliferativa de
Organoclorados y de sus Mezclas,
mediante la Aplicación del Ensayo E-screen

D^a María Paz Aldeguer Aldeguer

2018



D. Antonio Juan García Fernández, Catedrático de Universidad del Área de Toxicología en el Departamento de Ciencias Sociosanitarias, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INDUCCIÓN PROLIFERATIVA DE ORGANOCORADOS Y DE SUS MEZCLAS, MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL ENSAYO E-SCREEN", realizada por D^a. María Paz Aldeguer Aldeguer, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 3 de Mayo de 2018

GARCIA
FERNANDEZ
ANTONIO JUAN
- 22948896W

Firmado digitalmente por GARCIA
FERNANDEZ ANTONIO JUAN -
22948896W

Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=22948896W,

sn=GARCIA FERNANDEZ,
givenName=ANTONIO JUAN,
cn=GARCIA FERNANDEZ ANTONIO
JUAN - 22948896W

Fecha: 2018.05.03 13:36:50 +02'00'



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Emma Martínez López, Profesora Titular de Universidad del Área de Toxicología en el Departamento de Ciencias Sociosanitarias, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INDUCCIÓN PROLIFERATIVA DE ORGANOCLORADOS Y DE SUS MEZCLAS, MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL ENSAYO E-SCREEN", realizada por D^a. María Paz Aldeguer Aldeguer, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 3 de Mayo de 2018

A mi familia.

A Aida Salas.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	- 1 -
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTADO DE ACRÓNIMOS	ix
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN, ESTRUCTURA Y CONTENIDO	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO. PARTE I: CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES	5
1. CONTAMINANTES AMBIENTALES	7
2. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES	15
3. COMPUESTOS ORGANOCORADOS OBJETO DE ESTUDIO	18
PARTE II: SISTEMA ENDOCRINO Y DISRUPTORES ENDOCRINOS	29
1. SISTEMA ENDOCRINO	31
1.1. RECEPTORES ESTROGÉNICOS	34
1.2. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA	36
1.3. PRINCIPALES ISOTIPOS DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS	39
1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS	43
1.5. REACCIONES CRUZADAS DE LA SEÑAL ESTROGÉNICA	44
2. MECANISMOS DE ACCIÓN RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN ENDOCRINA	46
2.1. FACTORES A TENER EN CUENTA EN LA RESPUESTA ESTROGÉNICA	47
2.2. PARTICULARIDADES DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS	48
3. ANOMALÍAS ASOCIADAS A DISRUPTORES ENDOCRINOS	49
3.1. EN EL SER HUMANO	51
3.2. EN LA FAUNA SILVESTRE	53
4. INTERACCIÓN DE LOS ORGANOCORADOS EN LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA	61
4.1. DIFENILALIFÁTICOS	62
4.2. CICLODIÉNICOS	63
4.3. HEXACLOROCICLOHEXANOS	64
4.4. BIFENILOS POLICLORADOS	65
5. RELACIÓN CAUSA-EFECTO	66

5.1 E-SCREEN COMO HERRAMIENTA PARA VALORAR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA	69
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO	83
2. COMPUESTOS A EVALUAR	83
3. LÍNEA CELULAR MCF-7	86
4. ANÁLISIS PREVIOS AL <i>E-SCREEN</i>	91
4.1. DENSIDAD CELULAR Y CONTROL POSITIVO (17 β -ESTRADIOL)	91
4.2 EFECTO DEL DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)	93
4.3. OSMOLARIDAD DEL MEDIO DE EXPOSICIÓN.	94
5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR <i>E-SCREEN</i>	95
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA <i>E-SCREEN</i>	95
5.2. DISEÑO DE LAS PLACAS DE MICROTITULACIÓN PARA LA APLICACIÓN DEL <i>E-SCREEN</i>	96
5.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA <i>E-SCREEN</i> .	97
5.4 TINCIÓN CON SULFORHODAMINA B: VALORACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	97
4. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS	100
6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	100
6.2. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS	101
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
PARTE I. ANÁLISIS PREVIOS	103
1. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO.	105
2. DENSIDAD CELULAR EN EL ENSAYO <i>E-SCREEN</i> Y CONCENTRACIÓN DEL CONTROL POSITIVO	105
3. EFECTO DEL DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) EN EL ENSAYO <i>E-SCREEN</i>	107
4. OSMOLARIDAD DE MEDIOS DE EXPOSICIÓN	109
PARTE II. EFECTO PROLIFERATIVO INDUCIDO POR COMPUESTOS ORGANOCORADOS	111
1. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO	113
2. COMPUESTOS DIFENILALIFÁTICOS	114
2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	114
2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS COMPUESTOS DIFENILALIFÁTICOS	117

2. COMPUESTOS CICLODIÉNICOS	119
2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	119
2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS COMPUESTOS CICLODIÉNICOS	124
3. COMPUESTOS HEXACLOROCICLOHEXANOS (HCH)	130
3.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	130
3.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS HEXACLOROCICLOHEXANOS	131
4. COMPUESTOS BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)	133
4.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	133
4.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS PCB	136
RESUMEN DE RESULTADOS EN CONJUNTO	137
 PARTE III. DISCUSIÓN DE EFECTOS PROLIFERATIVOS INDUCIDOS POR COMPUESTOS	
ORGANOCOLORADOS	141
1. INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO	143
2. DISCUSIÓN DE LOS GRUPOS QUÍMICOS EVALUADOS.	144
2.1. DIFENILALIFÁTICOS	144
2.2. CICLODIÉNICOS	146
2.3. HEXACLOROCICLOHEXANOS (HCH): LINDANO O γ -HCH Y LINDANO TÉCNICO	152
2.4. BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)	153
3. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS DE LOS ORGANOCOLORADOS	156
 PARTE IV. EFECTO PROLIFERATIVO INDUCIDO POR MEZCLAS DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS	
1. INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO	163
2. EFECTO DE LAS MEZCLAS BINARIAS	165
2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	165
2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS MEZCLAS BINARIAS	168
3. MEZCLAS TERNARIAS	169
3.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	169
3.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS MEZCLAS TERNARIAS	170
4. MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA.	172
4.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	172
4.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LA MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA	174
5. ESTROGENICIDAD DE LAS MEZCLAS FRENTE A SUS COMPONENTES	175
5.1. MEZCLAS BINARIAS	175

5.2. MEZCLAS TERNARIAS _____	182
5.3. MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA _____	185
6. ANÁLISIS GLOBAL DE LAS MEZCLAS Y DE SUS COMPONENTES _____	188
PARTE V. DISCUSIÓN DE LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS INDUCIDOS POR MEZCLAS DE	
COMPUESTOS ORGANOCLORADOS _____	
1. INCONVENIENTES EN LA PREDICCIÓN DEL EFECTO DE MEZCLAS _____	210
2. ¿PREDICCIÓN DEL EFECTO DE LAS MEZCLAS? _____	218
3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS INDIVIDUALES Y SUS MEZCLAS EN CONJUNTO _____	222
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES _____	225
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	229
RESUMEN _____	- 1 -
ANEXO. RELACIÓN DE GRÁFICAS Y TABLAS MÁS RELEVANTES _____	- 7 -
AGRADECIMIENTOS _____	- 23 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los bifenilos policlorados	27
Figura 2. Representación de la estructura de los receptores nucleares.	35
Figura 3 Mecanismo de acción de la función estrogénica.	37
Figura 4. Ensayos a emplear en función del nivel de mecanismo de acción estudiado.	38
Figura 5. Aparición de tubérculos nupciales en ciprínidos (<i>Streptopelia promelas</i>) tras la exposición a metiltestosterona.	59
Figura 6. Imposex en <i>Buccinum undatum</i> (genitales masculinos y femeninos)	61
Figura 7. Declive poblacional de especies a nivel mundial	67
Figura 8. Material de trabajo en el interior de la cabina de flujo laminar vertical.	87
Figura 9. Crecimiento típico de la línea celular MCF-7	87
Figura 10. Mantenimiento del cultivo celular MCF-7	88
Figura 11. Esquematización del manejo rutinario de la línea	89
Figura 12. Representación de recuento celular en hemocitómetro (cámara de Neubauer)	90
Figura 13. Contador automático de células TC10TM™ BioRad.	90
Figura 14. Crecimiento de la línea celular MCF7	92
Figura 15.. Osmómetro Vapro© 5520 (Wescor)	94
Figura 16. Diseño de la placa de 96 pocillos.	96
Figura 17. Tinción de cultivo MCF-7 con sulforhodamina B	98
Figura 18. Esquematización de la técnica <i>E-Screen</i>	98
Figura 19. Niveles de absorbancia de las concentraciones ensayadas de estradiol (E2).	106
Figura 20. Efecto de los porcentajes de DMSO presentes en los medios de exposición de los compuestos	108
Figura 21. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de <i>p,p'</i> -DDT en el ensayo <i>E-Screen</i> .	114
Figura 22. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de <i>p,p'</i> -DDE en el ensayo <i>E-Screen</i> .	115
Figura 23. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de <i>p,p'</i> -DDD en el ensayo <i>E-Screen</i>	116
Figura 24. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de dicofol en el ensayo <i>E-Screen</i> .	117

Figura 25. Efecto proliferativo relativo (RPE) de los difenilalifáticos	118
Figura 26. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de aldrín en el ensayo <i>E-Screen</i>	119
Figura 27. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de dieldrín en el ensayo <i>E-Screen</i> .	120
Figura 28. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endrín en el ensayo <i>E-Screen</i> .	121
Figura 29. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endrín aldehído en el ensayo <i>E-Screen</i> .	121
Figura 30. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endosulfán α,β en el ensayo <i>E-Screen</i>	122
Figura 31. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endosulfán sulfato en el ensayo <i>E-Screen</i> .	123
Figura 32. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de heptacloro en el ensayo <i>E-Screen</i>	123
Figura 33. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de heptacloro epóxido en el ensayo <i>E-Screen</i> .	124
Figura 34. Efecto proliferativo relativo (RPE) del aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán $\alpha\beta$	126
Figura 35. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) de endosulfán sulfato y endrín aldehído	127
Figura 36. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) aldrín y dieldrín.	127
Figura 37. Efecto Proliferativo Relativo del Endrín y Endrín aldehído	128
Figura 38 .Efecto Proliferativo Relativo (RPE) de endosulfán $\alpha\beta$ y endosulfán sulfato	129
Figura 39. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) del heptacloro y heptacloro exoepóxido	130
Figura 40. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de lindano en el ensayo <i>E-Screen</i>	130
Figura 41. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de lindano técnico en el ensayo <i>E-Screen</i> .	131
Figura 42 . Efecto Proliferativo relativo (RPE) de hexaclorociclohexanos	132
Figura 43 . Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#153 en el ensayo <i>E-Screen</i>	133
Figura 44. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#118 en el ensayo <i>E-Screen</i>	134

Figura 45. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#180 en el ensayo <i>E-Screen</i>	135
Figura 46 .Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PB#126 en el ensayo <i>E-Screen</i> .	135
Figura 47 . Efecto proliferativo Relativo de PCB# 118, PCB# 153, PCB# 180 y PCB# 126	137
Figura 48. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo de los compuestos testados individualmente	138
Figura 49. Frecuencia de aparición de las concentraciones que desencadenan el RPE máximo en los compuestos evaluados individualmente.	139
Figura 50. Esquematación del nivel de proliferación de los compuestos ciclodiénicos, teniendo en cuenta el orden de aparición de los productos de degradación y su aparición en el mercado.	148
Figura 51. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB d/d/ # (# <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> -DDE; 50:50)	165
Figura 52. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB c/d/1# (# endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDE; 75:25)	166
Figura 53. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB c/d/2 # (# endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDT; 75:25)	167
Figura 54 . Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB h/c/# (# Lindano técnico + endosulfán $\alpha\beta$; 50:50).	167
Figura 55 . Niveles de absorbancia de la mezcla ternaria MT c/d/d/ # (# endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE; 75:12,5:12,5).	169
Figura 56. Niveles de absorbancia de la mezcla ternaria MT h/d/d/# (# lindano técnico + <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> -DDE; 75:12,5:12,5).	170
Figura 57 .Niveles de absorbancia de la mezcla cuaternaria MC c/c/d/d/ # (# aldrín+ dieldrín + <i>p, p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE; 25:25:25:25).	172
Figura 58. Niveles de absorbancia de la mezcla senaria MS c/c/c/d/d/h/ # (#Endosulfan $\alpha\beta$ + Aldrin + Dieldrín + <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> -DDE + Lindano técnico; 50:12,5:12,5:6,25:6,25;12,5).	173
Figura 59. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) de la mezcla binaria MB d/d/ # (# <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> -DDE) y de sus integrantes, en base logarítmica.	177

Figura 60 . Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la mezcla binaria MB c/d/1# (# endosulfan $\alpha\beta$ + p,p' -DDE) y en sus integrantes, en base logarítmica	179
Figura 61. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla binaria MB c/d/2/# (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT) y de sus integrantes, en base logarítmica	180
Figura 62. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la MB c/d/2/ # (# lindano técnico + endosulfán $\alpha\beta$ y en sus integrantes, en base logarítmica.	181
Figura 63 . Efecto Proliferativo Relativo de las mezclas ternarias ensayadas.	182
Figura 64. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla ternaria (MT c/d/d/ # (#endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT + p,p' -DDE) y de sus componentes	183
Figura 65. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados para la mezcla ternaria MT h/d/d/ # (# Lindano técnico + p,p' -DDT+ p,p' -DDE) y de sus componentes	184
Figura 66. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados para la mezcla cuaternaria MC c/c/d/d/# (#aldrín + dieldrín+ p,p' -DDT+ p,p' -DDE) y de sus componentes	186
Figura 67. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) de la mezcla senaria MS c/c/d/d//h/ # (#Endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + Dieldrín + p,p' -DDT + p,p' -DDE + lindano técnico) y de sus componentes.	187
Figura 68. Efecto Proliferativo Relativo de las mezclas evaluadas	189
Figura 69. Frecuencia de las concentraciones responsables del máximo Efecto Proliferativo Relativo en las mezclas	190
Figura 70. Frecuencia de las concentraciones responsables del máximo Efecto Proliferativo Relativo en los ensayos de los OC por individualizado y en los ensayos de las mezclas(*)	190
Figura 71. Comportamiento estrogénico de cada grupo químico y sus mezclas con respecto al total de análisis	191

Figura 72. Presentación de los OC y sus mezclas en orden creciente según el Efecto Proliferativo Relativo máximo (en valor medio), coloreados según su carácter débil, parcial o fuertemente estrogénicos.	192
Figura 73. Conjunto de compuestos con curvas dosis-respuesta similares (a)	197
Figura 74. Conjunto de compuestos con curvas dosis-respuesta similares (b)	198
Figura 75. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas débilmente/fuertemente estrogénicas	203
Figura 76. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas parcialmente estrogénicas.	205
Figura 77. Ejemplos de dos tipos de curva dosis-respuesta monotónicos	212
Figura 78. Representación de hormesis. Adaptado de Ecobichon, 2005.	213
Figura 79. Fluctuaciones del sentido de la respuesta de la MB h/c/	214
Figura 80. Mecanismo de relación NMDR inducido por pluralidad de receptores (Lagarde <i>et al.</i> 2015, con permiso del autor)	215
Figura 81. Mecanismo de relación NMDR inducido por insensibilización de receptores (Lagarde <i>et al.</i> 2015, con permiso del autor)	216
Figura 82. Mecanismo de relación NMDR inducido por efecto metabólico (Lagarde <i>et al.</i> 2015, con permiso del autor)	216
Figura 83. Mecanismo de relación NMDR inducido por combinación de ligandos (Lagarde <i>et al.</i> 2015, con permiso del autor)	217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. COP y otras sustancias incluidas en el Convenio de Estocolmo, Reglamento (CE) n 850/2004.....	12
Tabla 2. Funciones de las principales hormonas secretadas por las glándulas endocrinas	32
Tabla 3. Estructura y función de los receptores estrogénicos.	34
Tabla 4. Isoformas y funciones destacadas de los ER α más relevantes.	40
Tabla 5. Isoformas y funciones destacadas de los ER β más relevantes.....	42
Tabla 6. Localización de ER α en el ser humano	44
Tabla 7. Listado de Test, ensayos y guías para la evaluación toxicológica de disrupción endocrina en mamíferos y no mamíferos.....	69
Tabla 8. Organoclorados y controles empleados en el ensayo <i>E-Screen</i>	84
Tabla 9. Composición y rango de concentraciones de mezclas evaluadas.....	86
Tabla 10. Volúmenes de suspensión celular requeridos en función del tipo o de pase celular	91
Tabla 11. Composición de medios de cultivo celular empleados	95
Tabla 12. Relación de controles presentes en cada placa de 96 pocillos	96
Tabla 13. Media del Efecto Proliferativo (EP), desviación estándar y mediana de las concentraciones testadas de Estradiol.	106
Tabla 14. Datos de osmolaridad de los medios de cultivo empleados.....	109
Tabla 15. Compuestos analizados por individualizado	113
Tabla 16. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo, su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de difenilalifáticos ensayada.....	117
Tabla 17. Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE), su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de compuestos ciclodiénicos ensayada.	125
Tabla 18. Hexaclorociclohexanos: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE), su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) ensayada.....	132
Tabla 19. Valores del Efecto Proliferativo Relativo, su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de bifenilos policlorados (PCB) ensayada.....	136
Tabla 20. Clasificación de la potencia estrogénica de los OC evaluados por independiente.	138
Tabla 21. Carácter estrogénico de cada grupo químico estudiado en porcentaje	139

Tabla 22. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo, Efecto Proliferativo y concentración efectiva molar de cada organoclorado.	157
Tabla 23. Compuestos con efecto contrapuesto en función de la concentración evaluada y concentración a la que aparecieron	158
Tabla 24. Diseño de las mezclas sometidas al <i>E-Screen</i>	164
Tabla 25. Mezclas binarias: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración analizada.....	168
Tabla 26. Mezclas ternarias: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración.....	171
Tabla 27. Mezclas cuaternaria y senaria: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración.	174
Tabla 28. Mezclas binarias: Valores y clasificación del efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) máximo) y RPE mínimo, concentración a la que aparecen, molaridad de cada OC en dicha disolución (todo ello en porcentaje) y su grupo químico.	175
Tabla 29. Mezcla binaria MB d/d/ # (# p,p'-DDT+ p,p'-DDE): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.....	176
Tabla 30. MB c/d/1/: Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.....	178
Tabla 31. MB c/d/2/ # (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.....	179
Tabla 32. MT c/d/d/ # (#endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT + p,p'-DDE): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.....	183
Tabla 33. MT h/d/d/ # (#Lindano técnico + p,p'-DDT+ p, p'-DDE.) Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE (en porcentaje) de sus integrantes, a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.....	184

Tabla 34. MC c/c/d/d/: Valor del efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) máximo de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.	185
Tabla 35. MS c/c/c/d/d/h/, Mezcla senaria: Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.	187
Tabla 36. Valores del máximo Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) y su concentración responsable para cada mezcla analizada.....	188
Tabla 37. Relación del valor máximo de efecto proliferativo relativo de cada compuesto/mezcla y la concentración asociada a dicho efecto	199
Tabla 38. Resumen del efecto de cada mezcla evaluada.....	202

LISTADO DE ACRÓNIMOS

- Ah:** Receptores Androgénicos
- AhR:** Receptor arilo-hidrocarbano
- ATTC:** American Type Culture Collection (ATCC)
- CE:** Comunidad Europea
- CN:** Control Negativo
- CO₂:** Dióxido de Carbono
- COP:** Contaminante Orgánico Persistente
- CP:** Control Positivo
- CYP:** *Cytochrome Pigment 450*
- DDD:** Diclorodifenil dicloroetano
- DDE:** Diclorodifenil dicloroetileno
- DDT:** Diclorodifenil tricloroetano
- DE:** Disruptores endocrinos
- DL50:** Dosis letal 50
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- D-R:** Dosis respuesta
- DRNM:** Dosis respuesta no monotónica
- EAS:** Endocrine Active Substances
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EFSA:** European Food Safety Authority
- EGF:** Epidermal Growth Factor
- EMEM:** Earle's Minimum Essential Medium
- EPA:** Environmental Protection Agency
- HCH:** Hexaclorociclohexano
- IC50:** Concentración inhibitoria 50
- ICCVAM:** Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
- IPCS:** International Programme on Chemical Safety
- IARC:** Agencia Internacional para la investigación del cáncer
- MTT:** (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

NOEL: No observed effect level

PCB: Bifenil policlorado

PIB: Producto interior bruto

T4: Tiroxina

RF: Rojo fenol

ROS: Reactive Oxygen Species

Rpm: Revoluciones por minuto

SFB-CD: Suero fetal bovino Charcoal Dextran

UNEP: United Nations Environment Programme

WHO: World Health Organisation (Organización mundial de la salud)

**CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN,
ESTRUCTURA Y CONTENIDO**

Esta tesis doctoral se estructura en seis capítulos y, en aquellos casos en los que se ha considerado oportuno, se han dividido en varias partes con el fin de organizar la información de cada bloque temático.

Así, en este primer capítulo, se describe la estructura del trabajo, mientras que el capítulo II está dedicado al “Marco teórico”. Éste se divide a su vez en una primera parte (referente a contaminantes orgánicos persistentes), y una segunda parte que reúne la información acerca del sistema endocrino y disruptores endocrinos. El capítulo III hace referencia a la “Justificación, hipótesis y objetivos” del presente estudio, siendo el capítulo IV el encargado de describir los materiales y la metodología para llevarlos a cabo.

El capítulo V es un gran bloque en el que se exponen los resultados y la discusión, tanto de los análisis previos requeridos (Parte I), los resultados del efecto proliferativo inducido por compuestos organoclorados (Parte II) y la discusión de éstos (Parte III). Asimismo, en la parte IV se detallan los resultados del efecto proliferativo inducido por mezclas de compuestos organoclorados, y en la parte V, su discusión. Al final de cada una de las partes del capítulo V, se aporta una visión globalizada que permite obtener una perspectiva conjunta de la información de cada apartado, necesaria para poder obtener datos que, de otra manera, pasarían inadvertidos. Por ello, con el último apartado del capítulo se pretende evidenciar aquellos aspectos propios de los análisis individualizados que repercuten en el resultado de las mezclas y, por tanto, son necesarios destacar para poder comprender adecuadamente la discusión de las mezclas.

Finalmente, se expone el capítulo VI, donde se enumeran las conclusiones finales del trabajo, para finalizar con las referencias bibliográficas, un resumen y abstract del trabajo, y un anexo de gráficas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

PARTE I. CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES

1. CONTAMINANTES AMBIENTALES

El nivel actual de desarrollo en los países económicamente más avanzados se ha producido, en gran medida, a raíz de la revolución industrial a mediados del siglo XVIII y de la revolución verde en 1960. A partir de ambos acontecimientos, se incrementó la síntesis y liberación de sustancias químicas al ecosistema, procedentes de actividades energéticas, procesos de producción y transformación de metales, industria mineral y química, de la gestión de residuos, actividades agropecuarias e industria papelera entre otros procesos. En la actualidad, estos nuevos compuestos están presentes en todos los ámbitos de las sociedades desarrolladas haciéndose imprescindibles en el día a día: desde la elaboración de cualquier producto de limpieza hasta la fabricación de envases alimentarios. Alimentos que, por otra parte, suelen producirse empleando fitosanitarios para el control de roedores, plagas de insectos y hongos, así como fármacos veterinarios empleados en la producción animal. Huelga recordar que el uso de dichos fitosanitarios, ha posibilitado incrementar la producción agropecuaria, favoreciendo el ritmo de crecimiento demográfico, muy superior a la tendencia previa a la aparición de los mismos (Mnif *et al.*, 2011).

El primer periodo de la etapa del auge de síntesis de nuevas moléculas se produjo sin un control adecuado, provocando, en ocasiones, importantes accidentes medioambientales por vertidos sólidos, líquidos y por emisiones atmosféricas. Además, los estudios ecotoxicológicos no siempre contenían una información adecuada que garantizara su seguridad, en aquellos casos en los que existiera (Sigman *et al.*, 2001). La lluvia ácida, la explosión de la fábrica de pesticidas en Bhopal en 1982, o la contaminación de la bahía de Minamata en Japón por elevados niveles de mercurio, son tan sólo algunos ejemplos. Con el transcurso de los años se han evidenciado los efectos nocivos de muchas sustancias, lo que ha supuesto, en no pocas ocasiones, la restricción de su uso o la retirada total del mercado. Tal es el caso del conocido insecticida DDT (1, 1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano), por el que concedieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología a Paul Hermann Müller en 1948, al descubrir sus propiedades insecticidas. El DDT resultó muy eficaz para la erradicación de plagas de insectos forestales y de cultivos, constituyendo una herramienta fundamental en el control de vectores transmisores de enfermedades como la malaria y el tifus. Sin embargo, tras ser ampliamente utilizado durante años, aparecieron los efectos deletéreos

en aves y peces. No obstante, existe controversia entre la comunidad científica respecto a la relación directa entre la exposición de DDT y su metabolito DDE, con el desarrollo de cierto tipo de tumores, al carecer de suficientes estudios *in vivo* con animales y/o datos epidemiológicos que permitan confirmar tal vinculación (ATSDR, 2002). En cualquier caso, a raíz de los efectos indeseables detectados se prohibió la comercialización y uso del DDT en España en 1986 (Orden de 28 de febrero de 1986 relativa a la prohibición de la comercialización y utilización de productos fitosanitarios que contienen ciertas sustancias activas). La prohibición en el resto de Europa se produjo años antes, por medio de la Directiva 83/131/CEE que modifica el anexo de la Directiva 79/117/CEE. Sin embargo, se permitió su uso como intermediario en la síntesis de dicofol en Bélgica, Francia, Portugal y España hasta 2013, aunque dicha exención dejó de considerarse cuando la única fábrica que sintetizaba dicofol, ubicada en territorio español, cerró en 2006 (MAGRAMA, 2013). Sin embargo, en aquellos países en los que el DDT se permite con fines de salud pública en campañas frente la malaria, al parecer, se está redirigiendo con fines agrícolas, a pesar de que este uso está prohibido (www.fao.org, web visitada el 15/09/2017).

Aunque para la sociedad en general son más conocidos los efectos adversos por exposiciones agudas a compuestos tóxicos, no son menos importantes los efectos crónicos, los cuales pueden manifestarse con signos muy diversos e inespecíficos. Debido a este tipo de efectos adversos, muchos compuestos se han prohibido en los últimos años, como ya se ha indicado. Sin embargo, también se producen efectos indeseables por las sustancias de curso legal. En fauna silvestre se han descrito, por ejemplo, fenómenos de intersexos en peces, provocados por los anticonceptivos orales presentes en aguas residuales, o el imposex en gasterópodos, causado por el tributil estaño (Horiguchi *et al.*, 2006).

Ante estas y otras evidencias, durante las últimas décadas la comunidad científica ha dedicado muchos esfuerzos por investigar el efecto de los compuestos químicos sobre los ecosistemas y el ser humano. Paralelamente, la sociedad se ha ido sensibilizando con la problemática, incrementado el nivel de exigencia para con los gobiernos, demandando mayor información y control sobre la síntesis de productos químicos. Ambas vertientes, científico y social, ha propiciado la redacción de instrumentos legales por parte de las autoridades europeas y estatales.

A partir de 1967, la Comunidad Europea comenzó a adoptar medidas encaminadas a controlar las sustancias químicas comercializadas dentro del territorio Comunitario, centrandose en la clasificación, etiquetado y control de aquellas sustancias catalogadas como peligrosas (Directiva 67/548/CEE, modificada por el Reglamento 944/2013 de la Comisión, 2013). Sin embargo, en 1979 se optó por establecer un sistema de ensayo y notificación para aquellos compuestos que estaban en circulación hasta la fecha. Este giro en la gestión implicó, por un lado, realizar un registro de las sustancias químicas en uso. Por otro lado, supuso que toda sustancia que se pretendiera comercializar a partir del 17 de septiembre de 1981, debía notificarse a las autoridades competentes del país, como se indicaba en la Directiva 79/831/CEE con el Protocolo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, del Convenio de Ginebra de 1979, adoptado en Aarhus (Dinamarca) en 1998 (Baraibar-Fentanes *et al.*, 2009).

Con el paso de los años se ha legislado en favor de un control exhaustivo de toda actividad humana en el que estén implicados los compuestos químicos. En este sentido, cabe destacar la elaboración de un importante paquete de medidas enmarcadas en el Reglamento europeo (CE nº 1907/2006) relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*). Este Reglamento es conocido por sus siglas en inglés como *REACH*, aprobado el 18 de diciembre de 2006 y que entró en vigor el 1 de junio de 2007. Como novedad, se introdujo la necesidad de registrar todas las sustancias comercializadas dentro de la Unión Europea. Así, para que una sustancia pueda ser registrada, previamente se deben cumplir los requisitos para su autorización, que correrán a cargo de las Industrias, intermediarios y usuarios.

Gran parte de la normativa reciente emana de tres Convenios que han sentado las bases para la redacción de muchos instrumentos legales. El Convenio de Basilea, adoptado en 1989, para la eliminación y el transporte transfronterizo de residuos peligrosos (Decisión 93/98/CEE sustituido por el Reglamento (CE) nº1013/2006), el Convenio de Rotterdam aprobado en 1998 sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional (Decisión 2006/730/CE y Reglamento (UE) nº 649/2012), y el Convenio de

Estocolmo aprobado en 2001, sobre contaminantes orgánicos persistentes (Decisión 2006/507/CE).

Cronológicamente, gracias a los tres Convenios citados desde 1989 hasta 2001, se ha evolucionado notoriamente en el control de las sustancias químicas y contaminantes en territorio europeo, con el fin último de la protección de la salud humana y medioambiental. El Convenio de Basilea se centró en el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, para reducir el volumen de los intercambios de residuos entre países (Convenio de Basilea, 22 de marzo de 1989). Posteriormente se firmó el Convenio de Rotterdam, dirigido a la regulación del comercio transfronterizo de productos químicos y plaguicidas peligrosos (Convenio de Rotterdam, 19 de septiembre de 1998). Este procedimiento implica la elaboración de un informe detallado, sobre las propiedades y efectos en el ser humano y en el ambiente, de los productos que se desean comercializar, en base al cual, el país importador decide si aprueba su introducción al país. En 2001, con el Convenio de Estocolmo, se avanzó en el control de las sustancias más perjudiciales, basado en conceptos de precaución enfocados en la eliminación definitiva de compuestos orgánicos persistentes (COP). La eliminación afecta a la producción, utilización, importación y exportación, así como la gestión y eliminación de dichos productos y de sus subproductos, para que se lleven a cabo de forma segura.

El Convenio de Estocolmo, de un total de 181 partes, ha sido firmado por 152 países, (Stockholm Convention, 2008). En el marco de dicho Convenio se elaboró una lista de doce COP, conocida como la “docena sucia” o “dirty dozen”, constituida por ocho plaguicidas organoclorados, dos compuestos industriales y dos subproductos. Con este listado, se perseguía regular la comercialización para disminuir la presencia del aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, mirex y toxafeno, bifenilos policlorados (PCB) y hexaclorobenzeno (HCB), dioxinas y furanos en el medio ambiente (cinco de los cuales, son objeto de estudio del presente trabajo). Sin embargo, en los sucesivos años se consideró necesario ampliar el listado de COP e incrementar los instrumentos legales sobre su control, dando lugar a la redacción del Reglamento (CE) nº 850/2004 y los Reglamentos (UE) nº 756//2010, 757/2010 y 519/2012. En la Tabla 1 se resumen los Contaminantes Orgánicos Persistentes y otras sustancias tenidas en cuenta en el Convenio y en el Reglamento nº 850/2004 y sus modificaciones, junto con otros datos de interés.

El Reglamento (CE) nº 850/2004, y sus posteriores modificaciones, incorpora a la legislación de la Unión los compromisos sobre COP y sobre contaminación atmosférica transfronteriza a gran distancia, provocada por contaminantes orgánicos persistentes. Por tanto, abarca los contenidos del Convenio de Estocolmo y del Protocolo del Convenio de 1979 (aprobado mediante Decisión del Consejo 2004/259/CE).

El Reglamento 850/2004 creó un marco jurídico común sobre COP, reagrupando en los Anexos I a V las sustancias en función del grado de restricción de producción, uso y comercialización recogidos en el Convenio de Estocolmo. En el Convenio se agrupan en Anexo A (Productos sobre los que se deben tomar medidas para eliminar su producción y uso), Anexo B (productos sobre los que se deben tomar medidas para restringir su producción y uso, sujetos a excepciones para su utilización o producción para un uso determinado) y Anexo C (para productos originados no intencionadamente sobre los que se deben tomar medidas para reducir su producción e ir minimizando su producción hasta lograr su eliminación si fuera posible).

Tabla 1. COP y otras sustancias incluidas en el Convenio de Estocolmo, Reglamento (CE) n 850/2004

Año inclusión en el Convenio	COP y otras sustancias consideradas	Nº CAS	Convenio de Estocolmo	Reglamento (CE) nº 850/2004	USO*	Anexo del Convenio
2009	α-Hexaclorociclohexano	319-84-6	X	X	Fito/Bioc	A
2009	β-Hexaclorociclohexano	319-85-7	X	X	Fito/Bioc	A
2009	γ-Hexaclorociclohexano (Lindano)	58-89-9	X	X	Fito/Bioc	A
2001	Aldrín	309-00-2	X	X	Fito/Bioc	A
2001	Bifenilpoliclorados (BPC o PCB)	1336-36-3	X	X	Indus, No Int	A, C
2001	Clordano	57-74-9	X	X	Fito/Bioc	A
2009	Clordecona	143-50-0	X	X	Fito/Bioc	A
2001	Dibenzo-p-dioxinas policlorados y dibenzofuranos		X	X	No Int	C
2001	DDT	50-29-3	X	X	Fito/Bioc, Indus	B
2001	Dieldrín	60-57-1	X	X	Fito/Bioc	A
2001	Endrina	72-20-8	X	X	Fito/Bioc	A
2001	Heptacloro	76-44-8	X	X	Fito/Bioc	A
2009	Hexabromobifenilo	36355-01-8	X	X	Fito/Bioc,	A
2001	Hexaclorobenceno	118-74-1	X	X	Fito/Bioc, Indus, No Int	A, C
2015	Hexaclorobutadieno	87-68-3		X	Fito/Bioc, Indus, No Int	A
2001	PAH			X	Indus, No Int	
2011	Endosulfán	115-29-7	X	X	Fito/Bioc	A
2009	Éter de heptabromodifenilo (entre BDE-170 y BDE-193)	68928-80-3	X	X	Indus	A

Año inclusión en el Convenio	COP y otras sustancias consideradas	Nº CAS	Convenio de Estocolmo	Reglamento (CE) nº 850/2004	USO*	Anexo del Convenio
2009	Éter de hexabromodifenilo (entre BDE-128 y BDE-169)	36483-60-0	X	X	Indus	A
2009	Éter de octabromodifenilo			X	Indus	
2009	Éter de pentabromodifenilo (BDE-99)	32534-81-9	X	X	Indus	A
2009	Éter de tetrabromodifenilo (BDE-47)	40088-47-9	X	X	Indus	A
2001	Mirex	2385-85-5	X	X	Fito/Bioc, Indus	A
2015	Naftalenos policlorados			X	Indus	A, C
2015	Alcanos de C10-C13, cloro-(parafinas cloradas de cadena corta) (PCCC)	85535-84-8 287-476-5		X	Indus	
2009	Pentaclorobenceno	608-93-5	X	X	Fito/Bioc, Indus, No Int	A, C
2009	Sulfonatos de perfluorooctano	1763-23-1	X	X	Indus	B
2001	Toxafeno	8001-35-2	X	X	Fito/Bioc	A
2015	Pentaclorofenol, sus sales y esteres	87-86-5		X		A
2013	Hexabromociclododecano (HBCD)		X			A

Tabla modificada a partir de la información contenida en Stockholm Convention (2008) y del documento de Magrama (2013).

PAH: hidrocarburos aromáticos policíclicos; *Uso: Fito/bioc: Fitosanitario/biocida; Indus: uso industrial; NoInt: Emisión no intencionada.

Anexo A: Productos sobre los que se deben tomar medidas para eliminar su producción y uso. Anexo B: productos sobre los que se deben tomar medidas para restringir su producción y uso. Excepciones para su utilización o producción para un uso determinado. Anexo C: para productos originados no intencionadamente sobre los que se deben tomar medidas para reducir su producción e ir minimizando su producción hasta lograr su eliminación si fuera posible.

Continuamente se actualizan los anexos en base a la información y las propuestas realizadas por los Estados firmantes del Protocolo. Actualmente, se han propuesto 3 sustancias para su incorporación en el citado Reglamento y están en fase de evaluación. Entre ellas, se encuentra el dicofol, también evaluado en este estudio (Stockholm Convention. 2008).

El grado de restricción de cada sustancia, en cuanto a su uso y presencia en el medio, afecta a todos los ámbitos, con la consecuente normativa asociada. Tan sólo como ejemplo, cabe destacar la Directiva Marco de Aguas (Directiva 2000/60/CE y su modificación 2009/31/CE); el ámbito de la alimentación (Reglamento (CE) nº 178/2002 y su modificación Reglamento (CE) nº 596/2009); emisiones industriales (Directiva 2010/75/UE); e incluso en lo concerniente al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas comercialización de cualquier sustancia química, conocido como REACH (Reglamento CE nº 1907/2006).

Otro aspecto importante es la gestión de excedentes y la eliminación del medio de los compuestos más peligrosos. Si esta tarea es compleja por múltiples motivos, se hace mucho más difícil en aquellos países en vías de desarrollo que almacenan un stock importante de plaguicidas. Aunque pueda parecer paradójico, este problema lo comparten importantes organizaciones intergubernamentales que adquirieron, tiempo atrás, grandes cantidades de éstos para campañas sanitarias frente determinadas plagas, que no agotaron en su momento y, que incluso en algunos casos, han caducado. En el caso particular de África hay miles de toneladas de plaguicidas en desuso, motivo por el cual se creó un programa cuyo fin es buscar y coordinar la solución al problema. De esta necesidad, nació el Programa Africano de Existencias de Plaguicidas Obsoletos (ASP) (www.fao.org, web visitada el 13/09/2017). La prohibición de los denominados COP supuso la inutilización inmediata de los mismos, representando más del 20% de las existencias de todos plaguicidas caducados en África. Pero a esta situación se agrava por el hecho de que a menudo se producen derrames por un almacenamiento inadecuado, contaminando suelos y aguas subterráneas. Además, este tipo de plaguicidas almacenados son objeto de robos y usos ilegales. Todo ello, junto con la elevada persistencia de dichos compuestos se traduce en una amenaza global

medioambiental que, por supuesto, también afecta al ser humano (www.fao.org, web visitada el 13/09/2017).

Pero, a pesar de que la distribución mundial supone un riesgo de exposición asociado, no se aprecia efecto ni en todos los organismos, ni en el mismo grado de intensidad en aquellos donde aparecen. Pero no hay que perder de vista que, el hecho de que la exposición de uno o varios compuestos no derive en la muerte del sujeto, no implica que no ocasionen otro tipo de daños, como alteraciones genéticas o fisiológicas, que repercuten no sólo en la vida del individuo, si no también algunos casos, en la viabilidad de la población (Poletta *et al.*, 2009).

Toda la información aportada muestra la relevancia de la problemática y la necesidad de avanzar en el conocimiento sobre el impacto que tienen estos compuestos en el ecosistema y en el ser humano, y así poder tomar medidas que minimicen los efectos perjudiciales. Dilucidar el mecanismo de acción de cada compuesto, conocer los factores determinantes del efecto tras la exposición, como: dosis/concentración, sustancias concomitantes, factores intrínsecos del individuo, características físico-químicas del producto y del medio en el que se encuentre, entre otros factores, y así realizar una apropiada evaluación del riesgo es harto complejo, aunque imprescindible. Se ha publicado una gran cantidad de información de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre los efectos derivados de este tipo de sustancias; no obstante, es necesario continuar investigando para cubrir las lagunas de conocimiento existente, concernientes al ecosistema y al ser humano. Tan es así, que el Reglamento (CE) Nº 1107/2009 relativo a la comercialización de fitosanitarios, especifica textualmente que: *“Se ha de promover el desarrollo de métodos de ensayo sin animales para obtener más datos relativos a la seguridad humana y sustituir los estudios sobre animales que se llevan a cabo en la actualidad”*.

2. COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES

Todos los compuestos tratados en esta tesis se catalogan como Compuestos Orgánicos Persistentes (COP), uno de los grupos químicos que más preocupa a la comunidad científica y a los gobiernos. Mayoritariamente, los COP son hidrocarburos aromáticos halogenados, en los que el cloro suele ser el halógeno presente. Cuanto mayor es el grado de cloración,

mayor estabilidad posee la molécula y más hidrofóbica resulta. Lo mismo sucede con el tipo de estructura, puesto que la presencia de anillos aromáticos favorece la estabilidad del compuesto, siendo más resistentes a la degradación que las estructuras alifáticas. Los COP se agrupan en tres categorías: a) plaguicidas, b) compuestos de origen industrial, y c) subproductos y contaminantes procedentes de la combustión, incineraciones y otros procesos industriales (Caza y Bailey, 2000).

Aunque los compuestos organoclorados engloban productos de usos muy diversos, todos poseen características comunes que les confieren la capacidad de persistir en el ambiente: baja solubilidad en agua y resistencia a la degradación. Gracias a su escasa solubilidad en agua y elevada liposolubilidad, atraviesan fácilmente las membranas celulares acumulándose en los tejidos grasos. Además, la hidrofobia de estos compuestos da lugar a su acumulación en la materia orgánica de sedimentos durante largos periodos de tiempo, incrementando su persistencia en el medio (U.S. Environmental Protection Agency, 2003). Estas particularidades favorecen los procesos de bioacumulación/bioconcentración y biomagnificación en la cadena trófica, pasando de eslabón a eslabón a través de la dieta, fundamentalmente (Caza y Bailey, 2000).

Son, precisamente, las características citadas algunas de las más relevantes para ser catalogadas como Compuesto Orgánico Persistente (COP). Para que una sustancia se clasifique como COP debe reunir los requisitos basados en conceptos de persistencia, bioacumulación y potencial de transporte a larga distancia en el medio ambiente. Las particularidades de cada uno de estos términos se definen en la Directiva 2009/128/ (CE) del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

Muchos contaminantes se distribuyen a través de la circulación atmosférica, transportándose a latitudes distantes a través de las corrientes de convección del aire y del agua. El calentamiento de la superficie terrestre es mayor en la zona ecuatorial, provocando la ascensión del aire y, también, de los contaminantes susceptibles de ser arrastrados presentes en la zona, hasta que la temperatura en altitud enfría la masa de aire provocando su descenso entorno a latitudes de 30 ° N/S del Ecuador. Ésta célula de circulación es la responsable de la elevada pluviometría que se registra en dicha zona del planeta, y del

transporte de contaminantes desde focos de emisión hacia lugares distantes. A partir de los 30º latitud N/S hacia los polos, las células de circulación son menos importantes (Margalef, 1974).

La capacidad de transporte de los compuestos y, en particular de los plaguicidas, depende de varios factores, entre los que destaca el modo de aplicación. Las formulaciones para la aplicación del tipo aspersión o nebulización favorece la liberación a la atmósfera y su transporte vía aérea. En cambio, aquellos productos de aplicación diluidas verán favorecido su transporte a través corrientes de agua contaminando zonas colindantes y acuíferos. Los productos con mayor dificultad, *a priori*, para transportarse en el medio son aquellos que se aplican directamente sobre el suelo, y suelen ser menos biodisponibles que el resto de vías de liberación. Las diferencias en el modo de aplicación conllevan pérdidas más o menos importantes de eficiencia debidas a procesos de evaporación, deposiciones y fotodegradación. Por ello es necesario incrementar la cantidad de compuesto requerido para alcanzar la eficacia deseada. Se ha estimado que menos del 1% del total de pesticidas empleados alcanza su especie diana. Esta dispersión de los productos posibilita el contacto con poblaciones más o menos distantes que no son el objeto del producto empleado, al tiempo que sufren distintos procesos de modificación que dificultan mucho la predicción del efecto tras la exposición (Furio *et al.*, 2015).

Todos los aspectos mencionados, sumado a la escasa capacidad de degradación de algunos de ellos en el ambiente, explican su presencia en lugares distantes al punto de emisión, incluso tras años de haber sido empleados. Estas particularidades explican la detección de DDT en zonas del ártico y antártico, donde nunca se utilizó (ATSDR, 2002; Byrne *et al.*, 2009), y se continúan detectando compuestos ya prohibidos hace años en aves del sureste español (García-Fernández *et al.*, 2008; Martínez-López *et al.*, 2009). En el caso de que tras la exposición se produzca la absorción de las sustancias, se desencadena la activación de las vías de metabolización en el organismo, que darán lugar a moléculas más solubles que favorecen su excreción, con mayor o menor éxito en función de la resistencia a la degradación que posean. Sin embargo, no siempre resulta así. Algunas sustancias al metabolizarse ven incrementada su persistencia. Un ejemplo de ello es el DDE, resultante de la degradación del DDT, así como la rápida transformación en el ambiente del aldrín a dieldrín, éste mucho más persistente que su predecesor.

El cuadro clínico que se puede presentar por la exposición aguda a organoclorados es amplio, pero bien conocido. La severidad de los síntomas abarca desde dolores de cabeza, mareos vómitos, dermatitis, anorexia, náuseas, excitación, irritabilidad, alteración de los reflejos, debilidad muscular, temores, espasmos, confusión mental, ansiedad, convulsiones, hasta el estado de coma y muerte (Furio *et al.*, 2015).

Sin embargo, la predicción de efectos tras la exposición a dosis bajas es compleja. Existen evidencias que indican que los COP están relacionados con procesos de alteración hormonal, disfunción reproductiva e inmunológica, alteración del comportamiento y así como desarrollo y aparición de tumores (Ritter *et al.*, 1995). Aunque no es fácil establecer una relación directa entre causa y efecto, se han logrado establecer algunas asociaciones entre exposición de ciertos compuestos con efectos derivados (WHO/UNEP, 2013).

3.COMPUUESTOS ORGANOCORADOS OBJETO DE ESTUDIO

Como ya se ha apuntado al inicio del capítulo, durante décadas se han estado empleando grandes cantidades de compuestos organoclorados con distinta finalidad, principalmente como fitosanitarios y en procedimientos industriales. Actualmente, a pesar de que en la mayoría de países desarrollados han sido prohibidos, en otros muchos en vías de desarrollo aún se permite su uso. Por tanto, este tipo de sustancias se siguen liberando al medio. No hay que perder de vista que, aunque se empleen en regiones distantes, gracias a su elevada persistencia en el medio ambiente y su transporte por el mismo a través de distintas vías (como el ciclo hidrológico y biomagnificación en la cadena trófica, entre otros) no existe un nivel de “exposición cero” a este tipo de compuestos, ni tan siquiera, en lugares en donde nunca se emplearon.

La elevada persistencia de los compuestos organoclorados se ha constatado en muestras biológicas de rapaces del sur-sureste español, en donde la agricultura (mayoritariamente intensiva y en las que no se realizan prácticas ecológicas) supone una actividad importante en la economía (Iris, 2017). Estudios de biomonitorización de contaminantes persistentes en la zona sobre rapaces durante más de diez años ha permitido detectar compuestos fitosanitarios en éstas, incluso en años posteriores a su prohibición. En los citados estudios detectaron varios representantes de organoclorados del grupo de los

ciclodiénicos, difenilalifáticos, hexaclorociclohexanos y bifenilos policlorados (García-Fernández *et al.*, 2008). De ellos, se han escogido los más representativos bien por su trascendencia y/o por su frecuencia como base para el desarrollo de la presente tesis.

A continuación, se detallan los aspectos más relevantes relativos al objeto de la presente tesis, para cada uno de los cuatro grupos químicos abordados: difenilalifáticos, ciclodiénicos, hexaclorociclohexanos y bifenilos policlorados. Se alude a los efectos achacados a cada grupo químico, mencionado, en algunos casos, los mecanismos de acción asociados.

3.1. DIFENILALIFÁTICOS

- *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE y Dicofol:

El DDT, posiblemente uno de los organoclorados (OC) más estudiados y conocidos, pertenece al grupo de los pesticidas difenilalifáticos. Curiosamente, pasó desapercibido durante los primeros años de su síntesis, llevada a cabo por primera vez por Othmar Zeidler en 1874. Paradójicamente, la “fama” de este compuesto viene dada por hechos que resultan meridianamente opuestos. Años después de su síntesis, en 1939, el químico suizo Paul Muller descubrió las propiedades insecticidas del producto, hallazgo que le hizo merecedor del Premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1948. La primera etapa del uso del DDT se vincula al periodo previo del final de la Segunda Guerra Mundial, época en la que enfermedades como la malaria y el tifus tenían una elevada incidencia. El DDT mostró ser muy eficaz frente al vector de la malaria (el mosquito del género *Anopheles* de la familia *Culicidae*), frente a garrapatas y otros transmisores responsables de enfermedades. En vista de la efectividad del DDT como controlador de transmisores de este tipo de patologías, se recurrió a este difenilalifático para proteger a la población civil y al ejército. Durante el invierno de 1943-1944 se empleó directamente en personas como tratamiento contra los piojos. Una vez finalizada la guerra, su uso se extendió a la agricultura y al control de otras enfermedades de forma masiva (Ecobichon, 2005; Ritter *et al.*, 1995).

Transcurridos unos años de uso generalizado del DDT, comenzaron a detectarse resistencias en insectos expuestos durante largos periodos. Para contrarrestar este hecho, era necesario incrementar la dosis requerida para alcanzar el efecto insecticida.

Curiosamente, dicha resistencia tan sólo se producía en poblaciones que habían tenido un contacto prolongado, independientemente de la cepa o poblaciones de especies de insectos. Se descubrió que estos individuos presentaban una modificación enzimática que impedía la metabolización del organoclorado. Este fenómeno también se demostró tras la aplicación de otros insecticidas como BHC, ciclodienos y organofosforados (Matolcsy *et al.*, 1988).

Sin embargo, aquel producto que inicialmente resultó muy beneficioso para el ser humano, pronto comenzó a ser cuestionado por muchas voces, que asociaron patologías y procesos perniciosos en el medio ambiente con el uso de este producto. Como resultado, a finales de la década de los 70 comenzó a restringirse su uso, incluso se prohibió en muchos países (Ecobichon, 2005; Ritter *et al.*, 1995). En España, se prohibió la comercialización y uso del DDT en 1986 (Orden de 28 de febrero de 1986 relativa a la prohibición de la comercialización y utilización de productos fitosanitarios que contienen ciertas sustancias activas), aunque en el resto de Europa se produjo años antes, por medio de la Directiva 83/131/CEE que modifica el anexo de la Directiva 79/117/CEE). A pesar de que ha sido prohibido en muchos países desde entonces, el DDT sigue incorporándose al medio ambiente en otros tantos (ATSDR, 2002).

Como ya se ha comentado, la popularización del uso del DDT dio lugar a una distribución global favorecida por fenómenos atmosféricos, que han permitido su detección, incluso, en el ártico. Bioacumulable y biomagnificable, es capaz de permanecer en el suelo hasta el 50% del producto empleado, pasados 10-15 años de su aplicación. Sin embargo, en la atmósfera el DDT posee una vida media estimada en 1,5 días a 4 días (Ritter *et al.*, 1995; ATSDR, 2002).

La degradación del DDT presenta algunas diferencias entre organismos vivos de sangre caliente y en el medio ambiente, aunque en ambos casos existe un denominador común: los microorganismos. El *p,p'*- DDT, en organismos de sangre caliente, se metaboliza a *p,p'*-DDD por la microflora intestinal, sin dar lugar apenas a DDE. Como resultado, el *p,p'*-DDD es eliminado del organismo por la orina en forma de metabolitos (Matolcsy *et al.*, 1988). En cambio, en el suelo, el DDT se degrada lentamente por acción de los microorganismos, cuyo metabolito principal resulta ser el DDE, y en menor medida, el DDD. Al igual que el DDT, se

distribuyen virtualmente a nivel mundial. Ambos metabolitos son más persistentes en el ecosistema que el producto originario (ATSDR, 2002; Ritter *et al.* 1995).

El DDD se utilizó también, aunque en menor medida, como insecticida. Sin embargo, el DDE únicamente aparece como producto de degradación en el medio ambiente (ATSDR, 2002). Por su parte, el Dicofol (*p,p'*-diclorodifenil-2,2,2-tricloroetano) es un insecticida con propiedades fundamentalmente acaricidas, recomendado para el cultivo de vid, sandías, melones y cítricos (Orden de 1 de febrero de 2006; Resolución de 28 de marzo de 2007; Orden de 26 de noviembre de 2007). En su síntesis participa el DDT, por lo que el producto comercial suele contener trazas de *p,p'*-DDT (Ecobichon, 2005).

Otro suceso muy destacado, fue la comprobación de que el DDT incrementaba su efecto gracias a compuestos derivados estructuralmente similares a él, pero que por sí mismos carecían de efecto insecticida. Del mismo modo, también incrementaban las resistencias al mencionado OC. A raíz de la constatación de estos hechos, se comenzó a aplicar el concepto de “sinergistas del DDT”, al inhibir la enzima responsable del metabolismo, la dehidroclorinasa (Matolcsy *et al.*, 1988).

En lo referente a su transporte en el organismo, los citados compuestos se vehiculan en sangre unidos a proteínas, fundamentalmente unidos a la albúmina y globulinas de pequeño tamaño. En humanos, apenas un 18% se transportan unidos a eritrocitos. Esta información es vital para realizar un correcto análisis de sangre. En caso de disponer de plasma y no sangre entera, no se obtendría una información veraz sobre la cantidad de compuesto presente en la sangre, puesto que en el procesado de obtención de plasma se eliminan las proteínas a las que van unidas dichos difenilalifáticos (ATSDR, 2002).

Es posible encontrar asociaciones entre difenilalifáticos y efectos indeseados en el ser humano y en fauna. A pesar de ello, no siempre hay coincidencia en todos los casos entre causa efecto, principalmente, cuando no se trata de ensayos experimentales. A pesar de ello, se puede decir que los difenilalifáticos afectan a varias funciones fisiológicas, como el transporte de iones de la membrana neuronal, o afectando al sistema reproductivo y desarrollo del individuo provocando alteraciones como criptorquidismo. También se ha descrito afección en animales por parte del DDT, afectando a los órganos sexuales,

provocando muerte perinatal, pubertad prematura, embriotoxicidad y toxicidad fetal en ausencia de toxicidad materna (ATSDR, 2002). Del mismo modo, se han detectado efectos adversos sobre el ambiente, sobretodo en aves silvestres, motivo por el cual fueron prohibidos a primeros de los setenta en Estados Unidos) (ATSDR, 2002; Gips, 1987; Ritter *et al.*, 1995; WHO/UNEP, 2013)

Se asocian con efectos metabólicos, hepáticos (como incremento del peso del órgano, hipertrofia, hiperplasia), efectos sobre las glándulas adrenales. El DDT es capaz de modificar el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos, entre los que destaca la inducción de la función de las oxidasas (implicadas en el catabolismo de xenocompuestos y de hormonas como el cortisol). Asimismo, se ha descrito la inducción del sistema de los citocromos P-450 por parte del DDE (ATSDR, 2002).

No obstante, existe controversia sobre la implicación del DDT en procesos cancerosos. Al margen de las discrepancias, el DDT y sus derivados han mostrado ser carcinogénicos en algunos animales de laboratorio. Entre los posibles mecanismos responsables de esta patología se encuentra la promoción hormonal inducida vía estrogénica, a través de mecanismos independientes a receptores estrogénicos como, por ejemplo, la capacidad del DDT para mimetizar los efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF o *Epidermal Growth Factor*) en células negativas a estrógenos (ATSDR, 2002).

3.2. CICLODIÉNICOS

- Aldrín, dieldrín, endrín, endosulfán, endosulfán sulfato, heptacloro, heptacloro epóxido.

El **aldrín** es una molécula muy estable en suelos compuestos ricos en ácidos orgánicos e inorgánicos y en bases, por lo que se ha empleado como insecticida de aplicación directa en suelos. No obstante, la composición del mismo condiciona las características del producto, puesto que la concomitancia con ciertos minerales y/o urea aceleran su degradación en el medio. El aldrín no sólo se modifica en el suelo, sino que también se transforma rápidamente en su epóxido dieldrín en plantas, insectos y organismos de sangre caliente (Matolcsy *et al.*, 1988). Esta particularidad hace que no sea frecuente encontrar residuos de aldrín sin metabolizar en alimentos o animales, y en caso de detectarse, que se detecte en

pequeñas cantidades (ATSDR 2002; Matolcsy *et al.*, 1988; Ritter *et al.*, 1995). El aldrín es altamente tóxico en organismos de sangre caliente, absorbiéndose fácilmente por la piel. En humanos, dosis letales de aldrín causan la muerte dentro de las 24 horas tras la exposición (Matolcsy *et al.*, 1988).

El **dieldrín**, a diferencia de su predecesor aldrín, no se emplea como insecticida directamente sobre el suelo debido a su menor tensión de vapor, a pesar de su estabilidad en medios alcalinos. Las dos moléculas son capaces de unirse fuertemente a partículas del suelo, dificultando su transporte en las corrientes de agua. Además, al ser más resistente a la degradación que el aldrín, persiste en el medio durante más tiempo que su predecesor aldrín. Se ha estimado que el dieldrín puede permanecer entre 5 y 7 años en el ambiente, frente a los 110 días estimados para el aldrín (USEPA, 2003). La alta permanencia en suelos de zonas cálidas, sumado a su elevada liposolubilidad, favorece la bioconcentración y biomagnificación (Ritter *et al.*, 1995).

En el organismo, el dieldrín se transporta rápidamente en sangre y hemolinfa, vehiculados por los eritrocitos (concretamente, unidos a eritrocitos en un 39,8% frente al 12,5%-18% que lo hace el DDT) y en el plasma (ATSDR, 2002; Jorgenson, 2001).

En cuanto a su acción, el dieldrín podría asemejarse al lindano (γ -HCH) y diferir con el DDT. Al parecer, actúa en las membranas presinápticas de las uniones colinérgicas, provocando la liberación de las reservas de acetilcolina. Se absorbe fácilmente por el tracto respiratorio, digestivo y piel (Matolcsy *et al.*, 1988).

El **endrín**, esteroisómero del dieldrín formado a partir de reacciones de oxidación de éste, es parcialmente volátil y menos estable que su predecesor. Se metaboliza a endrín aldehído y a cetoaldrín por exposición a altas temperaturas y a la luz. El endrín es uno de los pesticidas más potentes al actuar eficazmente frente a insectos y organismos de sangre caliente. Gracias a ello, se ha empleado como insecticida y rodenticida. Se caracteriza por ser altamente tóxico para peces (Matolcsy *et al.*, 1988). Sin embargo, no se acumula en grasa en la misma medida que la mayoría de compuestos de estructura similar, debido a que se metaboliza rápidamente en animales. La vida media del endrín en suelo puede alcanzar los 12 años en función de las condiciones específicas del ambiente (Ritter *et al.*, 1995).

Tras una exposición aguda a aldrín y dieldrín a dosis elevadas, se produce una alteración del sistema nervioso central, pudiendo aparecer convulsiones, hiper-irritabilidad, coma y taquicardias con aumento de la presión sanguínea, entre otros efectos. Los signos clínicos provocados a bajas dosis también son consecuencia de la afección nerviosa, pero revisten menor gravedad, como dolor de cabeza, mareos, náuseas, vómitos y espasmos musculares.

También se han evidenciado efectos en fauna, entre los que destacan anemia, aplasia, hepatotoxicidad y lesiones renales (USEPA, 2003). Los compuestos con propiedades como las del aldrín y dieldrín resultan directamente mortales para peces y aves rapaces como el gavilán (*Accipiter nisus*) y cernícalo (*Falco tinnuculus*), a pesar de que la toxicidad aguda varía según la especie (Furio *et al.*, 2015; Ritter *et al.*, 1995).

Otro ciclodiénico muy empleado y tratado en la presente tesis, es el **endosulfán**, que comenzó a comercializarse en 1956 junto al endosulfán técnico, mezcla de los isómeros alfa y beta (Matolcsy *et al.*, 1988).

El endosulfán es muy estable en agua, pero se saponifica por bases o ácidos y se reconvierte en diol. El endosulfán α y el endosulfán β se pueden descomponer por acción solar en productos de degradación (ATSDR, 2015). En el organismo se absorbe vía digestiva, pero se degrada y elimina fácilmente. Gracias a ello, no persiste en organismos de sangre caliente, puesto que se descompone parcialmente en endosulfán sulfato (Matolcsy *et al.*, 1988).

El **endosulfán sulfato** está considerado más tóxico que los isómeros alfa y beta, aunque, de cualquier modo, éstos son altamente tóxicos también. Su vida media es más larga que sus isómeros.

El **heptacloro** se sintetizó a partir del clordano técnico en 1946. Su detección en suelo con frecuencia se debe a las impurezas del clordano. Altamente insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos, es capaz de adherirse a los sedimentos acuáticos. El 20% del heptacloro se metaboliza tanto en suelo como en los animales en su forma epóxido en tan sólo unas horas. La toxicidad de la forma epóxida, a pesar de ser un metabolito, es similar que su predecesor (ATSDR, 2007). En cambio, el epóxido es más resistente a la degradación y, gracias a su capacidad de unirse a partículas del suelo, es capaz de permanecer durante

tiempos prolongados, lo cual favorece los fenómenos de bioconcentración en tejidos grasos de los organismos, en músculo, hígado y riñón. El heptacloro es capaz de volatilizarse desde las superficies del suelo y transportarse por el aire. De cualquier forma, se ha de tener en cuenta que, las particularidades del suelo y las condiciones atmosféricas (temperatura y humedad relativa fundamentalmente), influyen de manera significativa en la prevalencia del producto. Con todo ello, se ha estimado que la vida media del heptacloro en suelo de zonas templadas puede llegar a los dos años (Ritter *et al.*, 1995; WHO, 2003).

Se ha recurrido al heptacloro como insecticida de uso directo en suelo frente a plagas de insectos y termitas, para combatir plagas agrícolas que atacan al algodón y otros cultivos, pero también se ha empleado en la lucha frente a la malaria (Who, 2003). Muchos de los efectos derivados de la exposición a ciclodiénicos son comunes para varios congéneres.

Al heptacloro se le relaciona directamente con el descenso de poblaciones de aves en Estados Unidos (Matsumura, 1985; Ritter *et al.*, 1995). Existen evidencias de que tanto el heptacloro como su forma epóxido interfieren en la fertilidad y en el desarrollo inapropiado del neonato (WHO, 2003). La exposición a dosis altas se ha vinculado con la disminución del peso y muerte perinatal en animales. La escasa información sobre su toxicidad tras la exposición oral y dérmica procede, en su mayoría, de ensayos experimentales. En cualquier caso, los efectos perniciosos son consecuencia del metabolismo del heptacloro en el organismo. La ingesta de estas sustancias provoca efectos neurológicos, hepáticos, disfunción del sistema reproductivo y anomalías del desarrollo. Los estudios concluyen que el sistema reproductor es el más sensible del organismo frente a estos compuestos (ATSDR, 2007). Estudios experimentales de heptacloro, su epóxido y la presentación técnica de heptacloro sobre diferentes cepas de ratones machos y hembras han mostrado ser carcinogénicos, pero no así en ratas. Ensayos de genotoxicidad han mostrado, principalmente, respuestas negativas en estudios *in vitro* e *in vivo* (WHO, 2006).

3.3. HEXACLOROCICLOHEXANOS (HCH)

El hexaclorociclohexano (HCH), también conocido como hexacloro benceno (BCH), posee 8 isómeros, de los cuales en esta tesis se han analizado el γ -HCH o "lindano" y la mezcla de isómeros comercializado como "lindano técnico". Los isómeros son productos

secundarios producidos en la síntesis del lindano, pero éstos no poseen actividad insecticida. La formulación del lindano técnico está constituida, generalmente, por la combinación de α -HCH (53-70%), β -HCH (3 - 14%), γ -HCH (11-18%), δ -HCH (6-10%) y ϵ -HCH (3- 5%) (MAGRAMA, 2013). De todos ellos, el lindano es el único al que se le asignan propiedades insecticidas, siendo ésta su principal aplicación sobre plantas (ATSDR, 2005), pero el proceso de síntesis del lindano conlleva una elevada producción de residuos, en concreto, por cada tonelada de γ -HCH se generan entre 6 y 10 toneladas de residuos (MAGRAMA, 2013). Sin embargo, también se emplea en el control de parásitos en animales y en personas (como piojos y ácaros). Todos los isómeros se pueden detectar en agua, suelo y en el aire, aunque los microorganismos telúricos los degradan a productos menos tóxicos a largo plazo (ATSDR, 2005).

Como es común al resto de COP, los HCH persisten en el medio ambiente en todos sus compartimentos, en mayor o menor medida. En aire, las diferentes isómeros pueden estar en estado gaseoso, o unido a pequeñas partículas. Gracias a los fenómenos atmosféricos puede permanecer en el aire y ser transportado largas distancias, si las condiciones son favorables. Incluso, y a pesar de que los procesos son largos, las moléculas de HCH pueden ser degradadas en el ambiente por acción de los microorganismos (ATSDR, 2005).

Es posible encontrar distintas clasificaciones carcinogénicas en función de la entidad consultada. De esta manera, la Agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC, por sus iniciales en inglés) clasifica todos los isómeros del HCH como posibles carcinógenos para humanos. No obstante, la EPA indica que, aunque existan evidencias de tal relación, serían necesarias más pruebas para catalogarlo como cancerígeno potencial. Esta última entidad incluso otorga distinta clasificación a cada isómero, asignando al lindano técnico y al α -HCH como probable carcinógeno en humanos y el β -HCH como posible carcinógeno, a diferencia del isómero δ y el ϵ , los cuales quedan fuera de la catalogación (ATSDR, 2005).

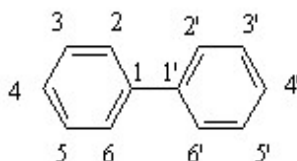
3.4. BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

El grupo de los bifenilpoliclorados está constituido por 209 congéneres, todos ellos sintetizados por el hombre. Gracias a sus propiedades se han aplicado en la industria con múltiples usos desde 1930, formando parte de materiales dieléctricos en transformadores y

condensadores, en fluidos de intercambio de calor o aditivos de pinturas y en plásticos, entre otros. Esta versatilidad es gracias a características como su elevada resistencia al calor, a que no son compuestos inflamables, poseen baja presión de vapor, pero una elevada constante dieléctrica (Ritter *et al.*, 1995; WHO, 1993;). Además, los PCB son altamente estables y liposolubles, asociándose con frecuencia con partículas y materia orgánica en el ambiente, lo cual favorece su acumulación en la cadena alimentaria (Faroon *et al.*, 2003).

Estructuralmente están constituidos por una base de dos anillos fenólicos, en donde los átomos de hidrógeno se sustituyen por grupos clorados. Cada molécula se denomina en función del patrón de sustitución, uniéndose a los átomos de carbono numerados desde 2 hasta 6 (Figura 1). Precisamente, en las sustituciones residen las características de cada uno de ellos, puesto que dependiendo del grupo funcional que se una, varían sus particularidades, su mecanismo de acción y sus efectos (Faroon *et al.*, 2003).

Figura 1. Estructura química de los bifenilos policlorados



Además, la capacidad de giro de la molécula entorno a su eje horizontal y vertical también está ligada a los grupos funcionales unidos a los anillos. La limitación de esta capacidad, a su vez, se vincula con la toxicidad de los compuestos (Faroon *et al.*, 2003).

Los PCB se suelen agrupar en función de su patrón de sustitución en dos grupos. Dicha clasificación y la información presentada a continuación, se recogen en el documento de la *International Programme on Chemical Safety* (Faroon *et al.*, 2003):

- No coplanarios: aquellos que presentan grupos clorados en posiciones orto (2,2',6,6'), limitando la capacidad de giro de la molécula. También son conocidos como “tipo no dioxina”, más frecuentemente conocidos por su terminología inglesa “non dioxin-like”. Circulan fácilmente por músculos y sangre, afectando directamente al sistema nervioso y al desarrollo cerebral.

- Coplanarios o tipo dioxina: se diferencian del grupo anterior en que no poseen cloro en posiciones orto. También forman parte del grupo de los “tipo dioxina” los que tan sólo tienen un átomo de cloro en una de las cuatro posiciones orto (son los PCB mono-ortoclorados). Estas moléculas tienen mayor capacidad de giro, siendo las más tóxicas las que lo hacen totalmente.

Por otro lado, el grado de cloración influye sobremanera en el mecanismo de acción de los compuestos y, por tanto, en sus efectos. Se ha detectado que los congéneres con bajos niveles de cloración se unen a los receptores androgénicos (Ah) desencadenando unos efectos asociados a dicho mecanismo de acción. Sin embargo, a mayor grado de cloración en posición orto, mayor dificultad de mantener la posición coplanaria, disminuyendo la afinidad hacia dicho receptor. Los congéneres con al menos dos grupos cloro en posición orto, no poseen efecto tipo dioxina, al no unirse significativamente al receptor androgénico.

El grado de sustitución de la molécula también influye en su detección en sangre. Determinados mono y di-orto PCB se conocen como “marcadores” de PCB, por lo que se recurre a ellos para establecer límites de tolerancia en matrices concretas en algunos países. Por el contrario, los PCB coplanarios no pueden determinarse de forma adecuada, dificultando la estimación de sus niveles. Por tanto, al pasar desapercibidos, se incrementa la dificultad a la hora de conocer el grado de exposición de los organismos, sobretodo, por fenómenos de bioacumulación y transporte de los compuestos (Faroon *et al.*, 2003).

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

PARTE II: SISTEMA ENDOCRINO Y DISRUPTORES ENDOCRINOS

1.SISTEMA ENDOCRINO

El sistema hormonal o endocrino está formado por glándulas distribuidas por todo el organismo, en las que se sintetizan hormonas que actúan tanto en el mismo tejido (regulación paracrina), como en otros distantes que alcanzan a través del torrente sanguíneo (regulación endocrina). En cualquier caso, las hormonas ejercen su función en las células diana por medio de receptores. Para que se desencadene la respuesta en el tejido diana, en muchas ocasiones es suficiente con pequeñas cantidades de la hormona indicada (EPA,2017).

Funciones vitales tan importantes para el individuo como el crecimiento, multiplicación celular, desarrollo de caracteres sexuales, comportamiento sexual y reproductivo, actividad, motivación, comunicación, agresión, dominancia y otros comportamientos sociales, el aprendizaje y memorización, e incluso el sistema inmunitario están controlados por el sistema endocrino, directa o indirectamente, mediante su participación en el sistema reproductivo, esquelético, cardiovascular y sistema nervioso central (Enmark y Gustafsson, 1999; Gustafsson y Warner, 2000; Paterni *et al.*, 2014; Zala y Penn, 2004). Las hormonas desempeñan estas funciones a muy bajas concentraciones, del orden de partes por trillón o partes por billón en el cuerpo (Jones, 1996) , lo que demuestra la elevada potencia biológica y gran afinidad hacia sus receptores, a través de los cuales se multiplica el efecto (Vandenberg *et al.*, 2013).

A pesar de que existen varios tipos hormonales, este trabajo se ha centrado en el estudio de la función estrogénica. Desde hace décadas se conoce que las funciones de los estrógenos son muy diversas, ya que participan en la fisiología reproductiva (destacando la promoción de la proliferación celular y la capacidad de hipertrofiar los órganos sexuales femeninos), en el metabolismo lipídico, en el comportamiento, pero también son capaces de inducir la síntesis de proteínas específicas. De todas las hormonas estrogénicas, el estradiol (17- β estradiol o E2) ha demostrado ser el estrógeno biológicamente más activo en los tumores mamarios (actividad mediada por la regulación de la transcripción de genes), actuando también como carcinogénico en modelos con roedores (Beato *et al.*, 1995; Hertz R., 1985; Kiyama y Wada-Kiyama, 2015; Lippert *et al.*, 2000).

La regulación del sistema endocrino es muy compleja, en donde el funcionamiento adecuado de una glándula endocrina (que a su vez regula varias funciones orgánicas) depende de la actividad de una o varias glándulas adicionales (Tabla 2). El sistema endocrino está presente en mamíferos, aves, peces y otros tipos como los invertebrados (EPA,2017), aunque no en todos ellos se conoce con la misma profundidad.

Tabla 2. Funciones de las principales hormonas secretadas por las glándulas endocrinas

Glándula y función hormonal	Hormona sintetizada y función
Hipófisis: Coordina el sistema endocrino a través del sistema nervioso.	STH: Somatotropina, hormona del crecimiento. Crecimiento óseo y muscular. Prolactina. Producción y secreción de leche. TSH: Hormona estimulante del tiroides. Estimula el tiroides. ACTH: Adenocorticotropina. Estimula la corteza adrenal. FSH: hormona estimulante del folículo y la espermatogénesis. LH: Hormona luteinizante. Estimula el cuerpo lúteo y la ovulación, las células intersticiales en hombres.
Hipotálamo: Recibe señales hipotalámica, secreta hormonas hipotalámicas que regulan el resto de sistema endocrino	Oxitocina: Estimula las contracciones y terinas y eyección de leche. ADH: Hormona antidiurética. Regula la excreción de agua
Tiroides: Regula el desarrollo y maduración de vertebrados, y el metabolismo	Tiroxina: Controla el metabolismo. Calcitonina: Regula los niveles de calcio
Paratiroides	Paratohormona: Regula los niveles de calcio.
Adrenales: controlan el estrés, presión sanguínea, metabolismo de la glucosa y balance de sales y agua	Cortisol y otros glucocorticoides: Controlan el metabolismo. Aldosterona: Participa en la regulación de sales y agua. Adrenalina y noradrenalina: Participa en el estado de alerta del individuo.
Páncreas	Insulina: Disminuye el nivel de glucosa en sangre. Glucagón: Incrementa el nivel de glucosa en sangre.
Ovario: Regula el crecimiento desarrollo, ciclo reproductivo y el comportamiento.	Estrógenos: Participan en el desarrollo y mantenimiento de caracteres sexuales femeninos y participan en la preparación del útero para la gestación. Progesterona: Promueven la continuación de la preparación uterina.
Testículo: Regula el crecimiento desarrollo, ciclo reproductivo y el comportamiento.	Testosterona: Desarrolla y mantiene las características sexuales masculinas. Participa en la espermatogénesis.

Glándula y función hormonal	Hormona sintetizada y función
Pineal	Melatonina: Participa en la regulación de los ritmos circadianos.

Tras esta breve alusión al funcionamiento del sistema endocrino u hormonal, parece sencillo deducir qué son los “perturbadores endocrinos” (más conocidos por su traducción anglófona como “disruptores endocrinos” o “DE”) y poder definir el término. Sin embargo, es posible encontrar varias definiciones según la entidad consultada, las cuales matizan ligeramente el término según su criterio. En 2013, el Comité Científico de la EFSA definió el término “disruptor endocrino” como aquella *“sustancia exógena o mezcla, la cual altera una o varias funciones del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos para la salud en un organismo intacto, sobre su descendencia o poblaciones”*. Para ajustarse a esta definición los DE deben reunir los siguientes requisitos: i) ejercer un efecto adverso en un organismo, sobre su descendencia o sobre una población sana; ii) debe poseer actividad endocrina; iii) y una relación plausible entre causa-efecto entre ambos (EFSA, 2013). De cualquier modo, el concepto de “disruptor endocrino” comenzó a aplicarse a inicios de la década de los 90, tras unas sesiones científicas sobre las alteraciones del desarrollo sexual inducidas por compuestos químicos, en el seno de la Conferencia de Wingspread de 1991 (Bern *et al.*, 1991).

Pero, además, la EFSA (2013) da un paso más diferenciando entre Sustancias Endocrinas Activas (por sus siglas en inglés, EAS) y Disruptores Endocrinos (DE). Una EAS es aquella que es capaz de interactuar con, al menos, un componente del sistema hormonal provocando una respuesta, pero no necesariamente perjudicial (EFSA, 2013). Este término es similar al “Potencial perturbador endocrino”, acuñado por la *World Health Organisation* y el *International Programme on Chemical Safety* (WHO/IPCS), y definido como *“sustancia exógena o mezcla la cual posee propiedades de las que se podrían esperar que se derivase una alteración del sistema endocrino en un organismo intacto, su progenie o poblaciones”* (WHO/IPCS, 2002).

Es decir, matices sobre si el efecto derivado es o no perjudicial y la probabilidad de que se produzca un efecto (aunque no la certeza) son los aspectos que determinan la clasificación de las sustancias en “disruptor endocrino” y “sustancias endocrinas

activas/potencial perturbador endocrino”. Pero la EFSA profundiza más y especifica que, si el organismo es capaz de contrarrestar el efecto provocado por medio de una modulación de la respuesta metabólica, para evitar un efecto negativo definitivo, la respuesta desencadenada se ajustaría a una “Modulación endocrina”, pero no se trataría de una sustancia DE al no producirse un efecto negativo final (EFSA, 2013). Por ello el comité Científico de la EFSA considera que la actividad endocrina es un conjunto de mecanismos de acción, que potencialmente pueden dar lugar a efectos adversos, más allá que un riesgo (eco)toxicológico por sí mismo (EFSA Scientific Committee, 2013).

1.1. RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Para poder comprender por qué se produce un efecto determinado tras la interacción entre los receptores estrogénicos y sus ligandos (o en su caso, con un xenoestrógeno) es necesario tener, al menos, una visión global sobre cómo se desarrolla la respuesta estrogénica. Para ello es necesario conocer la estructura de dicho receptor, que es la base del proceso (pero no por ello irrelevante o sencillo). Con toda esta información, es posible comprender por qué se produce un efecto concreto y vislumbrar la complejidad de preverlo, debido a la cantidad de actores implicados en el proceso.

Los receptores estrogénicos (frecuentemente denominados por sus siglas en inglés, ER) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, a la que pertenecen seis subgrupos de receptores esteroideos: receptores de estrógenos, de hormonas adrenales, de hormonas tiroideas, de andrógenos, del ácido retinoico y receptores de vitamina D (Oa y Lalosa , 2015). Todos ellos poseen 6 regiones: A, B, C, D, E, F, presentes también en los dos representantes más destacados, ER α y ER β . Codificados en una o dos regiones (según el caso) se encuentran cuatro dominios cuyas funciones son imprescindibles en los distintos mecanismos de acción. En la Tabla 3 se recogen las regiones que alberga cada dominio y su función (Sotoca *et al.*, 2012), representados en la Figura 2.

Tabla 3. Estructura y función de los receptores estrogénicos.

Región	Dominio	Función
A/B	Ubicada en el extremo N-terminal, donde se codifica el dominio AF-1	Responsable de la transactivación independiente del ligando. Es activo únicamente en ER α .

C	DBD: <i>DNA Binding Domain</i>	Esta región se une a secuencias concretas del ADN de las regiones promotoras del gen diana. Dichas secuencias se conocen como ERE (<i>Estrogen Responsive Elements</i>).
D	Región bisagra	Esta zona contiene la región de localización nuclear para los ER, así como los lugares de modificación post translacionales.
E/F	En el extremo C-terminal, alberga el dominio AF-2 y <i>Ligand Binding Domain</i> (LBD) y también contiene el lugar de homo-heterodimerización.	AF-2 es el dominio dependiente de la transactivación por unión al ligando, denominado como <i>Ligand Binding Domain</i> (LBD) y también contiene el lugar de homo-heterodimerización.

Figura 2. Representación de la estructura de los receptores nucleares.

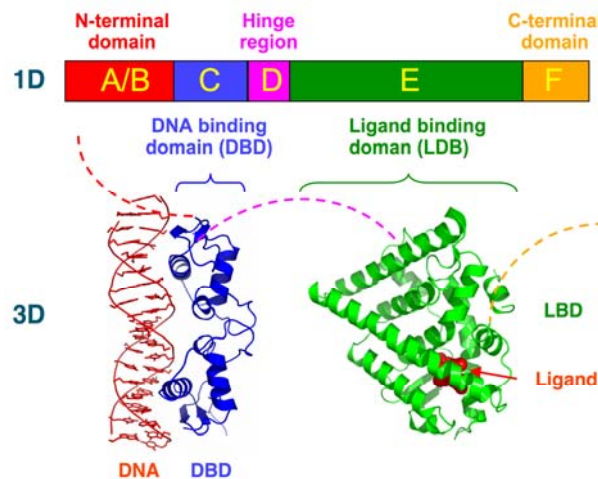


Figura libre de derechos obtenida de www.wikipedia.org

1D: Esquema de la secuencia de aminoácidos de un receptor nuclear. 3D: Estructura 3D de las regiones DBD (de unión a ADN) y LBD (de unión a ligando) de un receptor de estrógeno. Las estructuras del dominio N-terminal (A/B), de la región bisagra (D) y del dominio C-terminal (F) aún no han sido determinadas, por lo que han sido representadas con líneas punteadas de color rojo, morado y naranja, respectivamente.

Cada dominio participa en una etapa concreta de la respuesta, y la intervención de cada uno de ellos está condicionada por el tipo de mecanismo de acción implicado. Así, el dominio AF-1 participa en los procesos de transactivación independiente del ligando, mientras que el AF-2 interviene en la respuesta dependiente del ligando.

1.2. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA

De forma resumida, la señal estrogénica se puede producir por acción directa o indirecta sobre los receptores estrogénicos, puede ser ligando dependiente o independiente y, por último, el efecto derivado puede estar regulado por procesos genómicos y no genómicos (Figura 3). En los siguientes apartados se resumen los aspectos más destacados de cada uno de estos procesos.

MECANISMOS GENÓMICOS: Se desarrolla en el núcleo con la unión de secuencias concretas denominadas Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE) de los receptores al ADN. La interacción entre el compuesto, receptor y ADN puede ser a través de la vía clásica o activación directa, o bien de manera indirecta (Shanle y Xu, 2010).

Activación directa: En ausencia de ligando, los ER se asocian con proteínas de shock térmico (*heat shock proteins*, como la Hsp90 o Hsp70), vinculadas a chaperonas. Esta asociación favorece la estabilización del LBD del receptor y modifica su estructura para hacerlo accesible, permitiendo la unión del ligando. Cuando un ligando está presente en la célula, el receptor se disocia de las Hsp provocando la modificación de la configuración del ER, favoreciendo la dimerización con otro ER. Por último, el dímero se une a las secuencias específicas de ADN denominadas Elementos de Respuesta Estrogénicos (ERE) (Sotoca *et al.*, 2012).

Activación genómica indirecta. El Receptor interactúa con el ADN por medio de otros factores de transcripción de unión a ADN, como el c-Jun o el c-Fos (Kushner *et al.*, 2003). Tanto el dominio AF-1 como el AF-2 del receptor estrogénico son necesarios para la interacción con los complejos Fos/Jun (Brzozowski *et al.*, 1997).

MECANISMOS NO GENÓMICOS: La respuesta se desencadena en minutos. Precisamente por la inmediatez de la respuesta se concluye que no puede haber interacción con el ADN, y por lo tanto, se desarrolla extra nuclearmente (Shanle y Xu, 2010). Este mecanismo requiere la activación de otras señales de transducción de rutas metabólicas que permitan una respuesta rápida. Se cree que en este tipo de respuesta están involucrados ER asociados a la membrana o a receptores diferentes de los estrogénicos (Bjornstrom *et al.*, 2005). Por ejemplo, uno de los mecanismos

estudiados en los que es necesaria la participación del estradiol (o E2) es la activación de eNOS (endotelial óxido nítrico sintetasa). La rápida activación de eNOS en presencia de E2 es dependiente del ER α , mientras que se requiere la presencia de los dos subtipos de ER (α y β) para que el efecto se prolongue en el tiempo (Simoncini *et al.*,2005).

Además de lo anteriormente citado, se describe una actividad ligando independiente del ER α , la cual requiere de la participación de AF-1. Se han documentado varias reacciones cruzadas entre los ER y otras vías metabólicas, como la que se da entre los ER y los factores de crecimiento. Este tipo de mecanismo es muy complejo por la cantidad de conexiones que se dan entre diferentes factores, lo que justifica la falta de conocimiento de este tipo de mecanismo frente a los genómicos.

Figura 3 Mecanismo de acción de la función estrogénica.

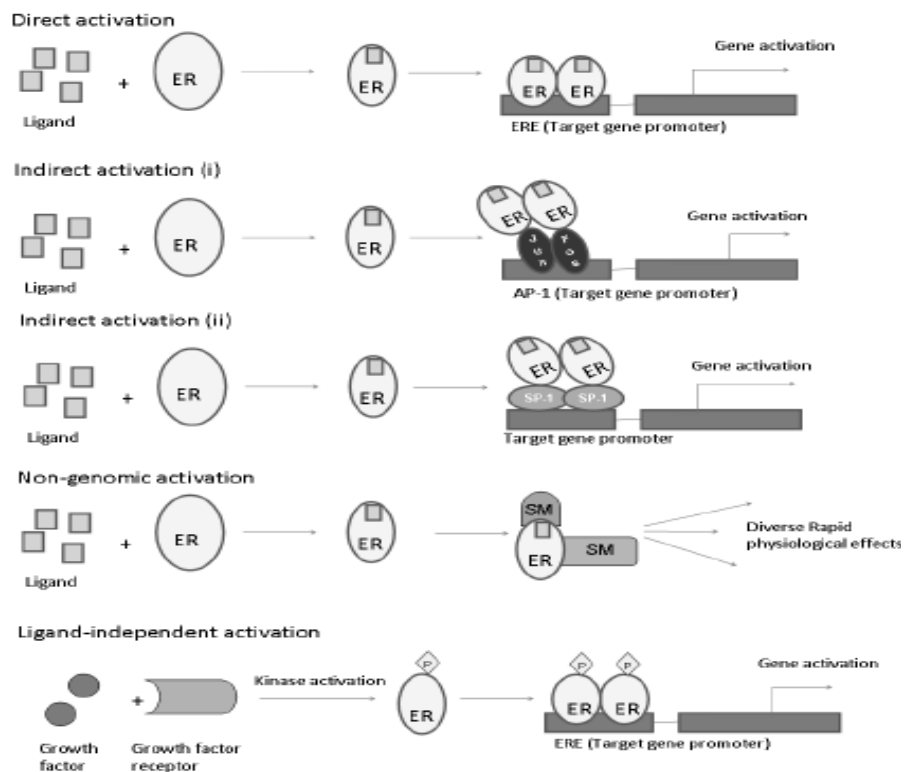


Imagen obtenida de Sotoca *et al.*, (2012)

Tanto ER α como ER β son capaces de unirse a una gran cantidad de compuestos, es por ello que se dice que tiene cierta promiscuidad. Precisamente por esta promiscuidad, muchos

compuestos químicos son capaces de interactuar con ellos y dar lugar a un efecto en el organismo muchas veces, impredecible. Con frecuencia los DE actúan por medio de varios mecanismos de acción, lo que dificulta aún más la predicción del efecto de los compuestos implicados en la exposición (Shanle y Xu, 2010).

La activación de los distintos mecanismos de acción puede influir sobre otros procesos, produciendo reacciones cruzadas entre distintos tipos de receptores, o influyendo sobre otros mecanismos de acción (Kiyama y Wada-Kiyama, 2015).

El estudio del mecanismo de acción de la función estrogénica se puede realizar sobre cada uno de los niveles implicados, realizando diferentes ensayos laboratoriales en función del ítem a evaluar (Figura 4).

Figura 4. Ensayos a emplear en función del nivel de mecanismo de acción estudiado.

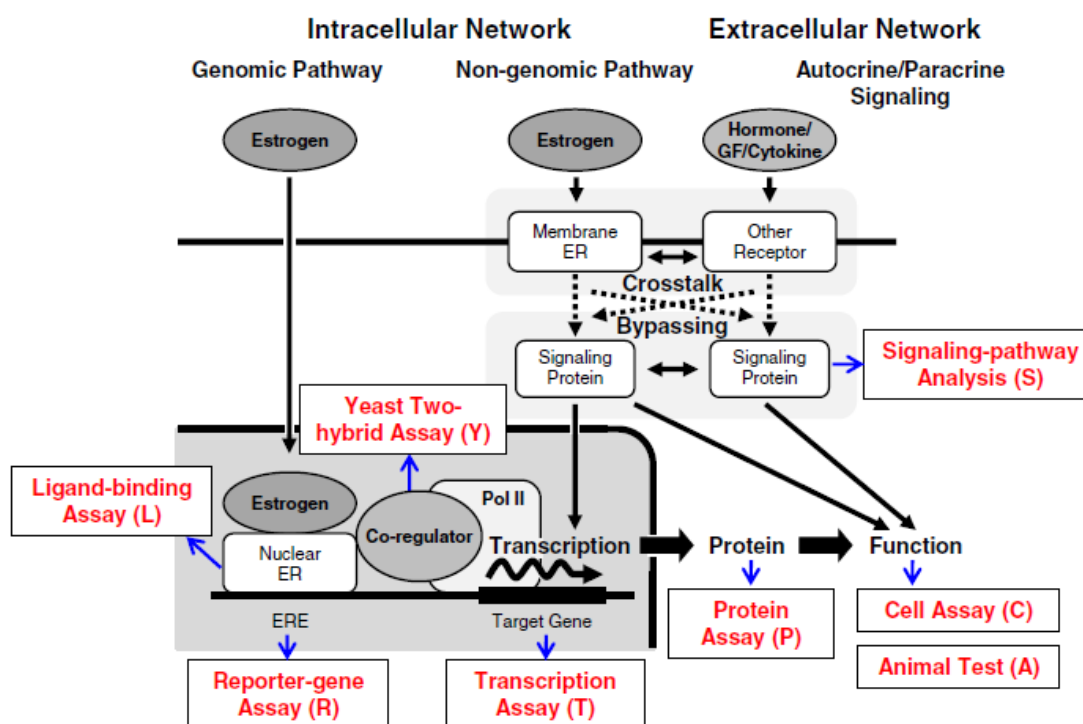


Imagen libre de derechos obtenida de Kiyama y Wada-Kiyama, (2015)

1.3. PRINCIPALES ISOTIPOS DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Los procesos de perturbación de la correcta función hormonal se producen por la interacción de xenobióticos con los receptores hormonales, de ahí que se les conozca como perturbadores endocrinos (del inglés, *Endocrine Disrupter*, ED, lo que ha propiciado la adaptación del término como *disruptores* endocrinos). Entre las interacciones más evaluadas se encuentran las relacionadas con los receptores estrogénicos α y β (ER α y ER β). Regulan importantes funciones fisiológicas y, por ende, los efectos derivados de la alteración de su equilibrio podrían ser importantes, de ahí la necesidad de ser estudiados. Inicialmente se conocía la existencia del receptor α , el cual se consiguió clonar en 1986 (Greene *et al.*, 1986; Gren *et al.*, 1986), y casi diez años más tarde, en 1995, el receptor estrogénico β (Kuiper *et al.*, 1996). De ellos a su vez se han descrito varios isotipos. Ambos subtipos son homólogos en un 56%, aunque cada uno de ellos posee patrones de expresión concretos y funciones diferentes (Lemaire *et al.*, 2006).

RECEPTOR ERA: En los últimos años se han detectado y estudiado variaciones del receptor ER α y al igual que en el caso de su homólogo β , existen tanto diferencias estructurales como funcionales entre ellos. El isotipo salvaje es el ER α 66, y variaciones de éste dan lugar a, entre otras, las siguientes isoformas (Sotoca *et al.*, 2012):

ER α 46: Detectado en osteoblastos, células endoteliales y en la línea celular tumoral mamario MCF7. Carece de actividad AF-1 (responsable de la transactivación independiente del ligando) y no induce proliferación dependiente de estradiol. Curiosamente, posee características similares al ER β , ya que presenta gran actividad de transcripción ligando-dependiente gracias a la presencia de AF-2 y actúa como inhibidor de ER α AF-1. Si se co-expresan la forma original y el ER α 46, se produce una inhibición de la proliferación celular dependiente del estradiol.

Otra variación de receptor alfa es el ER α 36: No posee actividad de transcripción puesto que no presenta AF-1 ni AF-2, aunque sí es un potente inhibidor de ER α y ER β dependiente de transactivación. Este ER α 36 se ha detectado en la membrana plasmática, por lo que se piensa que participa en los mecanismos de acción no genómicos.

Existen, además de estos ER α 36, ER α 46 (también conocido como ER α Δ 1), el ER α Δ 2, ER α Δ 3, ER α Δ 4, ER α Δ 5, ER α Δ 6, ER α Δ 7, ER α Δ 5,7.

Se han citado tan sólo algunos ejemplos de las variantes detectadas para un receptor estrogénico, y las diferencias funcionales existentes entre ellos. En la Tabla 4 se resumen los aspectos más destacables para los isotipos de ER α más relevantes.

Tabla 4. Isoformas y funciones destacadas de los ER α más relevantes.

Tipo	Características	AF-1	DBD	LBD	AF-2
ER α 66	Forma salvaje	+	+	+	+
ER α 46	Proliferación no dependiente de E2. Acción genómica opuesta a ER α 66 y ER β . Inhibidor de AF-1 dependiente de transactivación. Potente actividad de transcripción dependiente de AF-2 ligando	-	+	+	+
ER α 36	Acción genómica opuesta a ER α 66. Puede activar la vía de acción no genómica MAPK/ERK. Actividad transcripcional indirecta. Inhibidor de la transcripción dependiente de ER α y ER β .	-	+	+	-
ER α 80	No descritas.	+	+	+	+
ER α Δ 2	No interviene en la regulación de la transcripción.	-	-	-	-
ER α Δ 3	Se une al ligando. Dominante negativo en ERE. Interactúa con AP-1. Suprime la expresión génica estimulada por E2	+	-	+	+
ER α Δ 4	Efecto negativo dominante del efecto de la transcripción.	+	-	-	+

Tipo	Características	AF-1	DBD	LBD	AF-2
ER α Δ 5	Efecto positivo dominante del efecto de la transcripción. Dominante negativo en ERE. Se co-expresa con ER α e incrementa a ERE-Luc	+	+	-	-
ER α Δ 7	Se dimeriza con ER α y ER β . Se une a ERE. Efecto Dominante negativo transcripcional.	+	+	+	-

Tabla obtenida de Sotoca et al., (2012)

RECEPTOR ERB: En los últimos años se han detectado varias isoformas, como ER β cx/ER β 2, ER β 3, ER β 4 y ER β 5, los cuales se diferencian entre sí por pequeñas regiones de aminoácidos que les permite desempeñar funciones distintas (Moore et al., 1998).

Un ejemplo es la variación en el ER β de un aminoácido en la región de unión del ligando del receptor original, denominado ER β -503. Dicho isómero posee menor afinidad hacia el estradiol que la forma beta original. A pesar de ello, tanto el receptor ER β original como ER β -503 se unen al receptor de respuesta estrogénica (ERE) formando un heterodímero con otro ER β . Otra isoforma relevante es el ER β cx. A diferencia de las isoformas mencionadas, el ER β cx no parece tener actividad tras unirse a un ligando, ni activa la transcripción de genes con afinidad a estrógenos. Al parecer, el subtipo ER β cx se une preferentemente al ER α (en contra de lo descrito para los anteriores ER β) inhibiendo su región de unión al ADN. De esta manera, parece que existe un efecto negativo del subtipo ER β cx sobre la transactivación del ER α (Nilsson y Gustafsson, 2000).

A continuación, se indican algunas de las diferencias descritas para el ER β frente a otros receptores estrogénicos:

- ER β da lugar a efectos opuestos a la acción proliferativa del ER α en células mamarias (Omoto et al., 2003).

- La afinidad de ERβ1 por el estradiol es aproximadamente la mitad que la de ERα (Hall y McDonnell 1999).
- ERβ2 se une escasamente al E2 (Ogawa *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2003).
- ERβ1 induce menor respuesta de transcripción de ERE que ERα (Cowley y Parker, 1999).
- ERβ2 no se une al ADN, o lo hace en mucho menor grado que ERβ1 (Moore *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2003).
- ERβ2 inhibe la unión de ERα a los ERE en presencia de ERα pero, en ausencia de este último, puede sustituirlo parcialmente (Lemaire *et al.*, 2006) lo que sugiere que ERβ2 podría actuar como regulador dominante negativo en ER.

En resumen, la amplia variedad de subtipos y funciones de cada uno de ellos permite una regulación del efecto final, destacando la mayor afinidad del E2 por el ERα frente a la demostrada por el ERβ (Bovee *et al.*, 2004; Veld *et al.*, 2006), lo cual implica que los ERα promueven el crecimiento y la supervivencia de células epiteliales mamarias sanas y tumorales (Chan *et al.*, 2016). Por su parte, ERβ inhibe la activación de la transcripción de ERα, y, por tanto, la proliferación celular. Curiosamente en aquellas células en las que no se expresa el isómero α, parece ser que ERβ suple parcialmente sus funciones (Lindberg *et al.*, 2003). En la Tabla 5 se recogen los mecanismos de cada isoforma de ERβ.

Tabla 5. Isoformas y funciones destacadas de los ERβ más relevantes

Tipo	Características	AF-1	DBD	LBD	AF-2
ERβ1	Forma salvaje	+	+	+	+
ERβ2	Se dimeriza con ER β1 y ERα No se une al ligando.	+	+	+	-
ERβ3	Se dimeriza con ER β1 No se une al ligando.	+	+	+	-
ERβ4	Se dimeriza con ER β1 y ERα No se une al ligando.	+	+	+	-
ERβ5	Se dimeriza con ER β1 y ERα No se une al ligando.	+	+	+	-

ER β Δ 5	Efecto negativo sobre ER β 1 y ER α .	+	+		
ER β Δ 1,2,5	Reduce la actividad ligando-dependiente y la actividad ligando independiente.	-	+	-	+
ER β Δ 1,2,5,6	Reduce la actividad ligando-dependiente y la actividad ligando independiente.	-	+	-	+

Tabla obtenida de: Sotoca et al. (2012)

1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

De lo expuesto anteriormente se extrae que la respuesta depende del tipo de receptores expresados en cada tipo celular. No obstante, no se conoce la presencia, abundancia y efecto de cada subtipo de receptor en todas las especies.

Los receptores estrogénicos se distribuyen por todo el organismo para poder llevar a cabo las funciones en las que están implicados (como la regulación del desarrollo del individuo, la diferenciación, crecimiento, homeostasis y metabolismo celular por activación o represión de la expresión de genes). Lógicamente, los tejidos donde se localizan estos receptores son los que están directamente involucrados con las funciones mencionadas: tejido reproductor, cerebro, pulmón, colon, próstata y sistema cardiovascular entre otros. No obstante, la presencia de ER α , y ER β en varios órganos, no implica que en todos ellos se expresen ni ambos subtipos, ni en la misma proporción (Sotoca et al., 2012).

La expresión desigual induce a pensar que cada uno de ellos desempeña una función diferente, como ya se ha mencionado. Ambos receptores (α y β) están presentes en cerebro, pulmón, útero, tejido mamario, corazón e intestino (Taylor et al., 2000). El ER α es el más extendido y el que más se expresa de los dos, en útero, vagina, hígado y pituitaria (Nilsson et al., 2001); frente al ER β , que se expresa escasamente en tejido uterino (Frasor et al., 2003), aunque Taylor et al. (2000) señalan que el subtipo ER α es el único que se expresa en hepatocitos y en el hipocampo. En cambio, de los dos tipos de receptores, el predominante en próstata, vagina y cerebelo en humanos es el receptor ER β . Estudios en rata han demostrado que ER β se expresa en ovario, próstata, epidídimo, pulmón, hipotálamo y vejiga (Kuiper y Gustafsson, 1997). En la Tabla 6 figuran los tejidos en los que se ha descrito la presencia o ausencia de ERs, y los subtipos presentes en el ser humano.

Tabla 6. Localización de ER α en el ser humano

Tejido/órgano	Subtipo de ER (humano)		Tejido / órgano	Subtipo de ER (humano)	
	ER α	ER β		ER α	ER β
Corazón	✓	✓	Adrenales	✓	
Pulmón		✓	Riñones	✓	✓
Tejido Vascular	✓	✓	Próstata		✓
Vejiga		✓	Testículos		✓
Epidídimo		✓	Cerebro	✓	✓
Pituitaria		✓	Timo		✓
Hígado	✓		Tejido mamario	✓	✓
Músculo			Útero	✓	✓
	ER α	ER β		ER α	ER β
Tejido graso			Endometrio	✓	✓
T. gastrointestinal		✓	Vagina	✓	
Colon		✓	Trompas de Falopio		✓
Intestino delgado		✓	Ovario	✓	✓
Hueso		✓			

Tabla obtenida de Sotoca *et al*, (2012).

Esta información podría ser útil a la hora de diseñar experimentos *in vitro* con líneas celulares. Conocer la expresión de los receptores es fundamental si el objetivo del estudio es la evaluación de un efecto asociado a receptores estrogénicos.

1.5. REACCIONES CRUZADAS DE LA SEÑAL ESTROGÉNICA

Los productos de síntesis de unas rutas metabólicas a menudo participan en otras reacciones bioquímicas (Shanle y Xu, 2010). Queda implícito, por tanto, que la alteración en una de las vías metabólicas repercutirá en el resto de procesos implicados si la célula no logra detectar y subsanar las alteraciones. Del mismo modo, las posibles anomalías podrían subsanarse por más de un mecanismo. Por lo tanto, el entramado de reacciones es complejo y no está completamente clarificado. A pesar de ello, se ha evidenciado que juegan un papel fundamental en la respuesta estrogénica los andrógenos, la familia enzimática CYP y la aromatasa, los procesos de estrés oxidativo celular, así como la participación del receptor arilo hidrocarbónico (AhR). Todos estos “actores” son piezas clave en el engranaje de la respuesta estrogénica al estar íntimamente interconectados.

El receptor arilo hidrocarbano (AhR) juega un papel fundamental en la regulación de las enzimas metabólicas del organismo (Shanle y Xu, 2010). Pertenece a la familia de proteínas reguladoras de genes helix-loop-helix- PAS (bHLH-PER-ARNT-SIM) (Gu *et al.*, 2000), frente a los receptores estrogénicos que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de transcripción. A pesar de esta diferencia, presentan similitudes. El AhR requiere de la unión a sus ligandos, que en muchas ocasiones comparte con el receptor estrogénico, como los hidrocarbano aromáticos policíclicos (PAH) o hidrocarbano aromáticos halogenados (HAH) (Shanle y Xu, 2010). Tras la unión de estos compuestos al AhR, se desencadena una actividad antiestrogénica (Safe *et al.*, 1991, 2003; Spink *et al.*, 1990). Al igual que el ER, en ausencia de ligando, el AhR permanece también en el citosol unido a proteínas, entre las que se encuentra la proteína de shock térmico Hsp90 y el co-factor p23 (Kazlauskas *et al.*, 1999; Perdew, 1988; Wilhelmsson *et al.*, 1990). En presencia del ligando, el AhR cambia su conformación dejando accesible su región nuclear, se disocia del complejo citosólico y migra al núcleo donde se heterodimeriza con un translocador nuclear del receptor arilo hidrocarbano (ARNT) (Reyes *et al.*, 1992). Precisamente dicho ARNT se ha propuesto como co-activador tanto de ER α como de ER β , siendo más potente sobre el ER β , permitiendo una mayor transcripción del mismo (Shanle y Xu, 2010).

Por otro lado, en la síntesis de estrógenos participa el citocromo P450 o CYP (CYP, del inglés *Cytochrome Pigment 450*). Precisamente, el citocromo P450 monooxigenasa-dependiente (CYP) 1A1 es uno de los genes diana del AhR. La participación del citocromo es imprescindible en la actividad de ambos receptores (ER y AhR). Entre otros procesos, CYP11A participa en la síntesis de estrógenos con la conversión de colesterol en andrógenos (Ghayee y Auchus, 2007; Miller, 1988). Los andrógenos (precursores de los estrógenos) requieren de la actividad aromatasa, conocida como CYP19A1, necesaria en las reacciones de transformación de andrógenos en estrona y estradiol (Nebert y Russell, 2002). Por tanto, la inducción del citocromo podría incrementar el metabolismo de E2 y, por consiguiente, disminuiría la respuesta estrogénica. Además, el AhR podría competir por los cofactores disponibles impidiendo su participación en la señal estrogénica, lo cual podría inhibir la potencial respuesta de los ER (Beischlag *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1999). Incluso se ha propuesto que el AhR podría unirse directamente a los genes promotores de los ER y afectar así a la transcripción de ER (Ahmed *et al.*, 2009).

Los andrógenos juegan un papel relevante en la función estrogénica, puesto que regulan la actividad proliferativa de éstos, tal y como recogen Aubé y colaboradores en su artículo de 2008. Ambos receptores comparten co-activadores, por ello se autorregulan, o se ven influenciados de la misma manera. Los receptores androgénicos también se localizan en la glándula mamaria, al ser éste un tejido diana para los andrógenos. Los andrógenos pueden antagonizar el efecto de los estrógenos en el desarrollo de la glándula, controlando la proliferación de la misma (Aubé *et al.*, 2008). Así, los perturbadores endocrinos pueden interferir en la respuesta estrogénica actuando directamente sobre el AhR o bien sobre alguna de las familias del CYP que regula dicho receptor.

Se han descrito muchas interacciones entre xenobióticos y algunos de los sistemas enzimáticos mencionados, como la capacidad del dieldrín y el endosulfán de modificar la actividad enzimática del citocromo P-450 (también denominado CYP450) responsable del metabolismo del 17 β -estradiol o E2 (Grünfeld y Bonefeld-Jorgensen, 2004). En los apartados relativos a los compuestos analizados, y la discusión de sus resultados, se aportan más datos relativos a estos aspectos.

2. MECANISMOS DE ACCIÓN RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN ENDOCRINA

Tras lo expuesto, es fácil deducir que la respuesta estrogénica se puede modificar no sólo por la unión directa/indirecta de los perturbadores endocrinos al ADN por medio de los *Elementos de Respuesta Estrogénica* (es decir, mimetizando la acción de una hormona endógena), sino también por la alteración de cualquier proceso que participe en la función y regulación normal de los receptores.

Tras la interacción entre el DE y el sistema endocrino puede producirse una estimulación (al actuar como agonistas) o una inhibición (por acción antagonista) del efecto. Como consecuencia, se produce una sobreproducción o un déficit hormonal. Además, puede verse afectada la síntesis, el almacenamiento/obtención, el transporte/eliminación y el reconocimiento del receptor/unión o una respuesta posterior a la unión al receptor (Colborn *et al.*, 1993; Crisp *et al.*, 1998).

Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales los DE ejercen su acción, pudiendo ser incluso, combinación de varios de ellos para un mismo compuesto o mezcla (Tapiero *et al.*, 2002). Además, los metabolitos pueden presentar un carácter distinto al de su molécula de origen, como el caso del DDT agonista estrógeno, que se metaboliza en el DDE, antagonista androgénico (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Tal y como recoge Tapiero *et al.* (2002), los mecanismos de acción propuestos más aceptados son los siguientes:

- Mimetizando la respuesta hormonal propia de dicha interacción.
- Desencadenando una respuesta impropia o impidiendo la respuesta adecuada al bloquear el lugar de unión entre receptor y ligando natural.
- Interactuando con otros receptores y desencadenando una reacción nueva o bien interfiriendo indirectamente con la acción normal.
- Modificando la producción y la respuesta de los receptores hormonales y hormonas modificando así la respuesta endocrina.

2.1. FACTORES A TENER EN CUENTA EN LA RESPUESTA ESTROGÉNICA

A lo largo del capítulo se han ido exponiendo los aspectos más destacados de la respuesta estrogénica a nivel molecular principalmente. No obstante, en la complejidad del proceso se han de tener en cuenta, además, los condicionantes intrínsecos de la especie y del individuo. Resulta obvio, ya que el impacto de la exposición a un DE no es el mismo en un embrión (donde se desarrollan los procesos de diferenciación de los órganos sexuales, y del sistema nervioso, por ejemplo) que en un adolescente (periodo en el que se expresan los caracteres sexuales secundarios) que en un adulto (donde el nivel hormonal normal del individuo es menos fluctuante e importante en el desarrollo del individuo) (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). De este modo, la exposición de un macho a niveles elevados de xenoestrógenos puede tener consecuencias más o menos severas en función de la edad del sujeto, por ejemplo. Se deduce, por tanto, que el género también es un factor determinante en la respuesta final, al igual que también juegan un papel fundamental la dieta, hábitat y la ocupación laboral, si se trata del ser humano. Sin olvidar, que en el desarrollo de la respuesta son fundamentales las características moleculares de las que dependen los

procesos de toxicocinética, la interacción con otros compuestos o el tipo de molécula, y por supuesto, la concentración del compuesto o mezcla (Gross-Sorokin *et al.*, 2006).

2.2. PARTICULARIDADES DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Una vez abordado el funcionamiento del sistema hormonal, las características de los distintos tipos de ER, y los mecanismos de acción de la función estrogénica, se procede a entrar en materia sobre los Disruptores Endocrinos.

El abanico de compuestos capaces de actuar como perturbadores endocrinos es muy amplio. Entre ellos, se citan hormonas naturales y sintéticas como el dietilestilbestrol, fitocompuestos, componentes plásticos y relacionados (como el Bisfenol A o los ftalatos), productos secundarios de procesos industriales (PCB, bifenilos polibrominados, dioxinas), productos sintéticos empleados como solventes industriales, plaguicidas (entre otros, el aldrín, dieldrín, endrín, metoxicoloro, DDT y sus metabolitos, lindano o heptacloro entre otros) (Zala y Penn, 2004), así como fungicidas y fármacos también se engloban dentro de los perturbadores endocrinos (Mnif *et al.*, 2011; WHO/IPCS, 2002). A pesar de la naturaleza tan heterogénea que caracteriza a estos compuestos, muchos tienen en común la presencia de anillo fenólico en su estructura química, que es la que, al parecer, interactúa con los receptores estrogénicos dando lugar a una respuesta agonista o antagonista (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Las características de los DE hacen complicada la interpretación de resultados entre distintos estudios *in vitro*, así como la extrapolación a otros sistemas de evaluación (tanto *in vitro* como *in vivo*). A continuación, se citan las singularidades más destacables que caracterizan a estos compuestos:

- Los DE actúan por medio de más de un mecanismo de acción, como puede ser la capacidad de algunos de ellos, de interferir sobre receptores estrogénicos o androgénicos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).
- Algunos productos de degradación de los DE pueden mostrar características diferentes a las de sus compuestos originarios. Un ejemplo conocido es el agonista estrogénico DDT que se metaboliza a DDE, con capacidad antagonista androgénico (Diamanti-Kandarakis

et al., 2009). No siguen un patrón único dosis-respuesta o causa-efecto (WHO/UNEP, 2013).

- Los efectos detectados en el ambiente no son fácilmente reproducibles a nivel experimental, ni tampoco los datos recopilados experimentalmente en sistemas *in vivo* son siempre los mismos que se puedan observar en ambientes no controlados (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).
- No poseen una concentración por debajo de la cual se consideren “seguros” al no derivarse efectos adversos, dando lugar a curvas dosis-respuesta con forma de J, U o incluso una U invertida (Vandenberg *et al.*, 2012).
- Pueden producirse efectos adversos más elevados a dosis bajas que a dosis elevadas (Zala y Penn, 2004).
- Pueden desarrollarse efectos específicos en determinados tejidos en función de la etapa de desarrollo vital del individuo expuesto (WHO/UNEP, 2013).

3. ANOMALÍAS ASOCIADAS A DISRUPTORES ENDOCRINOS

La actividad humana y la contaminación ambiental forman un binomio indivisible que ha conllevado junto con los fenómenos de transporte en el ecosistema, a la presencia de contaminantes en cualquier punto del planeta, de tal modo que no es posible hablar de “nivel cero de exposición”, tratándose de un problema global. Basta mencionar la detección de contaminantes orgánicos persistentes en el ártico, (como PCB, DDT, HCH, y clordano) para evidenciar que el uso de compuestos no limita a dicho territorio la presencia de los productos y, por consiguiente, tampoco limita la posibilidad de que se produzcan efectos adversos en los organismos únicamente en dicha región (Ritter *et al.*, 1995).

Según fuentes de la EPA, se deberían investigar 87.000 sustancias químicas para determinar su potencial disruptor endocrino, aunque esta cifra podría aumentar anualmente (Imazaki *et al.*, 2015). Sin embargo, muy pocos están siendo investigados en ensayos *in vivo* (Bergman *et al.*, 2013) y los estudios *in vitro*, en muchas ocasiones, no contemplan la exposición de mezclas ni abarcan el estudio de todos los efectos indeseados posibles.

A pesar de estas cifras, Zala y Penn (2004) resaltan la carencia de estudios en los que se evalúen alteraciones cognitivas y del comportamiento, aunque hay constancia de se producen tanto en fauna como en el ser humano. La falta de datos es debida a que no es frecuente que se incorporen estos ítems en los estudios sobre disrupción endocrina. Por tanto, al no ser objeto del estudio, aunque se manifiesten pasan desapercibidos, existiendo la posibilidad de catalogar como inocuo un compuesto capaz de producir efectos de esta naturaleza.

La modificación de conductas como la sexual, comunicación, dominancia, agresión y aptitudes cognitivas (todas ellas fundamentales en la estructuración de las poblaciones animales), están influenciadas por el sistema endocrino, por lo que la exposición a perturbadores hormonales puede repercutir sobre ellos (Zala y Penn, 2004). La modificación de estas conductas depende de factores como el compuesto implicado, especie, e incluso el hecho de seleccionar determinadas cepas de animales seleccionados para estudios *in vivo*. De esta manera, ensayos sobre el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) expuestos a niveles ambientales de etinilestradiol (estrógeno sintético empleado como anticonceptivo), alteraron la agresividad y el comportamiento de cortejo, disminuyendo el comportamiento territorial y agresivo propio de la especie (Bell, 2001). Sin embargo, la exposición en una cepa de roedores de laboratorio a una mezcla de plaguicidas y fertilizantes demostró una respuesta opuesta, ya que se incrementó la agresividad (Porter *et al.*, 1999). Estos cambios en los patrones de conducta y en la reacción a situaciones de estrés se debe a la afección del tiroides, glándula que regula el metabolismo y actividad del individuo. Se ha documentado en anfibios, aves y mamíferos, advirtiéndose una disminución de la natación, reducción del canto y modificación del patrón de vuelo y cortejo. En mamíferos los DE afectan a la motivación y la curiosidad del individuo. Además, se ha visto que ciertos DE afectan a la ansiedad y comportamiento exploratorio de manera inesperada (Zala y Penn, 2004).

Si se hubiera prestado la suficiente atención y se hubiera tenido en cuenta la relevancia de sucesos acaecidos en animales, quizá se podrían haber tomado medidas para que casos similares no ocurrieran en el ser humano. Sólo tras la aparición de acontecimientos muy notorios, se comenzó a profundizar en la relación entre compuestos químicos y su repercusión sobre la salud humana y medioambiental. En este sentido, cabe mencionar la constatación de la existencia de compuestos que afectan indirectamente en el

comportamiento al modificar el metabolismo (Zala y Penn, 2004). Estudios realizados Berril *et al.* (1998) con ranas expuestas a endosulfán, presentaron alteración de la conducta de locomoción, haciéndolas más susceptibles a la depredación. Además, el incremento de ciertas patologías en países industrializados sugiere la implicación de los DE en éstas. Otros ejemplos son el incremento de la infertilidad en el ser humano, aunque también se les vinculan con el incremento de problemas de aprendizaje y conductuales, y con problemas de atención e hiperactividad (Schettler *et al.*, 2000). Pero, además, se han producido sucesos en fauna silvestre tan recordados como la disminución de la población de águila calva de Florida (*Haliaeetus leucocephalus*) por DDT (Broley, 1958), anomalías morfológicas y hormonales en cocodrilos en el lago Florida por dicofol (Guillette *et al.*, 1994; L. J. Guillette, 2000), o la disminución de la población de la pantera de Florida (Facemire *et al.*, 1995), entre otros. Sin embargo, un fenómeno constatado en mujeres embarazadas vinculado al dietilestilbestrol, parece que fue el detonante que sirvió para tomar conciencia real de la problemática (Zala y Penn, 2004).

3.1. EN EL SER HUMANO

A pesar de que las anomalías cognitivas no suelen ser objeto de estudio en los trabajos sobre disrupción endocrina, se han demostrado gracias a estudios realizados en áreas agrícolas y áreas control con niños de varios grupos de edad, manifestando problemas en el desarrollo de habilidades, capacidad locomotora, deficiencias mentales y neurológica, así como problemas de memoria (Guillette, 2000). También se comprobó que niños expuestos a PCB adoptaban comportamientos poco masculinos, mientras que las niñas desarrollaban patrones más masculinos (Vreugdenhil *et al.*, 2002). Pero no sólo se han detectado anomalías en individuos de la misma generación, sino que se han relacionado alteraciones en la descendencia de progenitores expuestos. En relación a ello, se ha vinculado la manifestación de un comportamiento más femenino en hijos de ambos sexos cuyos progenitores se vieron expuestos a dioxinas. Además, los PCB también se relacionan con fallos en funciones cognitivas, con niños con bajo peso al nacimiento y circunferencia craneal más pequeña. Sorprendentemente, la asociación entre PCB y comportamiento en humanos se ha podido apoyar con resultados experimentales en animales (Zala y Penn, 2004). Estas son tan sólo algunos ejemplos sobre evidencias sólidas de los efectos perjudiciales asociados a los DE sobre el comportamiento y la capacidad cognitiva (Stein *et al.*, 2002).

Del mismo modo, se han descrito otro tipo de anomalías del comportamiento nada desdeñables, como el incremento de autismo y otras alteraciones del desarrollo neuronal, que podrían estar detrás del incremento de la síntesis de productos como el DDT, bisfenol A y PCB, entre otros, durante los años 1920 y 1940. Se ha comprobado que niños nacidos en ese periodo tendrían descendencia en la década de los 70, año en el que se comenzó a detectar un incremento inusual de alteraciones del desarrollo neurológico en niños (autismo, desórdenes de hiperactividad, diabetes juveniles, alteraciones del comportamiento). No sólo ello, sino que incluso se incrementó el suicidio en jóvenes de 15-19 años que nacieron en la década de los 50. Por otro lado, se comprobó, que los desórdenes de atención e hiperactividad, autismo, y alteraciones tiroideas, son más frecuentes en niños que en niñas (en una proporción de 4 a 1) (Colborn, 2004).

Pero quizá, las afecciones más populares achacadas a los perturbadores hormonales, sean las relacionadas con el sistema reproductor, ya sea por un desarrollo inapropiado de la anatomía o de sus funciones. Una patología frecuente es el desarrollo de tumores en estos tejidos. Aunque también se ha descrito un incremento de cáncer de otra naturaleza, alteración del sistema inmunitario, de la función tiroidea y con frecuencia, afecciones cognitivas (WHO/UNEP, 2013). Muchos autores e instituciones se hacen eco de este tipo de procesos mencionados, entre los que cabe citar a Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009), Zala y Penn, (2004), aunque a continuación se plasman algunos destacados del documento de la WHO/UNEP (2013):

- Desarrollo mamario temprano en niñas, siendo un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama.
- Incremento en los últimos 40-50 años de cánceres hormono-dependientes, (endometriales, mamaros, prostáticos, testiculares y tiroideos, principalmente). En concreto, se ha detectado mayor riesgo de padecer cáncer de tiroides en personas que están habitualmente en contacto con pesticidas, y un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata en hombres expuestos a plaguicidas, ciertos PCB y arsénico.
- Disminución de la calidad seminal en más del 40% de hombres jóvenes a nivel mundial, entre los años 1938 y 1991, viéndose afectada la capacidad de fecundación.

- El déficit de ciertas enzimas detoxificadoras en mujeres expuestas a PCB y dioxinas se ha considerado un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama.
- Incremento de diabetes tipo II en los últimos 40 años.
- Mayor incidencia de criptorquidismo e hipospadias.
- Mayor número de casos de nacimiento de niños prematuros y con bajo peso al nacimiento.

En muchos casos, estas anomalías se han vinculado a compuestos que se emplearon en grandes cantidades durante los años previos a su prohibición (como PCB, DDT, DDE, DES, plaguicidas en general, ftalatos, PBDEs o bisfenol A, entre otros), dando lugar a una exposición ambiental y ocupacional considerable en determinados sectores de la población.

3.2. EN LA FAUNA SILVESTRE

En fauna, al igual que sucede en el ser humano, muchos compuestos designados como perturbadores endocrinos se han asociado con anomalías del sistema reproductor, alteraciones de comportamiento, inmunodeficiencias e incremento de tumores (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

A pesar estas coincidencias, es preciso reseñar las particularidades de la evaluación del riesgo de la exposición de los DE y sus efectos en fauna. No sería prudente establecer dos grupos, entre los que extrapolar la información (fauna vs ser humano), actuando como si el conjunto animal fuera homogéneo en sí mismo. No hay que obviar las particularidades de cada conjunto (*phylum* y clase), ya que pueden influir sobremanera en la respuesta observada y ser una de las causas de que un compuesto difiera en su toxicidad entre distintas especies (Orlando y Guillette, 2007). Algunas de las consideraciones a tener en cuenta entre los distintos grupos son la vía de exposición predominante, hábitat, complejidad del sistema endocrino, posición en la cadena trófica, tipo de alimentación, procesos de hibernación, migración o periodo de incubación (WHO/IPCS, 2002); teniendo en consideración también las particularidades interespecíficas como que los animales piscívoros son más susceptibles a los procesos de bioacumulación de compuestos presentes en el agua;

en cambio, los herbívoros están más expuestos a herbicidas y ciertos fitosanitarios que otros grupos animales (WHO/IPCS, 2002).

Del mismo modo, es importante destacar las diferencias en la regulación hormonal entre las distintas categorías del reino animal. De ahí, que aquellos que poseen estadios de desarrollo dependientes de hormonas, sean más vulnerables frente a los DE, como los procesos de metamorfosis de invertebrados y anfibios. De hecho, existen diferencias importantes entre vertebrados e invertebrados. En estos últimos, participan proteínas y hormonas distintas a las presentes en los vertebrados (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009), por lo tanto, los resultados de ensayos con modelos animales invertebrados *in vitro* no siempre se reproducirán en otras especies, por lo que la extrapolación de resultados debe ser cuidadosa.

Un caso muy estudiado es la exposición de organismos acuáticos a estrógenos procedentes de anticonceptivos orales excretados vía urinaria, vehiculados en aguas residuales en la zona de influencia, que podrían provocar alteraciones en el desarrollo gonadal. Se han descrito modificaciones tan severas como feminización en peces macho, conocido como intersexos (Gross-Sorokin *et al.*, 2006), o el fenómeno documentado como imposex achacado al tributilestaño en gasterópodos, en el cual las hembras presentan superposición de órganos sexuales masculinos, incluido el pene y conductos deferentes (Horiguchi *et al.*, 2006). El fenómeno del imposex se detectó en gasterópodos expuestos a tributilestaño (TBT), un aditivo anti-incrustante incorporado en pinturas empleado con frecuencia en cascos de barcos (Bryan *et al.*, 1986). Una de las consecuencias más importantes de estas alteraciones del desarrollo de los órganos sexuales es la imposibilidad de reproducción del individuo. Algo similar ocurre en los intersexos en otras especies, consistente en la adaptación de órganos femeninos incluidos en estructuras masculinas que permiten la formación de una glándula prostática (Bergman *et al.*, 2013). Si la incidencia es elevada en una población, la viabilidad de la misma podría verse seriamente comprometida. También se ha comprobado la alteración en la ratio de sexos, un menor reclutamiento juvenil, incremento de testosterona en hembras, así como malformaciones en insectos (WHO/IPCS, 2002).

A pesar de la información disponible, las dificultades en la realización de estudios que permitan abarcar todos los posibles efectos, junto con la cantidad de hándicaps que condicionan el sistema hormonal ante la exposición de un DE, complican la posibilidad de obtener información fiable que permita asegurar que los efectos detectados son causa directa de la exposición de los compuestos evaluados. A pesar de ello, son muchas las voces que apuntan que, aun siendo conscientes de las dificultades para corroborar experimentalmente los hallazgos de la naturaleza, éstos deben ser tenidos en cuenta (WHO/UNEP, 2013). Sin embargo, no se puede obviar aquellos que critican precisamente esta relación de forma tan taxativa, como es el caso de Lamb *et al.* (2014) quienes señalan la falta de datos experimentales que corroboren los fenómenos de imposex e intersexos tras la exposición a xenocompuestos, evidenciando las lagunas de información en los que se basaron los estudios, a partir de los cuales se han realizado tales aseveraciones de causa-efecto.

Entre los compuestos vinculados a la alteración del sistema cognitivo, se encuentran las dioxinas, PCB, plaguicidas organoclorados y herbicidas, pero también metales como el cadmio, mercurio y el plomo (Schantz y Widholm, 2001). Posiblemente los efectos cognitivos se deban al impacto sobre el sistema nervioso, como es el caso de PCB, que afecta a la liberación de calcio en los canales neuronales (Schantz *et al.*, 1991). No obstante, se ha comprobado que mamíferos expuestos a PCB presentan deficiencias duraderas en el aprendizaje y memoria, dificultad en el cambio de comportamiento en respuesta a experiencias y retraso en el aprendizaje; mientras que en determinadas situaciones parece ser que las dioxinas facilitan el aprendizaje, en contra de lo anteriormente indicado (Zala y Penn, 2004).

A continuación, se presentan algunas características relevantes de cada grupo de vertebrados, que se han de tener en consideración a la hora de estudiar los procesos de disrupción endocrina. El tipo de contaminantes a los que se verán expuestos las poblaciones animales dependerán, en gran medida, de la actividad humana predominante en la zona de influencia.

- MAMÍFEROS

Como mamíferos, la exposición a través de la lactancia y la vía placentaria cobran especial relevancia, periodos en los que la actividad hormonal es muy elevada, y es necesario su normal funcionamiento para la correcta formación del embrión y del desarrollo postnatal. Estas primeras etapas de la vida del individuo son muy sensibles a la exposición de los disruptores, pudiendo provocar anomalías que se manifiesten, incluso, en la pubertad o edad adulta (WHO/IPCS, 2002).

Bajo éxito reproductivo, descenso poblacional, hiperplasia adrenocortical, osteoporosis, úlceras intestinales, malformaciones, arterioesclerosis, tumores uterinos, aumento de neoplasias, inmunodeficiencia, abortos, malformaciones, menor supervivencia y menor crecimiento, son algunas afecciones constatadas asociadas a insecticidas organoclorados, PCB, DDT y derivados y TCDD ((WHO/IPCS, 2002). Algunos ejemplos destacados en mamíferos, es la capacidad del DDT y PCB de alargar el ciclo estral e inducir la pubertad en roedores. Otro ejemplo es el metoxicloro, que se relaciona con cornificación vaginal y alteración del comportamiento maternal en ratones. Por su parte, las dioxinas causan retraso de la pubertad, estro constante y dificultad en la copulación por malformaciones vaginales (Zala y Penn, 2004).

- AVES

Las particularidades de las aves, en cuanto nivel de ingesta y metabolismo, podrían influir en los procesos de exposición a COP y sus efectos. En comparación con mamíferos de tamaño similar, las aves poseen un metabolismo y consumo de alimentos más elevado y, por tanto, cabe la posibilidad de que ingieran mayores cantidades de contaminantes en comparación a éstos. Pero, además, sufren periodos más o menos prolongados en los que sus reservas se movilizan, y con ellas, los compuestos almacenados en grasa, principalmente. Esta movilización podría dar lugar a una nueva exposición al volver a moverse en el torrente sanguíneo, periodos vinculados a las épocas reproductivas, donde las conductas propias de cada especie y las migraciones implican un descenso en la ingesta (WHO/IPCS, 2002).

Dioxinas, PCB, mirex, DDT y DDE, entre otros compuestos organoclorados, se han relacionado con feminización testicular, retrasos en la ovulación por efecto de DDT en codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*), mortalidad y malformaciones embrionaria. Pero también se han detectado variaciones comportamentales en gaviota occidental (*Larus occidentalis*), al formarse parejas únicamente por hembras que presentaban elevados niveles de DDT. Experimentalmente se comprobó que la exposición en huevos de gaviota a esos mismos niveles, ocasionó un anormal desarrollo sexual, feminización e intersexos en machos que implicaba el fallo reproductivo, alteración del comportamiento parental y del éxito reproductivo, así como una disminución en las poblaciones (WHO/IPCS, 2002; Zala y Penn, 2004).

Uno de los sucesos más citados en aves por disrupción endocrina es el adelgazamiento de la cáscara de huevo en aves expuestas a *p,p'*-DDE (Guillette, 2006; Lundholm, 1997). Sin embargo, el mecanismo de acción no está del todo esclarecido y hay discrepancias al respecto en la comunidad científica. Se ha comprobado que no todas las especies son igual de sensibles al *p,p'*-DDE, incluso los ensayos realizados sobre especies aviares frecuentes en ensayos experimentales parece que son resistentes a tal efecto (Scott *et al.*, 1975). Se ha relacionado tal efecto con la época de mayor uso del DDT, y el decrecimiento en sus poblaciones. Coincidiendo en el tiempo con la prohibición del DDT, muchas de éstas poblaciones aviares se han recuperado, sin embargo, persisten otras anomalías, como malformaciones anatómicas (WHO/IPCS, 2002).

Entre los mecanismos de acción implicados en el adelgazamiento de la cáscara, se han propuesto varias hipótesis a lo largo de los años. Inicialmente se consideró que el DDE podría interaccionar con el transporte del calcio desde el torrente sanguíneo hasta la glándula que aporta calcio durante la formación de la cáscara, provocando la disminución del grosor. También se propuso que podría actuar inhibiendo la anhidrasa carbónica, impidiendo así el aporte de carbonato para la formación de la cáscara, y a final de la década de los ochenta se propuso que podría alterar los receptores o función esteroidea. Las últimas observaciones apuntan a que el citado organoclorado inhibe la síntesis de prostaglandinas en la glándula de la mucosa, la cual participa en el control y regulación de la reproducción y en el depósito de calcio (WHO/IPCS, 2002c)(WHO/IPCS, 2002).

Pero, además, las aves son más sensibles a los estrógenos durante el desarrollo embrionario que los mamíferos. Evolutivamente esta particularidad permitió la diferenciación del sexo en las aves, ya que la exposición de estrógenos permite la involución del oviducto derecho y desarrollo del izquierdo, determinando el sexo del animal (WHO/IPCS, 2002).

También se han descrito numerosos casos de modificación del comportamiento sexual y reproductivo en aves. Estudios experimentales en tórtola (*Streptopelia sp*) con DDE dieron lugar a una reducción de los comportamientos de cuidado del nido y de cortejo (Heagele y Hudson, 1977). También se han relacionado modificaciones de la conducta y el abandono de huevos de aves de zonas contaminadas con PCB (McCarty y Secord, 1999a, 1999b).

- PECES

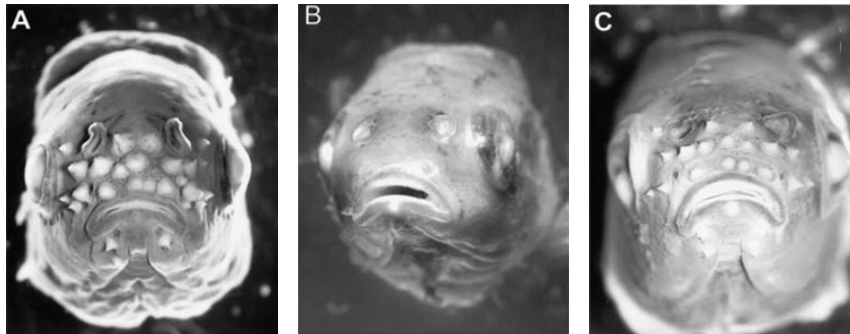
Debido a su naturaleza, las vías dérmica y respiratoria son muy importantes en la exposición a xenocompuestos. El grado de exposición y productos implicados depende, fundamentalmente, del tipo de actividad humana predominante en la zona: urbana, agrícola o industrial.

Se han detectado importantes anomalías en peces asociadas a disruptores endocrinos, como la síntesis de vitelogenina en machos (hormona femenina presente en peces), presencia de ovotestis, feminización de machos, ausencia de conductos deferentes, un menor tamaño gonadal, retraso en la madurez sexual, menor expresión de caracteres sexuales secundarios, masculinización de hembras, menor éxito reproductivo, alteración síntesis de hormonas esteroideas, alteración de la fisiología adrenal, mortalidad juvenil, disfunción tiroidea e intersexos (Jobling *et al.*, 2006, 1998; Purdom *et al.*, 1994). La viabilidad de las poblaciones en las que se produzca una elevada prevalencia de este tipo de alteraciones, se puede ver afectada al repercutir directamente en la reproducción de los individuos. Al igual que en los casos anteriores, también, en peces se han constatado alteraciones en el comportamiento de dominancia, modificándose la actitud defensiva de ciertas especies.

Las anomalías no sólo se pueden producir por xenobióticos, sino también por la exposición a niveles anormales de hormonas sexuales en individuos de sexo contrario.

Investigaciones realizadas por Ankley *et al.* (2001) sobre machos y hembras de ciprínidos (*Pimephales promelas*) expuestos al andrógeno sintético metiltestosterona, demostraron la masculinización de las hembras al desarrollarse los tubérculos nupciales característicos de los machos en hembras (Figura 5).

Figura 5. Aparición de tubérculos nupciales en ciprínidos (*Streptopelia promelas*) tras la exposición a metiltestosterona.



A. Macho control. B. Hembra control. C. Hembra expuesta a metiltestosterona (0,2 mg/l 12 días. Imágenes obtenidas de Ankley *et al.*, (2001), empleadas con el consentimiento del autor.

De carácter general, también se han comprobado en diferentes especies la alteración en la ratio de sexos y menor reclutamiento juvenil en peces. Independientemente del efecto desarrollado, un cambio en cualquier parámetro reproductor podría afectar severamente a la dinámica de poblaciones afectada, pudiendo incluso disminuir el número de individuos y su viabilidad (Zala y Penn, 2004).

- REPTILES Y ANFIBIOS

La variedad de diferencias de unas especies de reptiles a otras es, quizá, uno de los hándicaps más importantes a la hora de su estudio, puesto que son muchas las diferencias interespecíficas con las que se deben tener en cuenta a la hora de trabajar con ellos. Por ejemplo, dentro de este grupo encontramos especies vivíparas y ovíparas; especies con hábitats y peculiaridades morfológicas tan diferentes que abarcan desde lagartos hasta tortugas marinas; especies carnívoras y otras herbívoras; pero que todas ellas en general presentan un metabolismo lento, entre otras particularidades, que hacen muy complicada la extrapolación de resultados de unas especies a otras. A todo ello, hay que añadir la falta de conocimiento sobre la regulación de su sistema endocrino.

Compuestos como PCB, clordano, DDT, DDD, DDE, dicofol, dieldrín y mirex se han vinculado la disminución de poblaciones de cocodrilos, anormalidades gonadales y otras anatómicas de carácter dimórfico (Guillette *et al.*, 1999).

Al igual que los reptiles, los anfibios presentan particularidades que condicionan su estudio, como la relevancia de las hormonas tiroideas en la regulación de la metamorfosis de los anfibios. Además, se ha planteado que durante la hibernación los individuos son más sensibles a los tóxicos (WHO/IPCS, 2002).

Algunas de las alteraciones detectadas en anfibios se han asociado al DDT (y sus metabolitos) y al dieldrín son el cambio en las distribuciones de las poblaciones, alteración en forma y número de extremidades, alteraciones musculares y del SNC, y como en los casos anteriores, una disminución de poblaciones (WHO/IPCS, 2002). Por ejemplo, se han descrito alteraciones de la locomoción en ranas por exposición a endosulfán, haciéndolas más susceptibles a la depredación (Berril *et al.*, 1998).

- INVERTEBRADOS.

La regulación del sistema hormonal de los invertebrados no se conoce en profundidad, lo que dificulta la interpretación de posibles relaciones causa-efecto en estos organismos. En este grupo es frecuente el hermafroditismo, y no es extraño que no exista un dimorfismo muy patente (WHO/IPCS, 2002). Con apenas estas dos características citadas, basta para intuir que la regulación hormonal en ellos es compleja y que la detección y evaluación de los efectos por perturbadores endocrinos no es sencilla. Precisamente, los fenómenos normales de hermafroditismo son los argumentos que esgrimen varios autores para cuestionar los fenómenos de intersexos detectados en algunas especies o, al menos, para resaltar la necesidad de contrastar los hallazgos de la naturaleza en condiciones de laboratorio.

Entre los casos más recordados sobre anomalías del desarrollo en gasterópodos se encuentra el fenómeno imposex (Figura 6), vinculado al tributilestaño, como se ha mencionado con anterioridad.

Figura 6. Imposex en *Buccinum undatum* (genitales masculinos y femeninos)

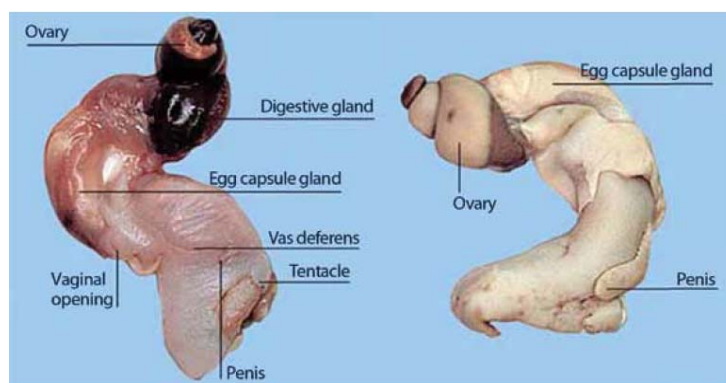


Figura obtenida de Bergman et al., (2013)

4.INTERACCIÓN DE LOS ORGANOCORADOS EN LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA

En este apartado se aúnan los dos ítems objeto de estudio, aportando datos sobre efectos de los organoclorados analizados asociados con la perturbación de la función endocrina, resaltando aspectos concretos de la interacción con la función estrogénica. Para no reiterar los efectos ya mencionados en el apartado de alteraciones asociadas a los DE, tan sólo se hace referencia a los mecanismos de acción por el cuál intervienen, o resultados de estudios no citados con anterioridad.

El mecanismo de acción específico por el cual los contaminantes actúan sobre la función estrogénica no siempre es sencillo de esclarecer. Sin embargo, sí se conoce para algunos casos, como el del metoxicloro, el cual posee actividad ER α -agonista, pero ER β antagonista y AR antagonista (Gaido *et al.*, 1999; Maness *et al.* 1998). Este producto (derivado del DDT) desencadena reacción estrogénica mediada por el receptor α en útero, vagina, cerebro y hueso (WHO/PCS/DEC, 2002). También se tiene constancia de que organoclorados como el DDT, dieldrín y endosulfán han sido catalogados como potencialmente estrogénicos, en base a estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (Andersen *et al.*, 2002; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 1997; Diel *et al.*, 2002; Scippo *et al.*, 2004; Wade *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1969).

La relación entre plaguicidas y cáncer de mama en mujeres ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones debido a las evidencias que los relacionan, aunque no siempre los resultados son concluyentes por falta de consistencia en los datos. Mnif *et al.*, (2011) citan la

detección de niveles elevados de PCB, DDE y DDT en tejido graso de mujeres con cáncer de mama. Además, se ha estimado que el riesgo de padecer este tipo de tumores es cuatro veces mayor en mujeres con elevados niveles de DDE en sangre. Incluso estudios epidemiológicos realizados en España, muestran que del total de casos de mujeres que padecían cáncer de mama entre los años 1999 y 2009, el 81% se dieron en áreas contaminadas con plaguicidas (Mnif *et al.*, 2011).

Desde finales de la década de los 60 se tiene constancia de que ciertos pesticidas actúan como agonistas estrogénicos, presentando incluso respuesta uterotrópica (Bittman *et al.*, 1969), del mismo modo que Dodds y Lawson (1938) detectaron actividad estrogénica en el bisfenol A y el DES (visto en (WHO/IPCS, 2002)). A pesar de que se ha conseguido confirmar dicha actividad, no siempre ha sido posible corroborarla *in vitro* e *in vivo* para una misma sustancia. Entre los compuestos estudiados *in vivo*, se encuentra el metoxicloro, clordecona, octilfenol, nonilfenol, bisfenol A y B, fitoestrógenos, etinilestradiol y micotoxinas (WHO/IPCS, 2002).

No obstante, a pesar de la información reflejada y aunque existen muchas evidencias que apuntan a la participación de los DE sobre ciertas patologías, no es posible establecer una relación directa entre ciertos datos epidemiológicos y la exposición a determinados compuestos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Para ello, sería necesario realizar una adecuada recogida de datos en los estudios epidemiológicos que permitan establecer una relación directa entre la exposición de DE y muchas de las alteraciones citadas debido a la falta de datos (WHO/UNEP, 2013).

4.1. DIFENILALIFÁTICOS

En la bibliografía científica es posible encontrar innumerables estudios sobre la capacidad que poseen estos compuestos de interactuar sobre los receptores estrogénicos y la intensidad en la respuesta. A pesar de ello, no hay consenso sobre los resultados de las investigaciones. En la disparidad de resultados intervienen factores tan importantes como la concentración empleada, tipo de estudio (*in vitro* o *in vivo*), línea celular empleada e incluso el derivado difenilalifático analizado (*o,p'*-DDT, o *p,p'*-DDT, por ejemplo). A raíz de estas divergencias, los resultados sobre la capacidad estrogénica varían desde débilmente hasta

completamente estrogénico. De cualquier modo, estudios en los que se aplicó el *E-Screen* han mostrado su carácter agonista estrogénico el *o*, *p'*-DDT, *p*, *p'*-DDD y el *p*, *p'*-DDT, y parcialmente agonistas el *p,p'*-DDE y el *p,p'*-DDD. Por su lado, el *p,p'*-DDE parece comportarse como parcialmente antagonista del efecto proliferativo (ATSDR, 2002). En cuanto al dicofol, también es posible encontrar estudios en los que se aluda a su capacidad estrogénica, y otros a su poder antiestrogénico (Okubo *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 1998). Por su parte, en el documento de Lemaire y colaboradores, se indica que el efecto inducido por el Σ DDT es debido a la unión competitiva con los receptores androgénicos, a la activación de la proliferación de células sensibles a andrógenos y a que son capaces de antagonizar al receptor de progesterona. En cambio, al dicofol se le asume la capacidad de inhibir la síntesis de andrógenos e incrementar la síntesis de estrógenos, al mismo tiempo que se indica que es capaz de unirse a receptores estrogénicos (Mnif *et al.*, 2011).

Como ya se ha apuntado, la extrapolación de la información procedente de los animales hacia el ser humano debe ser cuidadosa, y considerar las diferencias interespecíficas, intraespecíficas e incluso las diferencias entre tejidos. La afección del sistema nervioso central aparece tanto en el ser humano como en animales, por la exposición a dosis elevadas de difenilalifáticos. A pesar de que se considera que el metabolismo del DDT entre mamíferos es similar, existen diferencias destacables en cuanto a la capacidad de eliminación del organismo. En este sentido, las ratas son las que lo eliminan con mayor rapidez, seguido de perros y monos, siendo un proceso más lento en el ser humano. Estas diferencias podrían deberse a diferencias de afinidad de acción hacia determinados tejidos, así como de unión a moléculas. Probablemente esta sea la causa de que la actividad disruptora endocrina del DDT y sus análogos se haya comprobado en animales de experimentación y en fauna silvestre, pero no en humanos expuestos a DDT (ATSDR, 2002).

4.2. CICLODIÉNICOS

La actividad estrogénica del dieldrín, endosulfán y lindano se ha demostrado *in vitro* en células procedentes de tumor mamario en numerosos estudios (Lemaire *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 1995, 1994). Además, también se han catalogado como antagonistas androgénicos, así como que el lindano y el endosulfán inhiben la actividad aromatasa (Andersen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Nativelle-Serpentini *et al.*, 2003). Por su parte, Briz *et al.* (2011) fueron más allá

e indagaron en el mecanismo de acción por el cual estos compuestos desencadenan la acción estrogénica. Para ello, evaluaron su capacidad para desencadenar efecto estrogénico por mecanismos no genómicos, en tejido nervioso, detectando que el dieldrín, endosulfán y lindano interfieren con la función hormonal en dos poblaciones celulares neuronales, interactuando directamente con receptores estrogénicos. Finalmente, el lindano ha sido propuesto como ER α antagonista y ER β agonista (Li *et al.*, 2008; Maranghi *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que la exposición de sustancias como el endosulfán y el dieldrín, en presencia/ausencia de estradiol, son capaces de modificar los niveles de mRNA del ER α y ER β (Grünfeld y Bonefeld-Jorgensen, 2004). Del mismo modo, se conoce que el endosulfán comparte estructura química con hormonas esteroideas, las cuales interactúan con receptores estrogénicos, dando lugar a fenómenos de proliferación, transformación, diferenciación y migración de células mamarias cancerosas y ováricas sensibles a estrógenos en humanos (Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 1994; 1995; Watson *et al.*, 2007; Wong y Matsumara, 2006).

Finalmente, en la revisión de Mnif *et al.* (2011) se resumen los mecanismos de acción de diversos contaminantes, entre los que se encuentran algunos de los evaluados en esta tesis. En ella se indica que el aldrín se une de forma competitiva a los receptores androgénicos, al igual que el endosulfán I, el endosulfán II y el dieldrín. Éste último, también presenta efectos estrogénicos e induce su producción. En cuanto al heptacloro, se une a receptores estrogénicos y también androgénicos.

4.3. HEXACLOROCICLOHEXANOS

La implicación de los hexaclorociclohexanos en el sistema hormonal no está del todo esclarecida. El γ -HCH induce efectos sistémicos, pero su efecto por afectación del sistema endocrino resulta algo ambiguo. A nivel sistémico provocan convulsiones al antagonizar a receptores GABA (Briz *et al.*, 2011). Sin embargo, este producto no ha demostrado ser un fuerte agonista o antagonista ni de ER α , ni del receptor androgénico (AR), ni se comporta como agonista tipo dioxina del receptor arilo hidrocarburo. Al parecer sus efectos se derivan de la interacción con el ER β , aunque también se ha citado que se une de manera competitiva con el receptor de progesterona (Maranghi *et al.*, 2007). Del mismo modo, se ha propuesto

que el lindano es capaz de modular la actividad de la aromatasa, influyendo indirectamente en la conversión de andrógenos a estrógenos y, por tanto, en la maduración y desarrollo sexual de los individuos. Dicha modulación de la aromatasa varía en función del tiempo de exposición (ATSDR, 2005).

Del mismo modo, hay estudios realizados *in vivo* que muestran resultados opuestos, indicando en unos la alteración de parámetros hormonales en suero, frente a otros que indican ausencia de efectos endocrinos en humanos tras la exposición oral (ATSDR, 2005; Mnif *et al.* 2011). En cuanto a los mecanismos de acción, para el lindano se asigna la capacidad de unirse de forma competitiva al receptor androgénico, estrogénico y de progesterona (Mnif *et al.*, 2011).

4.4. BIFENILOS POLICLORADOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, los PCB pueden causar alteraciones endocrinas y efectos adversos en el desarrollo reproductor. Se plantean varios mecanismos de acción para ello, como que ciertos PCB podrían incrementar los niveles de gonadotropina. Incluso se ha propuesto que los PCB podrían afectar a la producción e incremento de la hormona luteinizante desde la pituitaria por mecanismos no relacionados con la acción estrogénica (Krishnan y Safe, 1993).

Paralelamente a los efectos biológicos y tóxicos, es interesante conocer los efectos disruptores endocrinos de ciertos hidroxilados y metil sulfonados metabolitos de PCB. Debido a la fuerte unión de los metabolitos hidroxilados para unirse a la proteína transportadora de T4, se puede producir niveles inadecuados de hormona circulante en sangre. Puesto que la proteína transportadora también forma complejos con la proteína que se une al retinol, algunos PCB también pueden alterar la vitamina A (Faroon *et al.*, 2003).

Los bifenilpoliclorados es un grupo amplio y heterogéneo, con características estructurales que condicionan su mecanismo de acción. Por ejemplo, los metil sulfonados son capaces de inhibir la actividad enzimática del CYP11B en adrenales de ratón y foca gris (*Halichoerus grypus*). A este tipo de compuestos también se les achaca efectos tóxicos, interacción con el receptor estrogénico y metabolismo pulmonar (Faroon *et al.*, 2003). Por otro lado, algunos estudios sugieren que los PCB mono y di orto sustituidos tienen efectos

adversos más notorios sobre el desarrollo neuronal. Esta toxicidad probablemente esté mediada por la unión a receptor de rianodina, pero no con el receptor arilo hidrocarbónico (Faroon *et al.*, 2003).

Ahondando en los diferentes mecanismos de acción fundamentados en las diferencias estructurales, la capacidad de inducir enzimas del p450 es un rasgo que diferencia a los grupos de PCB. Aquellos congéneres que muestran elevada afinidad por unirse al receptor arilo hidrocarbónico, como los no-orto sustituidos, pueden ser potentes inductores de la familia enzimática del citocromo CYP1, incluido el CYP 1A1, CYP1A2 y el CYP1B1. Por el contrario, aquellos que tienen una sustitución orto inducen enzimas de familias CYP2 y CYP3, asemejando la inducción por fenobarbital. A este respecto, los mono-orto PCB toman una posición intermedia, en sentido que pueden inducir ambas familias del CYP1 y también del CYP2 y CYP3, una propiedad que generalmente está ausente en los di-orto sustituidos (Faroon *et al.*, 2003).

En el documento publicado por la WHO/IPCS (2002) se recoge información de artículos de finales de los ochenta (como el de Korach *et al.* (1988) que asignan a los PCB características estrogénicas y antiestrogénicas, viéndose potenciada la capacidad estrogénica cuando aparece una sustitución de un grupo hidroxilo en el anillo fenólico (Damstra *et al.*, 2002). Como posibles justificaciones a este doble efecto se han propuesto diversas hipótesis, tales como que el tipo de efecto depende de la dosis, de la composición de las mezclas (en caso de que se trate de mezclas) (WHO/IPCS, 2002). Sin embargo, estudios más recientes apuntan a que el efecto no proliferativo detectado en MCF-7, es consecuencia de otro mecanismo de acción. Radice *et al.* (2008) matizan que los PCB inducen la generación de especies de oxígeno reactivas (por sus siglas inglesas: ROS), responsables del efecto antimitótico, pero que nada tiene que ver con efectos estrogénicos. Estos autores señalan, además, que el efecto mitótico del PCB 153 y PCB118 se debe a la lenta activación del ER α /2.

5. RELACIÓN CAUSA-EFECTO

La Organización Mundial de la Salud junto con otras entidades recogieron en su documento de 2013 (Bergman *et al.*, 2013), datos de autores que apuntan a un declive a

nivel mundial de todas las especies en las últimas décadas (Figura 7), aunque parece que en algunos casos se están recuperando. Esta alteración en la dinámica de poblaciones es debida a múltiples causas, entre las que se incluye, la exposición a contaminantes ambientales. Este hecho, junto con la detección de que ciertas anomalías tienen mayor incidencia en países industrializados (como el incremento de infertilidad en la población, incremento de problemas de aprendizaje y de conducta, problemas de atención e hiperactividad) sugieren que la exposición a DE tiene algo que ver (Schettler *et al.*, 2000). Aunque es demasiado arriesgado vincular el descenso poblacional a los perturbadores endocrinos, a tenor de los datos corroborados hasta la fecha es más que probable que éstos sean uno de los factores implicados, junto con la sobreexplotación, pérdida de hábitat, cambio climático y contaminación. Ésta podría ser la causa del declive de poblaciones de rapaces, focas y caracoles cuyas poblaciones han estado expuestas a DDT, PCB y tributil. Un hecho que corroboraría esta idea es la recuperación de algunas especies tras la prohibición de los COP más perjudiciales. Sin embargo, es muy complicado establecer una causa directa e inequívoca entre la exposición a un compuesto y la respuesta debida a otro tipo de factores ecológicos estresantes para un individuo en su medio (Bergman *et al.*, 2013). En contraposición, hay autores que critican esta relación causa-efecto, por falta de pruebas sólidas, y basarse únicamente en evidencias (Lamb *et al.*, 2014).

Figura 7. Declive poblacional de especies a nivel mundial

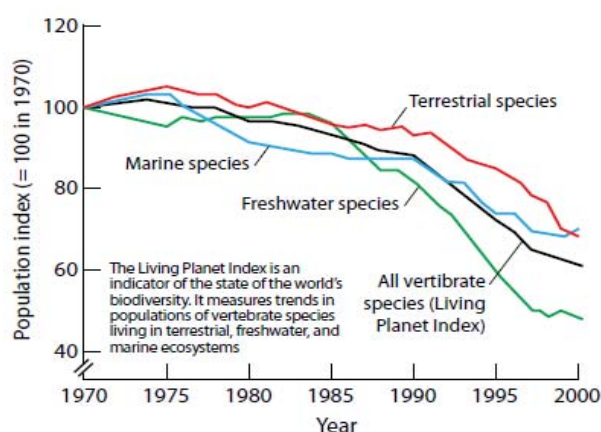


Figura obtenida de Bergman *et al.*, (2013)

A pesar de que se han descrito muchos efectos endocrinos indeseados en humanos y en animales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Aubé *et al.*, 2011; Barton, 2003; EPA 2003), existe una

falta de conocimiento acerca de la magnitud de los mismos tras la exposición, y a raíz de ello, se detectan discrepancias en cuanto a la fiabilidad de los resultados de las investigaciones. Probablemente, uno de los motivos que propician esta falta de consenso es la procedencia de la información y el tipo de sustancias evaluadas: gran parte de los datos existentes son relativos a los efectos de los COP en Norteamérica y Europa; y, a pesar de que muchos contaminantes persistentes se relacionan con alteración del sistema endocrino, no son los únicos capaces de desencadenar este tipo de patologías. Aunque la falta de información es más evidente para aquellos compuestos menos persistentes, éstos también son capaces de actuar como disruptores endocrinos (WHO/IPCS, 2002).

Históricamente no ha resultado fácil, ni rápida, la detección de efectos indeseados de los productos químicos comercializados. Las evidencias de los efectos adversos han supuesto la prohibición de muchos de ellos en ciertos países, pero no siempre ha sucedido así. Ejemplos de cada una de estas dos situaciones los representan la comercialización de dos productos que resultaron tener, y tienen, un impacto importante en la sociedad. Por un lado, el DDT surgió como un remedio eficaz en el control de enfermedades tan relevantes como la malaria, tifus y plagas agrícolas, Pero acabó prohibiéndose en muchos países al demostrarse sus efectos perniciosos para el humano y el ecosistema. Otro producto de gran repercusión en la sociedad actual fue la aparición de los anticonceptivos orales, ya que contribuyó al control de la natalidad por parte de las mujeres. Su popularidad se extendió por todas las sociedades “modernas” siendo un producto muy demandado en la actualidad. Inevitablemente comenzaron a verterse a los cursos fluviales elevadas cantidades de metabolitos de hormonas estrogénicas eliminados en la orina, a los que quedan expuestos los organismos de esos ecosistemas,

En vista de las evidencias y constataciones sobre los efectos adversos derivados de la exposición ambiental a los contaminantes es necesario realizar una adecuada evaluación del riesgo de los productos químicos comercializados de origen humano, considerando su repercusión ecológica analizando combinaciones de compuestos a diversas concentraciones, teniendo en cuenta las variables intrínsecas del individuo y especie. Sin embargo, sin ensayos más comprensibles y completos no estaremos capacitados para determinar las consecuencias actuales de los DE en humanos y otras especies.

5.1 E-SCREEN COMO HERRAMIENTA PARA VALORAR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN ESTROGÉNICA

Existe una amplia batería de ensayos aplicables al estudio de la disrupción endocrina, en función del ítem específico a estudiar, como los ensayos *in vitro* con cultivos celulares capaces de expresar receptores estrogénicos. Para ello, se puede escoger entre varias líneas que expresan receptores estrogénicos *per se*, y protocolos diseñados para que los expresen mediante transfección celular, en caso de que no presenten esta capacidad (como la Guía TG-455, elaborada para detectar sustancias químicas agonistas/antagonistas de receptores estrogénicos (OECD, 2012). Tal y como tiene publicado la OECD (www.oecd.org, web visitada el 17/03/2018), entre los test de Nivel 2 para la evaluación de disruptores endocrinos, figura el ensayo de proliferación celular con MCF-7 (ER agonistas/antagonistas) (

Tabla 7). Es, precisamente, esta línea celular la empleada en esta tesis. La línea celular MCF-7 expresa receptores estrogénicos, por lo que resulta adecuada para detectar sustancias que los activen directa e indirectamente (Futran *et al.*, 2015), siempre que se garanticen la ausencia de compuestos estrogénicos en los medios de cultivo que no sean objeto de estudio, como se indica más adelante.

Esta línea celular se requiere en la aplicación del *E-Screen* (Soto *et al.*, 1995). El *E-Screen* es una de las técnicas más aplicadas en el estudio de la actividad estrogénica *in vitro* (NTP, 2004). Muchos autores han optado por esta técnica para estudiar el carácter estrogénico de compuestos como alquilfenoles, ciertos PCBS y ftalatos, demostrando su elevada sensibilidad al poseer receptores estrogénicos (Shanle y Xu, 2010).

Tabla 7. Listado de Test, ensayos y guías para la evaluación toxicológica de disrupción endocrina en mamíferos y no mamíferos.

Evaluación toxicológica en mamíferos y no mamíferos	
Nivel 1:	Propiedades físico-químicas: peso molecular, reactividad, volatilidad, biodegradación.
Con y sin información previa	Toda la información disponible (eco)toxicológica procedente de test no estandarizados y estandarizados
	Reacciones cruzadas, categorías químicas, QSAR y otras <i>in silico</i>

predicciones, y modelos predictivos ADME	
Nivel 2	Afinidad de unión a receptores estrogénicos y androgénicos.
Ensayos <i>in vitro</i> que proporcionan información sobre determinados mecanismos de acción endocrinos (ensayos para no mamíferos y para mamíferos)	Transactivación de receptores estrogénicos (OECD TG-455-OECD TG 457)
	Transactivación androgénica o tiroidea (Si/cuando TGs estén disponibles)
	Esteroidogénesis <i>in vitro</i> (OECD TG 456)
	Ensayo de proliferación celular MCF-7 (ER agonistas/antagonistas)
	Otros ensayos que sean apropiados

	Mamíferos	No- mamíferos
Nivel 3 Información procedente de ensayos <i>in vivo</i> sobre determinados mecanismos de acción endocrinos	Ensayos uterotrópicos (OECD TG-440)	Ensayo sobre la señal tiroidea en embriones de <i>Xenopus</i> (cuando/si TG estén disponibles)
	Ensayo de Hershberg (OECD TG 441)	Ensayo de metamorfosis en anfibios (OECD TG 229)
		Ensayo de screening de reproducción en peces (OECD TG 229)
		Ensayo de screening en peces (OECD TG 230) Screening de androgenización de hembras de pez espinoso (<i>Gasterosteus aculeatus</i>) (GD 140)
Nivel 4: Ensayos <i>in vivo</i> que proporcionen información sobre efectos adversos de objetivos endocrinos relevantes.	Estudios de 28 días dosis-repetidas (OECD TG 407)	Test de desarrollo sexual en peces (OECD TG 234)
	Estudios de 90 días dosis-repetidas (TG 408)	Test reproductivo de ciclo de vida parcial en peces (cuando/si TG esté disponible)
	Estudios de toxicidad reproductivos en 1 ^o generación (OECD TG-415)	Ensayo de crecimiento y desarrollo larvario en anfibios (cuando esté disponible el TG)
	Ensayos de desarrollo de la pubertad en machos (ver GD 150, capítulo C4.3)	Ensayo reproductivo de aves (OECD TG 206)
	Ensayos de desarrollo de la pubertad en hembras (ver GD 150, capítulo C4.4)	Ensayos de ciclo de vida parcial en moluscos (cuando TG esté disponible)
		Test de toxicidad en quironómidos

		(TG 218-219)
	Ensayo de <i>screening</i> endocrino de machos adultos intactos (ver GD 150, Anexo 2.5)	Test de reproducción de daphnia (con inducción de machos) (TG OECD TG 211)
	Estudios toxicológicos de desarrollo prenatal (OECD TG 414)	Test de reproducción de lombrices (OECD TG 222)
	Estudios de toxicidad y carcinogenicidad crónica (OECD TG 451-3)	Test de reproducción de enquitreidos (OECD TG 220)
	Test de <i>screening</i> reproductivos (OECD TG 421 si mejoran)	Test de toxicidad de lombrices en sedimento de aguas empleando sedimento enriquecido (OECD TG 225)
	Desarrollo neurotóxico (OECD TG 426)	Test de reproducción de ácaros depredadores en suelo (OECD TG 226)
		Test de reproducción de colémbolos en suelo (TG OECD232)
Nivel 5	Estudios ampliados de toxicidad reproductiva de una generación (OECD TG 443)	FLCTT (Fish lifeCycle Toxicity Test) (cuando esté disponible el TG)
Ensayos <i>in vivo</i> que proporcionen datos más completos de los efectos adversos de aspectos relevantes de disrupción endocrina que afecten a otros ciclos de vida del organismo	Estudios ampliados de toxicidad reproductiva en segunda generación (OECD TG 416)	Test multigeneración con medaka (MMGT) (cuando el TG esté disponible)
		Ensayo de toxicidad reproductiva de segunda generación en aves (cuando el TG esté disponible)
		Test de toxicidad del ciclo de vida en misidáceos (cuando el TG esté disponible)
		Test reproductivo y de desarrollo en copépodos (cuando el TG esté disponible)
		Test de toxicidad del ciclo de vida de quirómidos en agua de sedimentos
		Ensayo de ciclo de vida completo de moluscos (cuando el TG esté disponible)
		Ensayo multigeneracional de daphnia (si el TG está disponible)

Tabla adaptada de la OECD, (2012)

Como ya se ha apuntado anteriormente, desde hace décadas se conocen las propiedades de los estrógenos, como la participación en la modulación del crecimiento celular, en la diferenciación sexual y en la función reproductora masculina y femenina (Enmark y Gustafsson, 1999; Gustafsson y Warner, 2000), la promoción de la proliferación celular y la capacidad de hipertrofiar los órganos sexuales femeninos, pero también su capacidad de inducir la síntesis de proteínas específicas (Hertz R., 1985).

Es, precisamente la participación de estas hormonas en la multiplicación celular, la función objeto de estudio en el *E-Screen*. Soto *et al.*, (1995) se basaron en la idea de Hertz R, referente a la capacidad de los estrógenos de inducir proliferación en el tracto genital femenino, para evaluar la capacidad estrogénica de sustancias químicas. Para ello, Soto *et al.*, (1995) buscaron la equivalencia entre la proliferación de la línea MCF-7 con el incremento de la actividad mitótica del endometrio de roedores (Soto *et al.*, 1991). Una vez establecida dicha equivalencia biológica, diseñaron la técnica *E-Screen*, que permite evaluar *in vitro* gran cantidad de sustancias en un tiempo relativamente corto (6 días) (Soto *et al.*, 1991; Soto *et al.*, 1995), empleando como control positivo la hormona natural que desencadena la mayor proliferación celular, el 17 β -estradiol o E2. Tal y como indican los autores de la técnica, en el desarrollo de la misma tuvieron en cuenta dos premisas: a) la presencia de proteínas específicas en suero humano, capaces de inhibir la proliferación en células humanas sensibles a los estrógenos; b) los estrógenos inducen proliferación celular al inhibir la acción de las proteínas citadas (Soto *et al.*, 1995).

De las premisas anteriormente indicadas se deriva la importancia de la composición del medio de cultivo en el *E-Screen*, siendo necesario modificarlo para el desarrollo de la técnica. La modificación se fundamenta en la constatación de que ciertos componentes habituales en los medios de cultivo pueden interferir en la estimulación de la proliferación celular. Concretamente, por un lado, se ha demostrado que las concentraciones de Rojo Fenol presentes en los medios podrían estimular la proliferación celular (Berthois *et al.*, 1986), pudiendo interferir así en los resultados del estudio; y por otro lado, el suero fetal bovino posee ciertos niveles de hormonas, componentes esteroideos y factores de crecimiento que podrían enmascarar el resultado del *E-Screen* (Soto *et al.* 1995).

Otro factor importante que se ha de considerar en los estudios *in vitro*, es el solvente empleado para vehicular los compuestos. El dimetil sulfóxido (DMSO), a pesar de ser uno de los solventes más empleados, es citotóxico a dosis elevadas e incluso podría interferir con los parámetros de estudio relacionados con perturbación endocrina (Mortensen y Arukwe, 2007). Por ello se siguieron las recomendaciones realizadas por la *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM)(NIEHS, 2002), que apuntan que el solvente empleado no debe suponer más del 1% del volumen total de la disolución, y en caso de tratarse de DMSO, no más del 0,1%. Este menor porcentaje para el caso del dimetil sulfóxido, es debida a que muchos autores indican que el DMSO podría reducir la afinidad de los compuestos por los receptores estrogénicos (NIEHS 2002).

**CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La agricultura supone un pilar socioeconómico fundamental en la Región de Murcia, al destinarse aproximadamente el 50% de la superficie de la Región a la agricultura; en el año 2015, concretamente, el 45,7% (CREM, 2014). El impacto económico del sector primario en su conjunto, a pesar de haber sufrido un decrecimiento en los últimos años, no es nada desdeñable: el 5,3 % del PIB de la Región, según se recoge en el Documento base del Plan Estratégico Iris 2020, de la Región de Murcia (Iris, 2017). Este sistema de producción intensivo debe hacer frente a la lucha de ciertas plagas, propiciadas por la climatología de la zona, con precipitaciones que fluctúan desde los 186,5 l/m² en 2014 hasta 369,5 l/m² en 2016, una temperatura media anual de 20,1°C en 2016 y más de 3.100 horas de sol (CREM, 2014). Indudablemente, detrás del éxito en el control de plagas que permita estos niveles productivos, se encuentra el empleo de fitosanitarios.

Los estudios de biomonitorización de rapaces realizados en España (García-Fernández *et al.*, 2008) y, en concreto, en la Región de Murcia, (León-Ortega *et al.*, 2017; Pérez-Romero *et al.*, 2017) realizados durante más de diez años han posibilitado la toma muestras de sus tejidos para poder estimar el impacto de la contaminación ambiental de la Región (García-Fernández *et al.*, 2013; Gómez-Ramírez *et al.*, 2016). No es infrecuente que estas aves habiten en áreas agrícolas y/o más o menos industrializadas, convirtiéndose en una herramienta fundamental en muchos estudios de biomonitorización ambiental (Espín *et al.*, 2016; Gómez-Ramírez *et al.*, 2012; Martínez-Lopez *et al.*, 2007; Martínez-López *et al.*, 2009; ; Martínez-López *et al.*, 2012).

A pesar de que se ha percibido una disminución de la exposición durante los años de muestreo, incluso en 2013 se detectaron compuestos prohibidos en 2007, debido a la elevada persistencia y escasa degradación de algunos de ellos en el ambiente. Los datos arrojados en investigaciones sobre muestras de sangre, huevos no eclosionados, grasa y pluma indican que, a pesar de estar prohibidos años atrás, persisten en el ambiente y continúan transfiriéndose en la cadena alimentaria (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Navas, 2017).

Durante las dos últimas décadas, el grupo de investigación de Toxicología de la Universidad de Murcia ha llevado a cabo diversos estudios de exposición a plaguicidas organoclorados y otros contaminantes en diversas especies de rapaces diurnas y nocturnas

cuyo nicho ecológico coincide con zonas de influencia agrícola (María-Mojica, 1998, María-Mojica *et al.*, 1996; María-Mojica *et al.*, 2000). Las especies mayormente estudiadas en el sureste de España han sido Aguililla calzada (*Aquila pennata*), Azor (*Accipiter gentilis*) (Martínez-López *et al.*, 2009, 2007) y Búho real (*Bubo bubo*) (Gómez-Ramírez *et al.*, 2016, 2012), aunque muestras de otras muchas especies de rapaces, diurnas y nocturnas, han sido también analizadas (María-Mojica, 1998). En los estudios citados, los compuestos organoclorados detectados en sangre y tejidos (hígado, riñón, encéfalo y grasa) fueron los siguientes: aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, lindano o γ -HCH (γ - hexaclorociclohexano), α -HCH, β -HCH, δ -HCH, endosulfán α y β , endosulfán sulfato, heptacloro y heptacloro epóxido. Los análisis de contaminantes en sangre dan idea de la exposición reciente a los mismos (García-Fernández, 2014), pero no aportan información precisa de los efectos potenciales asociados a esos niveles. A ello hay que añadir que los seres vivos se ven expuestos a varios compuestos a la vez (García-Fernández y María-Mojica, 2000). Los compuestos organoclorados y, particularmente los insecticidas organoclorados tienen un mecanismo de acción agudo común (Furio *et al.*, 2015), pero es preciso aportar información sobre los potenciales efectos y las interacciones de esta exposición conjunta. Los efectos pueden ser estudiados desde diferentes perspectivas: citotoxicidad (León *et al.*, 2006), letalidad (Palma *et al.*, 2008), estrés oxidativo (Bayoumi *et al.*, 2001; Espín *et al.*, 2014a, 2014b; García-Fernández *et al.*, 2002), alteraciones endocrinas (Giesy *et al.*, 2003; Mnif *et al.*, 2011; Navas y Segner, 2006; Soin y Smagghe, 2007), apoptosis/necrosis (Ptak *et al.*, 2011) etc.

Los compuestos más relevantes, tanto por su presencia en el medio como por las concentraciones detectadas en los seres vivos, fueron escogidos para el diseño de mezclas complejas del presente estudio. Concretamente se han seleccionado el aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, dicofol, lindano técnico, γ -HCH o lindano (γ - Hexaclorociclohexano), endosulfán α y β , endosulfán sulfato, heptacloro, heptacloro epóxido, y cuatro congéneres bifenilos policlorados (PCB# 118, PCB# 126, PCB# 153, y PCB# 180), todos ellos incluidos en el Convenio de Estocolmo y en el Reglamento (CE) 850/2004 por haberse demostrado su elevado nivel de toxicidad. Por otra parte, se mantuvieron en la medida de lo posible, las relaciones existentes entre grupos de

compuestos detectados en las sangres de las rapaces para confeccionar las mezclas de compuestos que se utilizaron en la exposición en los ensayos *in vitro*.

Partiendo del conocimiento sobre los efectos adversos que presentan los compuestos organoclorados sobre el sistema endocrino de la fauna y del ser humano, junto con los resultados extraídos de estudios previos del sur-sudeste español de muestras de rapaces vivas en las que se detectaron este tipo de sustancias, se planteó la siguiente hipótesis: “El resultado de la combinación de productos organoclorados en estudio, debe derivar en una modificación de la función endocrina que ha de resultar aditiva en su potencia, fruto de la suma de efectos de cada uno de sus componentes”.

Para verificar la hipótesis de partida se propuso un objetivo general y tres objetivos específicos:

Se planteó evaluar la capacidad de dieciocho compuestos organoclorados y ocho de sus mezclas para inducir proliferación celular *in vitro*, vinculada a alteraciones de la función estrogénica. Para ello se utilizará el ensayo *in vitro* E-Screen, el cual será aplicado a cuatro PCB, catorce pesticidas organoclorados y ocho mezclas de estos plaguicidas. Las mezclas se diseñarán en función de los resultados de campo obtenidos en estudios previos de biomonitorización en rapaces del sudeste.

Como objetivos específicos se establecieron los siguientes enumerados:

1. Evaluar, de forma individualizada, la capacidad de modificación de la proliferación celular sobre el cultivo MCF-7 de los compuestos seleccionados.
2. Estudiar el efecto de las mezclas, diseñadas a partir de resultados obtenidos de rapaces vivas en libertad, trasladando lo más fielmente posible las condiciones de campo al laboratorio, para una mejor valoración de los efectos sobre la función estrogénica.
3. Predecir el efecto de las mezclas en función de los resultados previos del estudio de sus integrantes, y su análisis respecto a la concordancia de los datos obtenidos.

**CAPÍTULO IV. MATERIAL
Y MÉTODOS**

1.INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

En este bloque se indican los pasos seguidos en la exposición del cultivo celular MCF-7 de dieciocho organoclorados (OC) y sus mezclas, con el objetivo de evaluar incrementos de la proliferación celular por encima de los niveles normales, mediante la técnica conocida como: “ensayo *E-Screen*”. Para ello, se ha agrupado los contenidos en cuatro apartados:

- a) Recopilación de la información sobre los OC a evaluar y el diseño de sus mezclas, junto con las características de la línea celular empleada.
- b) Descripción de los ensayos preliminares necesarios a realizar previamente al ensayo *E-Screen*.
- c) Descripción del ensayo *E-Screen*, y el método colorimétrico para su evaluación, sulforhodamina B.
- d) Estudio estadístico y abordaje de los parámetros de evaluación de los resultados.

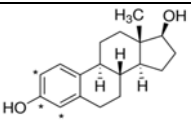
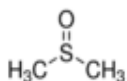
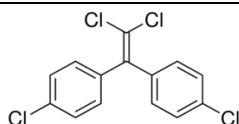
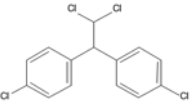
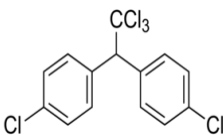
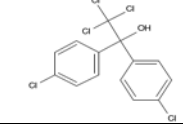
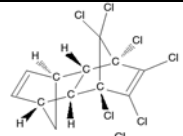
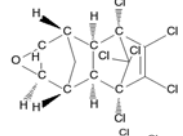
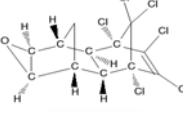
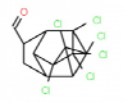
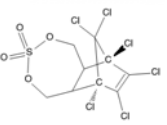
Todos los experimentos se llevaron a cabo en la Sección de Cultivos de Tejidos del Servicio de Apoyo a la Investigación (S.A.I.) de la Universidad de Murcia. Dicha instalación está certificada como Laboratorio de Bioseguridad de Nivel 2, equipado con cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica de clase II. Este tipo de cabinas garantiza la protección del producto, del investigador y del ambiente. La esterilidad del cultivo celular no sólo se garantizó trabajando en las cabinas de este tipo, sino que además en el interior de éstas se disponía de mecheros Bunsen para flamear los frascos, que junto con el material estéril y la rutina de trabajo exigidas, garantizaban la esterilidad de los cultivos celulares, medios de cultivo y reactivos.

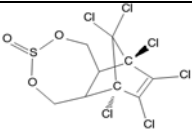
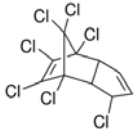
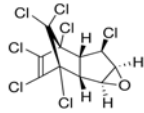
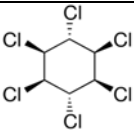
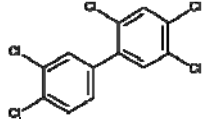
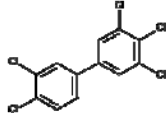
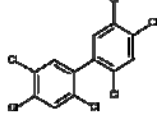
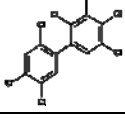
2. COMPUESTOS A EVALUAR

Para el desarrollo de la presente tesis se analizó la capacidad de inducir proliferación celular de 18 compuestos organoclorados (OC) y 8 combinaciones de los mismos, seleccionados en base a estudios de biomonitorización de rapaces del sur y sudeste español, llevados a cabo durante las últimas dos décadas en el Área de Toxicología de la Universidad Murcia (Gómez-Ramírez et al., 2012; Martínez-Lopez et al., 2007). En la Tabla 8 se presentan

cada uno de ellos (suministrados por la empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH®), los controles empleados (proporcionados por Sigma-Aldrich®), junto con el número CAS de cada compuesto (*Chemical Abstracts Service*), su peso molecular y grupo químico al que pertenecen.

Tabla 8. Organoclorados y controles empleados en el ensayo *E-Screen*

Grupo	Reactivo	Fórmula molecular	CAS	P.molecular (g/mol)	Estructura química
controles y solvente	17β-Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	50-28-2	272.38	
	DMSO	(CH ₃) ₂ SO	67-68-5	78.13	
Difenilalifáticos	<i>p,p'</i> -DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	72-55-9	318.03	
	<i>p,p'</i> -DDD	(C ₆ H ₄) ₂ CHCHCl ₂	72-54-8	320.04	
	<i>p,p'</i> -DDT	(C ₆ H ₄) ₂ CHCCl ₃	50-29-3	354.49	
	Dicofol	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	115-32-2	370.49	
Ciclodiénicos	Aldrín	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	309-00-2	364.91	
	Dieldrín	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	60-57-1	380.91	
	Endrín	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	72-20-8	380.91	
	Endrín aldehído	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	7421-93-4	380,89	
	Endosulfán sulfato	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	1031-07-8	422.92	

Grupo	Reactivo	Fórmula molecular	CAS	P.molecular (g/mol)	Estructura química
	Endosulfán $\alpha\beta$	$C_9H_6Cl_6O_3S$	115-29-7	406.93	
	Heptacloro	$C_{10}H_5Cl_7$	76-44-8	373.32	
	Heptacloro epóxido	$C_{10}H_5Cl_7O$	1024-57-3	389.32	
Hexadloro ciclohexanos	γ -HCH o lindano	$C_6H_6Cl_6$	58-89-9	290.83	
	*Lindano técnico		608-73-1	290.8	
Bifenilos policlorados	PCB# 118	$C_{12}H_5Cl_5$	31508-00-6	323.88	
	PCB# 126	$C_{12}H_5Cl_5$	57465-28-8	323.88	
	PCB# 153	$C_{12}H_4Cl_6$	35065-27-1	357.84	
	PCB# 180	$C_{12}H_3Cl_7$	35065-29-3	391.81	

* Mezcla de isómeros comercializado como "lindano técnico", generalmente compuesto los isómeros α , β , γ , δ , ϵ

Para cada una de estas sustancias se analizó una batería de siete concentraciones comprendida entre $1,0E^{-5}M$ hasta $1,0E^{-11}M$; para las mezclas se prepararon concentraciones más diluidas Tabla 9. En la preparación de las mezclas se tuvieron en consideración las limitaciones de solubilidad derivados de la concomitancia de diversos componentes junto con el requerimiento de no superar el 1% de solvente para la completa disolución en el medio de exposición, tal como recomienda el ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) (NIEHS, 2002). Por todo ello, fue necesario preparar concentraciones más diluidas que para el caso de los compuestos evaluados por separado. Finalmente, cada uno de los ensayos se repitió, al menos, en tres ocasiones.

Tabla 9. Composición y rango de concentraciones de mezclas evaluadas

Mezcla	Composición	Rango de concentraciones (M)
MS c/c/c/d/d/h	Endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + Dieldrín + <i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE + Lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5)	6,0 E ⁻⁷ hasta 6,0E ⁻¹³
MB d/d	<i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE (50:50)	1,7 E ⁻⁷ hasta 1,7E ⁻¹³
MT c/d/d	Endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE (75:12,5:12,5)	3,0E ⁻⁷ hasta 3,0E ⁻¹³
MB c/d/ 1	Endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDE (75:25)	1,0E ⁻⁶ hasta 1,0E ⁻¹²
MB c/d/ 2	Endosulfán $\alpha\beta$ + <i>p,p'</i> -DDT (75:25)	1,0E ⁻⁶ hasta 1,0E ⁻¹²
MC c/c/d/d	Aldrín+ Dieldrín + <i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE (25:25:25:25)	1,0E ⁻⁶ hasta 1,0E ⁻¹²
MT h/d/d	Lindano técnico + <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> -DDE (75:12,5:12,5)	1,0E ⁻⁶ hasta 1,0E ⁻¹²
MB h/c	Lindano técnico+ endosulfán $\alpha\beta$ (50:50)	1,0E ⁻⁷ hasta 1,0E ⁻¹³

El solvente empleado en la preparación de las diluciones de organoclorados y del control positivo (17 β -estradiol o E2) fue dimetil sulfóxido (DMSO). En ningún caso éste superó el 0,1% del volumen total en el medio de exposición. De este modo, se cumplió con las recomendaciones realizadas por el ICCVAM, (NIEHS, 2002).

En cuanto al control positivo, 1,0E⁻⁹M de E2, se preparó un pequeño stock (de 2 a 5 ml) el cual se mantenía a -20°C, de tal manera que con frecuencia era renovado. Sin embargo, en el caso de los OC se optó por conservar en congelación pequeños volúmenes (de 2 a 4 ml) de una solución muy concentrada (por lo general 1,0E⁻²M). De esta manera, a partir de cada vial congelado, se preparaban las diluciones pertinentes el mismo día de su aplicación.

3. LÍNEA CELULAR MCF-7

La línea celular MCF-7 fue adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB22™) catalogada como nivel 1 de bioseguridad. Se trabajó siguiendo las pautas de las buenas prácticas de laboratorio, manipulando en todo momento la línea dentro de una

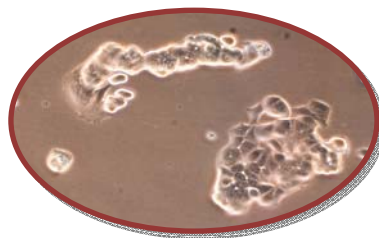
cabina de flujo laminar vertical (Figura 8). Según la información proporcionada por el proveedor, la línea procede de una efusión pleural neoplásica secundaria a un adenocarcinoma mamario, aislado de una mujer caucásica de 69 años (ATCC, 2017).

Figura 8. Material de trabajo en el interior de la cabina de flujo laminar vertical.



Se caracteriza por su morfología epitelial mamaria y crecimiento adherente sobre la superficie de cultivo en donde, con frecuencia, crecen formando domos o pequeños cúmulos celulares (Figura 9).

Figura 9. Crecimiento típico de la línea celular MCF-7



Esta particularidad se ha de tener en cuenta en el manejo del cultivo, ya que las células que se encuentran en el centro del domo ven dificultado el intercambio gaseoso y el aporte de nutrientes, por lo que pueden morir si alcanzan tamaños demasiado grandes. Sin embargo, algunas células pueden desprenderse del fondo del frasco de cultivo y permanecer vivas en suspensión. Por todo ello es recomendable realizar los subcultivos de la línea celular cuando se alcance el 70-80% de confluencia, y no esperar a que se forme un tapiz celular con una mayor confluencia (como es frecuente en otras líneas celulares). La línea celular MCF-7 retiene muchas características de epitelio mamario diferenciado, destacando la capacidad de procesar estradiol por receptores estrogénicos citoplasmáticos.

Las condiciones de cultivo y manejo se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor (ATCC® HTB22™). Como medio de cultivo se empleó *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) con rojo fenol (RF) suplementado con piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, cada 100ml de medio se requiere 1 ml de penicilina-estreptomicina, 0,01 mg/ml de insulina, 2 mM L-glutamina y, finalmente, un 10% de suero fetal bovino (SFB). El cultivo masivo se mantuvo bajo las condiciones ambientales de 95% de humedad relativa, CO₂ al 5% y 37°C de temperatura (Figura 10).

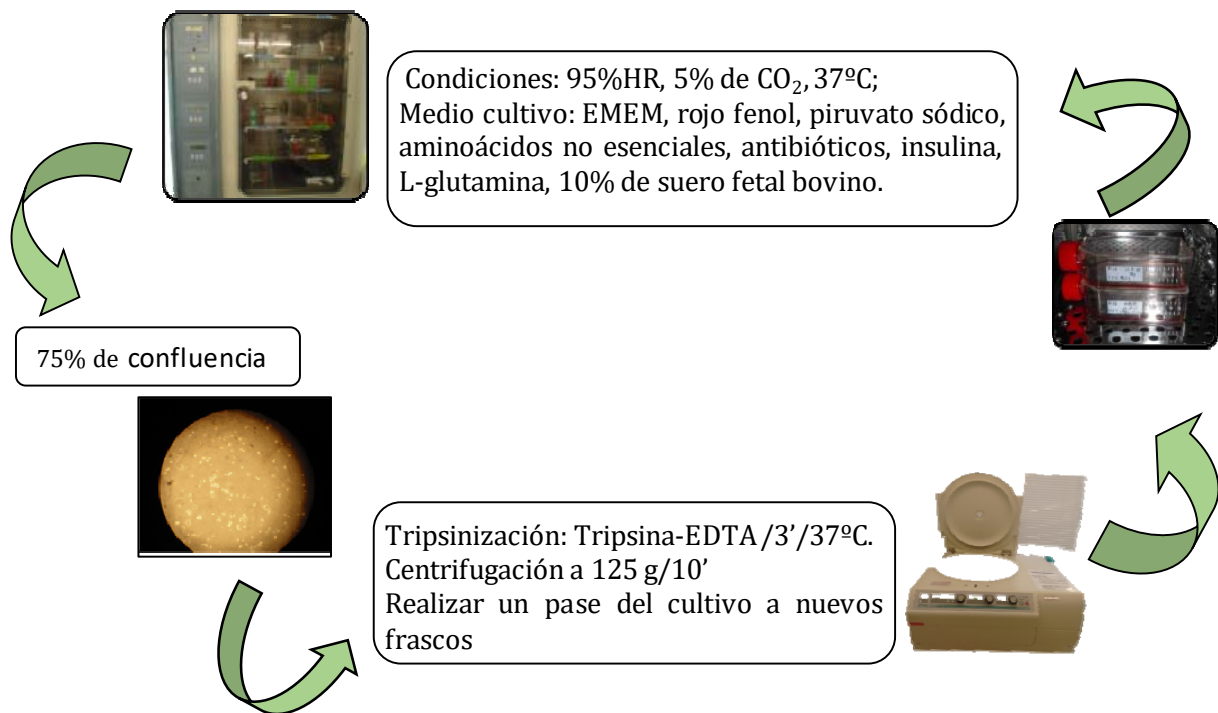
Figura 10. Mantenimiento del cultivo celular MCF-7



De forma rutinaria, la línea celular se subcultivó al 70%-80% de confluencia celular, realizando pases 1:4 o bien 1:3. Para realizar un subcultivo, es necesario tripsinizar el medio para que las células adherentes se despeguen del fondo de los frascos de cultivo. Para ello se adicionó de 2 a 3 ml de 0,25% (p/v) de tripsina 0,53 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), durante 3-4 minutos a 37°C. A continuación, se observa la efectividad del proceso al microscopio óptico invertido, valorando la necesidad de repetir la tripsinización. Una vez despegadas las células se frenaba la actividad enzimática añadiendo de 2 a 3 ml de medio completo nuevo. Por último, todo el contenido del frasco se centrifugaba a 125g en un tubo de 50 ml durante 10 minutos, tras lo cual se obtenía el pellet celular. Éste pellet se resuspendía suavemente en 2 ml de medio de cultivo, para poder contabilizar las células, en base a lo cual se calculaba el volumen necesario para realizar un pase o siembra en placas de microtitulación de 96 pocillos.

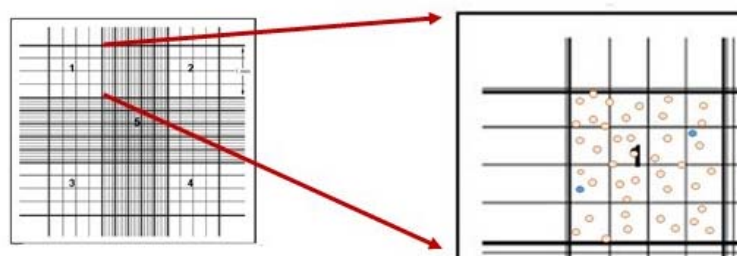
En la Figura 11 se resumen los pasos más destacados para el mantenimiento de la línea celular, destacando las condiciones ambientales de mantenimiento y las pautas del proceso de tripsinización.

Figura 11. Esquematización del manejo rutinario de la línea



Durante la primera etapa de ensayos se evaluó la viabilidad del cultivo mediante el procedimiento de exclusión vital con el colorante azul tripán. Esta sencilla técnica consiste en la preparación de una solución a partes iguales del colorante vital y suspensión celular, homogenizando adecuadamente. A continuación, se transfirieron 10 µl de ésta solución a un hemocitómetro para realizar el recuento de células vivas (refringentes) y muertas (células teñidas de azul), y poder determinar la viabilidad del cultivo (Figura 12). La viabilidad se estima contabilizando el número de células vivas y muertas en las 4 cuadrículas periféricas del hemocitómetro, el volumen del mismo (0,1 mm³) y el factor de dilución de la suspensión celular preparada (en este caso, dos). Con todos estos datos se calculó fácilmente el número total de células vivas por unidad de volumen y la viabilidad al relacionar el número de células vivas con el número total de células presentes. A continuación, se ejemplifica los cálculos indicados:

Figura 12. Representación de recuento celular en hemocitómetro (cámara de Neubauer)



Células vivas: anaranjadas; Células muertas: representadas en azul.

Células vivas	Células muertas	Células totales	Viabilidad (%)
275	7	282	97,5 %

$$\frac{275 \text{ células vivas}}{4} * 2 * 10000 = 1.375.000 \text{ en } 1 \text{ ml}$$

$$1.375.000 * 2 \text{ ml de suspensión celular} = 2.750.000 \text{ células en el frasco de cultivo}$$

No obstante, en la segunda etapa de ensayos experimentales, se tuvo acceso al contador automático de células TC10™ BioRad (Figura 13), para el que se requería preparar también una suspensión celular en tripán azul al 50%. El contador proporciona directamente el número de células vivas, el número de células muertas y la viabilidad del cultivo celular.

Figura 13. Contador automático de células TC10™ BioRad.



Con independencia del método empleado para el recuento de células, el procedimiento para realizar los pases es el mismo en ambos casos. Para los cultivos masivos se emplearon botellas de 25 cm² y 75 cm². En la Tabla 10 se recopilan los volúmenes de suspensión celular

que se han de transferir desde un cultivo ya tripsinizado al nuevo frasco, en función de sus tamaños.

Tabla 10. Volúmenes de suspensión celular requeridos en función del tipo o de pase celular

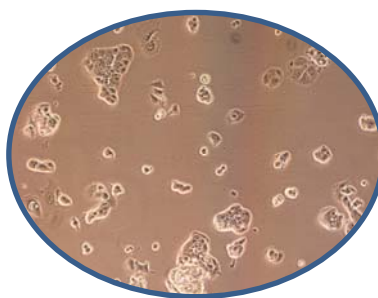
De frasco inicial a nuevo frasco	Volumen (en μl) de suspensión celular necesario según el pase a realizar
Mismo tamaño	Pase 1:3 = 666 Pase 1:4 = 500
25 cm ² a 75 cm ²	Pase 1:3 = transferir toda la suspensión celular
De 75 cm ² a 25 cm ²	Pase 1: 3 = 222 Pase 1:4 = 166

4. ANÁLISIS PREVIOS AL E-SCREEN

4.1. DENSIDAD CELULAR Y CONTROL POSITIVO (17B-ESTRADIOL)

En primera instancia se recurrió a la técnica colorimétrica MTT para determinar el número de células a sembrar en las placas de microtitulación de 96 pocillos. Para ello se realizó una curva de crecimiento de 6 días con 4 densidades celulares diferentes en una misma placa (5.0000, 10.000, 15.000 y 20.000 células por pocillo, a razón de 10 pocillos por concentración). El día “cero” se sembraron cinco placas para ser evaluadas en días consecutivos a partir de las 24 horas de la siembra. La evaluación diaria de la colorimetría permitió detectar el incremento de la coloración desde la primera placa hasta la analizada el sexto día, consecuencia de un mayor número de células. Gracias a ello es posible conocer el ritmo de multiplicación celular, las particularidades de mantenimiento y manipulación de la línea celular MCF-7. Pero, además, se ha de tener presente la capacidad de la línea de crecer formando domos o clústeres, en lugar de formar un tapiz celular (Figura 14).

Figura 14. Crecimiento de la línea celular MCF7



El rango de número de células por pocillo que seleccionado como punto de partida se determinó en base a la densidad normal del cultivo masivo, durante su mantenimiento rutinario. Como se cita al inicio del apartado se recurrió a la técnica MTT para la evaluación de la proliferación celular en cada placa. A continuación, se detallan los pasos más relevantes de la técnica:

- **Técnica MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)**: Muy empleada en estudios de supervivencia, proliferación y en ensayos de citotoxicidad celular, por lo que es posible encontrar en la bibliografía modificaciones de la técnica original descrita en 1983 (Denizot y Lang, 1986; Mosmann, 1983). El fundamento del MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) es la conversión del reactivo en cristales de formazán en el interior de las células vivas. Este producto, insoluble en medio acuoso, requiere la lisis celular y su disolución en solventes orgánicos. Con este fin se emplea el dimetil sulfóxido (DMSO), lo que promueve la aparición de una tonalidad violeta, tanto más intensa cuanto mayor es el número de células. La conversión de las sales de tetrazolium en formazán se relaciona con la actividad mitocondrial, que a su vez se relaciona con el número de células viables. Para evaluar la proliferación se preparó la solución de MTT a razón de 5 mg/ml en medio de cultivo sin aditivos. En primer lugar, los 200µl de medio de cultivo se sustituyeron por 50 µl de MTT junto con otros 200 µl de medio de cultivo nuevo, sin otros componentes. Seguidamente, la placa se mantuvo 4 horas en oscuridad, durante las cuales las células transforman las sales de tetrazolium en cristales de formazán en su interior. A continuación, se retiró todo el medio y se incorporó en cada pocillo 100 µl de DMSO para lisar y liberar el metabolito, apareciendo la tonalidad violácea. Por último, se

determinó la densidad óptica en un fluorímetro (*Fluostar Control*) a 560 nm (excitación) y 690 nm (emisión).

Posteriormente, una vez conocida la densidad celular óptima para los ensayos previstos con la técnica MTT, se realizaron nuevos ensayos colorimétricos empleando sulforhodamina B (SRB). La sulforhodamina se cita con frecuencia en la bibliografía como herramienta para evaluar proliferación celular por su elevada sensibilidad y por no ser tóxica, entre otras características. Para poder comparar ambas técnicas, se realizaron ensayos bajo las mismas condiciones, partiendo de los resultados obtenidos en el paso anteriormente descrito. Se diseñaron dos placas de microtitulación (con 10.000 y 5.000 células en la misma placa) tiñendo una con la técnica MTT y la otra con SRB. Para comprender la motivación de la elección de procedimientos llevados a cabo a continuación, se estima oportuno indicar que la absorbancia obtenida por la primera técnica resultó excesivamente elevada, lo cual dificultaba la percepción de ligeras variaciones colorimétricas. Es decir, la SRB resultó más sensible puesto que a menor densidad celular se obtenían niveles de absorbancia adecuados.

Por tanto, los ensayos dirigidos a la selección de la concentración del control positivo, 17 β -estradiol o E2, se realizó aplicando la técnica colorimétrica de la sulforhodamina B, descrita y empleada por Skehan *et al.* (1990), Soto *et al.* (1995) y modificada por Körner *et al.* (1999) (se aporta más información en el apartado “Ensayo de proliferación celular *E-Screen*” descrito en este capítulo). Se establecieron concentraciones seriadas comprendidas entre 10⁻⁸M hasta 10⁻¹⁵M. Partiendo de los resultados obtenidos en el paso previo se fue acotando la densidad celular a sembrar en cada pocillo, desde 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 y 2.000 células.

4.2 EFECTO DEL DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

El solvente empleado para la disolución de los organoclorados y del estradiol fue el dimetil sulfóxido (DMSO). Por ello se siguieron las indicaciones realizadas por el *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) (NIEHS, 2002), que recomiendan que, en caso de tratarse de DMSO, no debe suponer más del 0,1% del

volumen total a exponer, ya que porcentajes superiores podrían reducir la afinidad de los compuestos por los receptores estrogénicos (NIEHS 2002).

Para comprobar si las proporciones de solvente empleado en la preparación de las diluciones de OC afectaban a la proliferación de MCF-7, se realizaron pruebas en las que se expusieron las células a éstas mismas proporciones de DMSO, pero sin organoclorados. Con este fin, en una misma placa de microtitulación de 96 pocillos se expusieron diluciones seriadas comprendidas entre 0,1% hasta 1,0E⁻⁷% del solvente en medio de cultivo. Estas proporciones corresponden a las que se derivan de las concentraciones de organoclorados testadas, desde 1,0E⁻⁵M hasta 1,0E⁻¹¹M. Se prepararon 12 replicados para cada uno de los porcentajes de DMSO estudiados, y 21 para el “control blanco”. La técnica empleada para su evaluación fue la tinción con sulforhodamina B, descrita más adelante.

4.3. OSMOLARIDAD DEL MEDIO DE EXPOSICIÓN.

Una adecuada osmolaridad del medio de exposición (relación entre el número de osmoles o solutos y el medio) es vital para el mantenimiento homeostático celular, contribuyendo a prevenir la muerte de las células por causas ajenas al objeto del ensayo. En caso de existir una osmolaridad inapropiada que causara muerte celular se podría incurrir en el error a la hora de interpretar resultados tras la exposición, puesto que el decrecimiento en el número de células no sería debido al efecto de las sustancias a ensayar, sino a un problema de homeostasis. Para ello, se midió la osmolaridad del medio de exposición de la mezcla más compleja, MS c/c/c/d/d/h/ constituida por 6 componentes de 3 grupos químicos diferentes (Tabla 9). Se midió su osmolaridad de la concentración más elevada para comprobar si difería respecto al medio de cultivo (EMEM). La medida se realizó con un osmómetro Vapro® 5520 (WESCOR) (Figura 15).

Figura 15.. Osmómetro Vapro® 5520 (Wescor)



5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR E-SCREEN

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA E-SCREEN

Tal y como se recoge en el último apartado de la Parte II del Capítulo II, el *E-Screen* aprovecha la capacidad proliferativa de la línea celular MCF-7 para cotejar la capacidad de ciertos compuestos de interferir con la respuesta estrogénica, evaluando precisamente el grado de proliferación celular desencadenada tras la exposición. Por otro lado, como sustancia de referencia se recurrió al 17 β -estradiol (también conocida como E2), por ser la hormona estrogénica endógena de mayor potencia, requiriendo también controles “negativo”, “solvente” y “blanco” (ver Tabla 12) (Soto *et al.*, 1995, 1991). Finalmente, transcurridos los 6 días de ensayo, el efecto derivado se evaluó mediante la técnica colorimétrica de sulforhodamina B.

Para garantizar la ausencia de compuestos capaces de enmascarar los resultados del *E-Screen* se sustituyó el medio de cultivo masivo por el “medio de exposición” durante los ensayos, constituido por EMEM sin Rojo Fenol y por un 5% de suero fetal bovino libre e estrógenos (*SFB-Charcoal Dextran*) (Tabla 11).

Tabla 11. Composición de medios de cultivo celular empleados

. Componente		Medio cultivo masivo	Medio exposición
Piruvato sódico 1mM		✓	✓
Aminoácidos no esenciales 0,1mM		✓	✓
Penicilina-estreptomicina		✓	✓
0,01 mg/ml de insulina		✓	✓
2 mM L-glutamina		✓	✓
Suero fetal bovino (SFB)		10% Estándar	5% Sin compuestos esteroideos
EMEM	Con Rojo Fenol	✓	✗
	Sin Rojo Fenol	✗	✓

5.2. DISEÑO DE LAS PLACAS DE MICROTITULACIÓN PARA LA APLICACIÓN DEL E-SCREEN

El ensayo *E-Screen* (Soto *et al.*, 1995) se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos. En la Figura 16 se esquematiza el diseño de exposición de compuestos en cada placa, en las que se testaron siete concentraciones de cada compuesto o mezcla por sextuplicado. Además, se añadieron los correspondientes controles: control negativo, control solvente (DMSO), control positivo y blanco (Tabla 12).

Figura 16. Diseño de la placa de 96 pocillos.

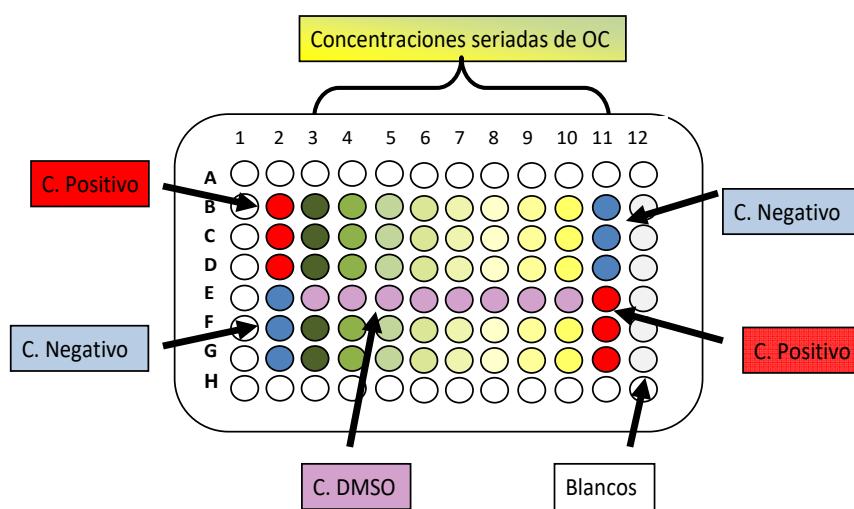


Tabla 12. Relación de controles presentes en cada placa de 96 pocillos

Control	Composición
Blanco	“Medio de exposición”
Negativo	“Medio de exposición” + células
Solvente	“Medio de exposición” + células + máximo porcentaje de solvente
Positivo	“Medio de exposición “ + células + 1,0E ⁻⁹ M de estradiol o E2

5.3. DESARROLLO DE LA TÉCNICA E-SCREEN.

Se sembraron 2000 células en 180 µl de “medio de exposición” en cada pocillo, siguiendo el diseño indicado en la Figura 16. Para el conteo celular se utilizó el contador automático de células TC10™ BioRad. En cada placa se testaron 7 concentraciones de un solo compuesto o mezcla, junto con los correspondientes pocillos para los controles (Tabla 12). Tras 24 h de la siembra se adicionaron 20 µl de las soluciones pertinentes a testar en los pocillos correspondientes, de tal manera que el volumen final en cada pocillo fue de 200 µl:

- De cada una de las 7 concentraciones de organoclorado/mezcla a analizar.
- Del control positivo (E2): 1,0E⁻⁹M.
- Del medio experimental como control negativo.
- Del máximo porcentaje de DMSO empleado, para el control solvente.

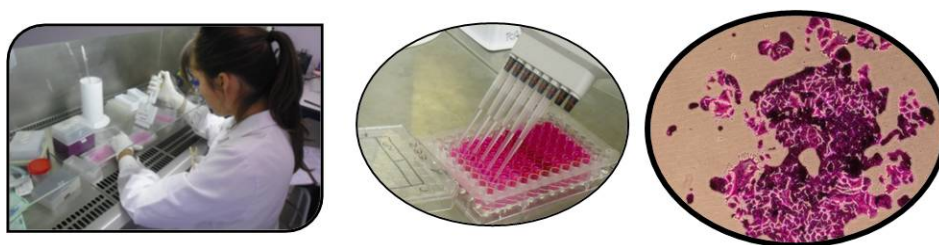
Pasados los 5 días de exposición (y 6 días desde la siembra) se contrastó el crecimiento de las células de los pocillos control positivo y de las células expuestas a los OC, los cuales se cotejaron frente al control negativo para la determinación de una posible variación en el crecimiento del cultivo (aplicando los conceptos descritos en el apartado “Parámetros de Evaluación de Resultados”). La valoración de la proliferación, como ya se ha indicado, se realizó mediante la técnica colorimétrica con sulforhodamina B (SRB) (Körner *et al.*, 1999; Skehan *et al.*, 1990). Este método valora el número celular en función de la proteína total midiendo el nivel de absorbancia a 560 nm/690 nm (emisión excitación), lo cual se considera directamente proporcional al número celular (Körner *et al.*, 1999).

5.4 TINCIÓN CON SULFORHODAMINA B: VALORACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

La técnica colorimétrica con sulforhodamina B fue desarrollada en 1990 (Skehan *et al.*, 1990) y posteriormente se correlacionó con el número celular del cultivo (Körner *et al.*, 1999). Se adquirió el Kit “*In vitro* Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B based” (Sigma-Adrich®), compuesto por ácido tricloroacético (como solución de fijado), ácido acético al 10% (como solución de lavado) y tampón básico de Tris (*trizma hydrochloride buffer solution*, como solución de solubilización) y solución de sulforhodamina B. En primer lugar, se adicionaron 50 µl de ácido tricloroacético frío al 50% a cada pocillo y se mantuvieron a 4°C

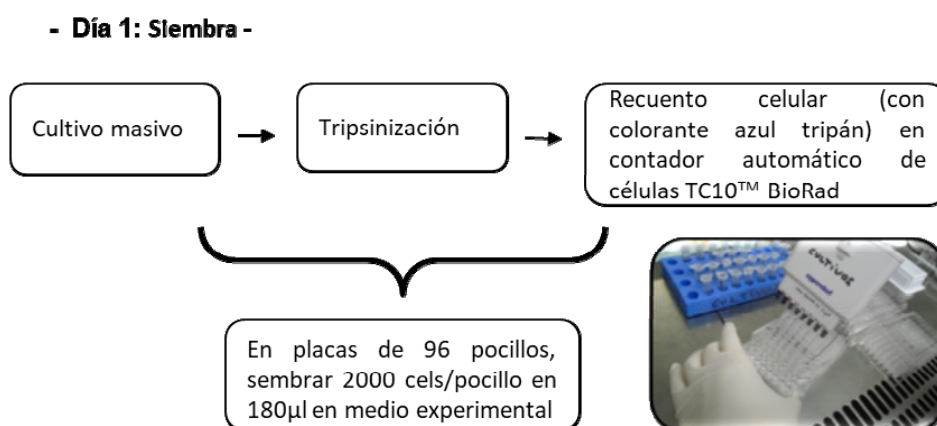
durante una hora. A continuación, se lavaron las placas 3 veces con agua y se secaron a temperatura ambiente antes de añadir 100 µl/pocillo de SRB al 0,4% en ácido acético al 1%. Tras veinte minutos, el colorante se eliminó lavando cada pocillo con 300 µl de ácido acético al 1% tres veces, dejando que la placa se secase del mismo modo. Por último, se distribuyeron 200 µl de TRIS 10mM/pH 9,5 en cada pocillo. Pasados cinco minutos se procedió a homogenizar el contenido, colocando la placa en un agitador gravitacional a bajas revoluciones y pipeteando repetidas veces, antes de medir la absorbancia en el equipo fluorímetro Fluostar Galaxy® a 560 nm/690 nm de longitud de onda (emisión/excitación) (Figura 17).

Figura 17. Tinción de cultivo MCF-7 con sulforhodamina B

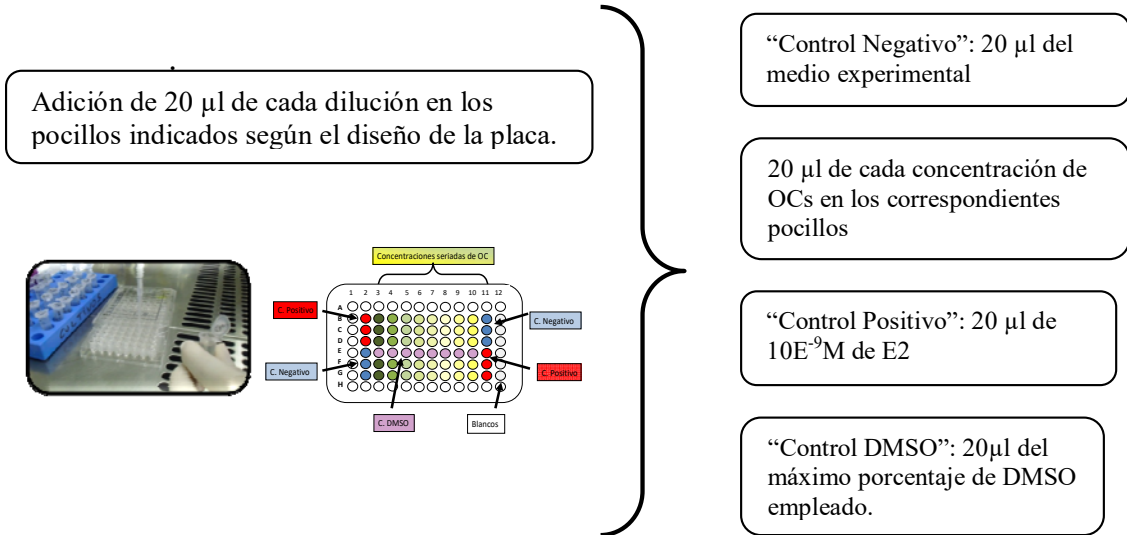


Para finalizar, en la Figura 18 se resumen los pasos básicos dados para llevar a cabo el ensayo *E-Screen* y la posterior tinción celular con sulforhodamina B, técnica empleada para la valoración de la proliferación celular mediante la medición de la absorbancia.

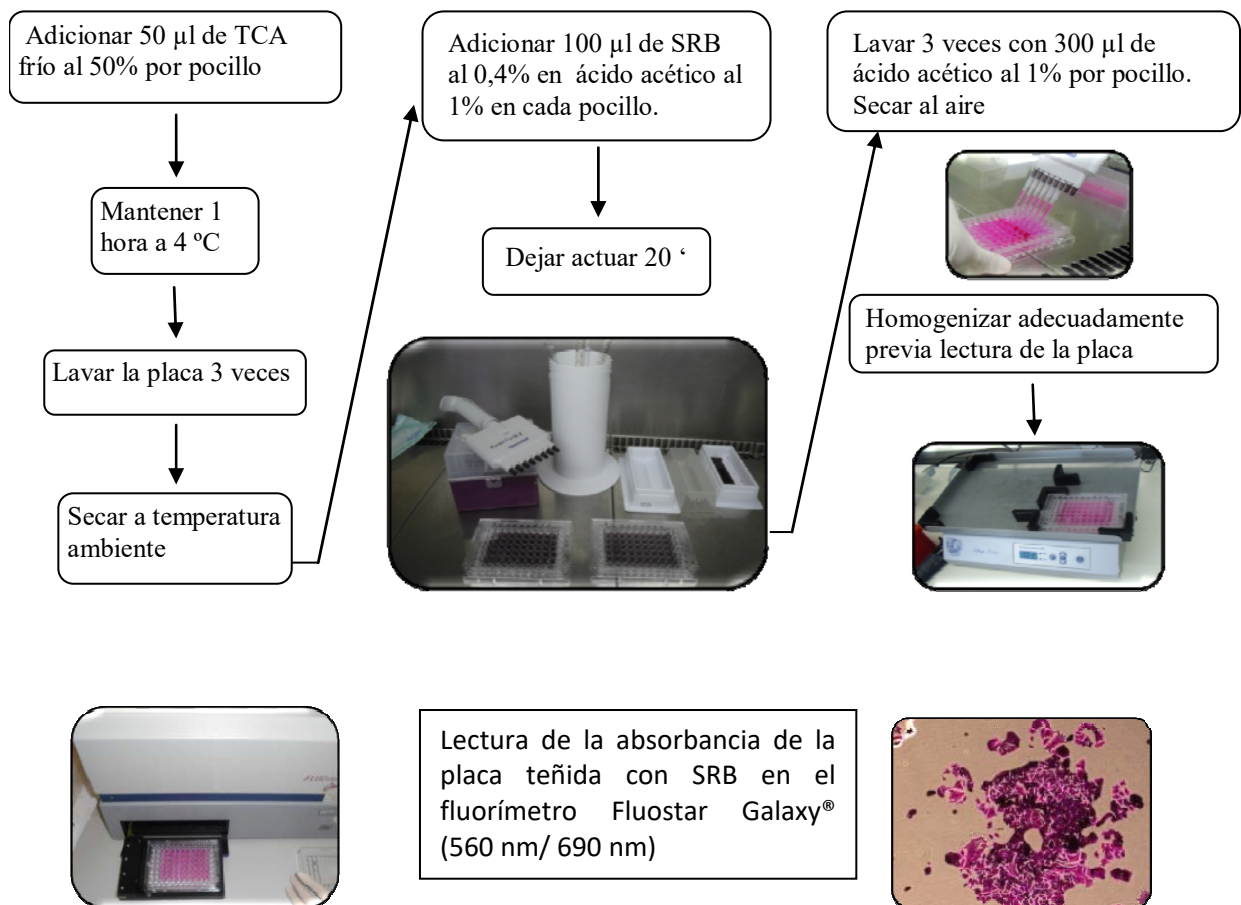
Figura 18. Esquematación de la técnica *E-Screen*



- Día 2: Exposición-



- Día 6: Evaluación de la proliferación celular: tinción con SRB



4. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El tratamiento estadístico y los parámetros para la valoración de los resultados se aplicaron tanto en los análisis de los OC evaluados por independiente, como en las mezclas.

6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tras la realización del ensayo *E-Screen* y tinción celular con SRB, se obtuvieron los datos de absorbancia de cada pocillo. Sobre dichos datos, se aplicaron test no paramétricos para proceder a su análisis y poder estimar proliferación celular debida a la exposición de las distintas concentraciones de organoclorados, así como en los controles.

Se realizó un *t-Student* con el objetivo de hallar aquella concentración que, en cada placa, produjese la mayor proliferación celular, asignando un nivel de significación elevado ($\alpha = 0.1$). La aplicación de este valor permitió minimizar el error tipo II, es decir, evitar catalogar como iguales dos concentraciones cuando realmente no lo son. Por tanto, en este caso resulta adecuado que sí existan diferencias significativas entre las concentraciones.

Por otro lado, fue necesario comparar los datos de un mismo producto procedentes de placas diferentes, para comprobar la homogeneidad entre los mismos. Para ello se llevó a cabo la prueba H de Kruskal-Wallis. El nivel de significación escogido para este test fue $\alpha = 0.01$. En este caso, el nivel de α es bajo porque la intención fue minimizar el error de tipo I (afirmar que difieren cuando no lo hacen). En este tipo de análisis es interesante que sean iguales, puesto que se espera la menor evidencia. En aquellos casos en los que el test mostró resultados significativos, implicaba que, en al menos dos placas, existían diferencias significativas para la misma concentración. En estas situaciones se descartaron del análisis los datos de la placa correspondiente a la concentración que más perjudicaba, repitiéndose el proceso hasta que las diferencias no fueron significativas.

Los mencionados test estadísticos se realizaron con el paquete estadístico *R Core Team* (2015) versión 3.2.2

Una vez realizadas dichas pruebas y seleccionados los datos, se procedió a trabajar con ellos para la obtención de los distintos parámetros objeto de estudio y criterios de valoración.

Con los datos ya seleccionados se recurrió al software estadístico *GraphPad Prism*, versión 5.01 para realizar un análisis de la varianza de una vía (ANOVA *one way*) con el fin de evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de OC/mezclas, frente a los controles positivo y negativo, mediante el test *post hoc* de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Finalmente, para comprobar posibles diferencias entre las distintas proporciones de DMSO se hizo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA *one way*) junto con el test de Dunnett como *post hoc*, con los datos del Efecto Proliferativo (EP, ver apartado “Parámetros de evaluación de resultados”) obtenidos para cada porcentaje de DMSO. A continuación, se recurrió al test *post hoc* Tukey tras ANOVA de un factor para detectar diferencias entre el solvente y el control negativo. Para ello, también se empleó el software *GraphPad Prism*, versión 5.01 (*Graphpad Software Incorporated*, San Diego. CA).

6.2. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Uno de los parámetros empleados para estimar la capacidad de los compuestos para inducir proliferación celular (relacionado con actividad estrogénica) y, por tanto, la capacidad de originar un efecto “no programado” por el organismo, es el Efecto Proliferativo Relativo (*Relative Proliferative Effect*, RPE). Soto *et al.* (1995) definieron este concepto como la capacidad de los compuestos de inducir proliferación celular, el cual es 100 veces la ratio entre la máxima proliferación obtenida con el compuesto y el control positivo (17 β -estradiol o E2). Es decir, el potencial estrogénico de los xenobióticos se compara con el estrógeno endógeno más potente, el estradiol, al que se le asigna el 100% del efecto.

$$RPE = 100 * \frac{FE - 1 \text{ compuesto}}{PE - 1 \text{ estradiol}}$$

No obstante, en el presente trabajo hemos empleado el término RPE para hacer referencia al crecimiento alcanzado tras los 6 días de exposición en cada una de las concentraciones, y no únicamente de aquella concentración que da lugar al máximo efecto, comparando el crecimiento con el observado en el control positivo (al igual que sucede en el concepto original de la fórmula). Cuando se ha recurrido al máximo valor de RPE observado de todas las concentraciones evaluadas se indica oportunamente.

En cualquier caso, es preciso obtener previamente el Efecto Proliferativo (*Proliferative Effect*, PE) definido como la ratio entre la máxima proliferación obtenida por el compuesto y el control negativo, medidas todas ellas en absorbancia (Soto *et al.*, 1995).

$$PE = \frac{\text{absorbancia del compuesto}}{\text{absorbancia control negativo}}$$

Ambos parámetros se obtuvieron tanto para los organoclorados testados individualmente, como para la mezcla de los mismos.

En base a los resultados obtenidos por la aplicación de los parámetros descritos se clasificó a los compuestos y mezclas como débilmente estrogénicas (aquellos que tuvieran un RPE inferior al 25%), parcialmente (los que tuvieran un RPE comprendido entre el 25% y 75%) y fuertemente estrogénicas (con RPE superior al 75%). Esta última clasificación mencionada, establecida por Andersen *et al.* (1999), ha sido también empleada por otros (Aubéet *al.*, 2011; Vanparys *et al.*, 2006) y permite categorizar los productos en base a su capacidad de inducir proliferación celular y, por tanto, la capacidad que poseen de interferir con el sistema endocrino. No obstante, es necesario indicar que la modificación de la proliferación celular podría corresponderse con un crecimiento inferior al basal propio del cultivo celular (dado por el control negativo).

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE I. ANÁLISIS PREVIOS

1. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO.

Los Ensayos Preliminares, descritos en el capítulo anterior, incluyen los siguientes aspectos:

- a) Selección de la densidad celular a exponer en el *E-Screen* y de la concentración del control positivo 17 β -estradiol (E2).
- b) Evaluación de una posible interferencia del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) en los resultados del *E-Screen*.
- c) Medición de la osmolaridad de los medios de exposición.

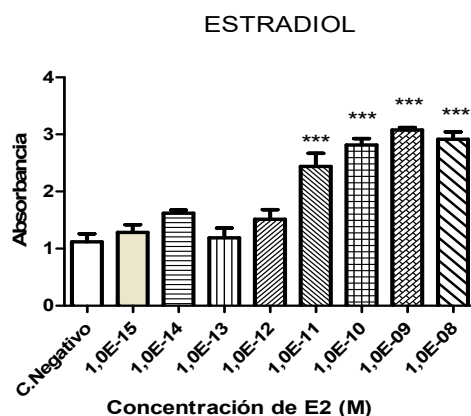
2. DENSIDAD CELULAR EN EL ENSAYO E-SCREEN Y CONCENTRACIÓN DEL CONTROL

POSITIVO

Se omiten los resultados obtenidos por la técnica MTT, al no estar directamente vinculados a los objetivos de la tesis. De cualquier modo, puede resultar interesante apuntar que se obtuvieron los mejores resultados con la siembra de 5.000 células/ pocillo.

Esta cifra se fue acotando hasta 2000 cél/pocillo en ensayos posteriores con la técnica de Sulforhodamina B (SRB), al mismo tiempo que se testaron ocho concentraciones de 17 β -estradiol (E2), con el fin de escoger la idónea como control positivo en los futuros ensayos de *E-Screen* (Figura 19). Esta misma densidad celular fue seleccionada por Vanparys *et al.* (2006), siendo muy similar a las 2500 cél/pocillo empleadas por Evans *et al.* (2012).

Figura 19. Niveles de absorbancia de las concentraciones ensayadas de estradiol (E2).



***= $p < 0,001$ Diferencias estadísticamente significativas respecto al Control negativo

Del rango de concentraciones de E2 testado, de $10^{-8}M$ hasta $10^{-15}M$, la horquilla comprendida entre $1,0E^{-11}M$ hasta $1,0E^{-8}M$ presentaron diferencias estadísticamente significativas frente al control negativo. Empero, entre estas cuatro no aparecieron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, se determinó el Efecto Proliferativo para cada molaridad, para conocer cuál de ellas resultaba más efectiva. En la Tabla 13 se recogen los valores medios del Efecto Proliferativo (EP= absorbancia/c.negativo; Soto *et al.*, 1995) su desviación estándar y mediana de cada concentración testada. De todas ellas, 1 nM que presentó mayor Efecto Proliferativo (EP). Por ello, se escogió dicha concentración como control positivo (CP) a emplear en los ensayos del *E-Screen* de los organoclorados y sus mezclas.

Tabla 13. Media del Efecto Proliferativo (EP), desviación estándar y mediana de las concentraciones testadas de Estradiol.

Concentración (M)	Media EP ±Desv. Est Mediana
C.Negativo	1,12 ± 0,34 1,01
1,0E ⁻¹⁵	1,15 ± 0,27 1,25
1,0E ⁻¹⁴	1,35 ± 0,25 1,44
1,0E ⁻¹³	1,06 ± 0,38 0,96

Concentración (M)	Media EP ±Desv. Est Mediana
1,0E ⁻¹²	1,35 ± 0,34 1,53
1,0E ⁻¹¹	2,18 ± 0,46 2,04
1,0E ⁻¹⁰	2,52 ± 0,24 2,59
1,0E ⁻⁹	2,75 ± 0,09 2,73
1,0E ⁻⁸	2,61 ± 0,26 2,70

La molaridad 1 nM para el control positivo (E2) también fue escogida como la más idónea en los estudios de Evans *et al.* (2012), difiriendo ligeramente de otros autores (2 nM en el caso de Vanparys *et al.*, 2006; 10 nM en Körner *et al.*, 1999 y 10 pM en Soto *et al.*, 1994 y en el trabajo de Szelei *et al.*, 1997), siendo, además, la empleada como referencia en el ensayo de transfección de la línea hER α -HeLa-9903 (OECD, 2016). De cualquier modo, existen variaciones en cuanto a la sensibilidad de la línea MCF-7 frente al estradiol entre laboratorios (Payne *et al.*, 2000; Rasmussen y Nielsen, 2002), lo que podría justificar las diferencias en la molaridad de E2 seleccionada.

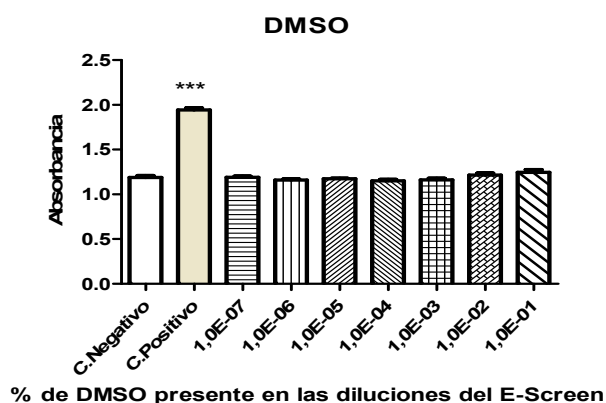
3. EFECTO DEL DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) EN EL ENSAYO E-SCREEN

Para evaluar si el solvente dimetil sulfóxido (DMSO) podría inducir efecto sobre el cultivo celular MCF-7, y en tal caso, conocer el rango de porcentaje de solvente presente en el medio que no interfiriese en el ensayo *E-Screen*, se prepararon siete diluciones seriadas de medio de cultivo junto con el porcentaje de DMSO requerido para vehicular las siete molaridades de OC y sus mezclas. El volumen máximo de DMSO presente en las diluciones fue de 0,1%, a partir del cual se prepararon las siguientes seis diluciones seriadas hasta que el dimetil sulfóxido supuso un 1,0E⁻⁷%, porcentaje más bajo empleado en los ensayos de OC testados individualmente.

En la Figura 20 se plasman los valores de absorbancia (relacionados con la proliferación celular) obtenidos en las diluciones del medio de cultivo con los porcentajes de DMSO

requeridos para vehicular los productos, junto con el control positivo (CP). El test de Dunnet y el de Tukey confirmó que únicamente aparecieron diferencias significativas entre el CP y el CN.

Figura 20. Efecto de los porcentajes de DMSO presentes en los medios de exposición de los compuestos



***=p<0,001

Debido a la ausencia de efecto de los distintos porcentajes de DMSO, correspondientes al abanico de diluciones de los ensayos de los dieciocho OC y de las ocho mezclas, en las sucesivas gráficas se omite el dato referente al control de DMSO.

Es imprescindible asegurar la ausencia de efecto del solvente empleado, bien sea induciendo o inhibiendo el efecto estudiado. De no ser así, se podrían asignar efectos a los compuestos evaluados de forma inapropiada. En la publicación *"ICCVAM Evaluation of In vitro Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays"* (NIEHS, 2002) se alude a la idoneidad de los tipos de solventes y las proporciones máximas en los medios de exposición recomendadas, fundamentalmente, por posibles efectos citotóxicos, recomendando un volumen máximo del 0,1% (v/v) (NIEHS, 2002; OECD, 2016). El etanol y el dimetil sulfóxido son dos de los solventes más empleados en investigación, pero el DMSO es el recomendado por la OECD en los ensayos para la evaluación de sustancias agonistas/antagonistas de receptores estrogénicos (OECD, 2016). No obstante, se ha descrito la posibilidad de que el etanol induzca enzimas esteroideogénicas, así como el

posible efecto del DMSO en peces, a pesar de seguir las recomendaciones del ICCVAM (Mortensen y Arukwe, 2007).

4. OSMOLARIDAD DE MEDIOS DE EXPOSICIÓN

Como se especifica en el capítulo anterior, se realizaron las mediciones oportunas de osmolaridad de los medios empleados en el ensayo *E-Screen*. Con ello se descartó que las variaciones en la proliferación normal del cultivo se debieran a problemas osmóticos de los medios empleados. Para comprobar el funcionamiento correcto del equipo se midió la osmolaridad del agua miliQ. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Datos de osmolaridad de los medios de cultivo empleados

Agua miliQ	Medio cultivo masivo idóneo (indicado por el proveedor)	Disolución de la Concentración más elevada (1,0E ⁻⁵ M)
8 mmol/kg	294 mmol/Kg	303 mmol/Kg

La osmolaridad adecuada del medio de cultivo, indicada por el proveedor de la línea celular y la osmolaridad del medio de exposición, preparado por nosotros para los ensayos, fueron muy similares, por lo que se descartó que, en caso de producirse un decrecimiento del número de células viables, éste fuera debido a la osmolaridad del medio.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE II. EFECTO PROLIFERATIVO INDUCIDO POR COMPUESTOS ORGANOCCLORADOS

1. ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

Los resultados obtenidos tras la exposición del cultivo celular MCF-7 a los dieciocho organoclorados (OC) en el ensayo *E-Screen* se estructuran en dos apartados, en los que se recoge la siguiente información:

- a) En primer lugar, se plasman para grupo químico (ciclodiénicos, difenilalifáticos, hexaclorociclohexanos y bifenilos policlorados), las diferencias significativas de cada dilución testada frente al control negativo (CN) y positivo (CP), obtenidas en los test estadísticos indicados en “Material y Métodos”.
- b) Seguidamente, se indican los valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE) obtenido en cada ensayo para cada compuesto y para cada concentración, concepto descrito por Soto *et al.* (1994). En base a dichos resultados, los compuestos se han clasificado según su intensidad proliferativa como débiles, parcial y fuertemente estrogénicos según presentaron RPE inferior al 25%, entre el 25% y el 75% o mayor del 75%, respectivamente), categorías establecidas por Andersen *et al.* (1999).

A modo de recordatorio, en la Tabla 15 se indican los compuestos analizados y el grupo químico al que pertenecen. Para cada uno se testaron siete concentraciones seriadas, comprendidas entre $1,0E^{-11}M$ hasta $1,0E^{-5}M$.

Tabla 15. Compuestos analizados por individualizado

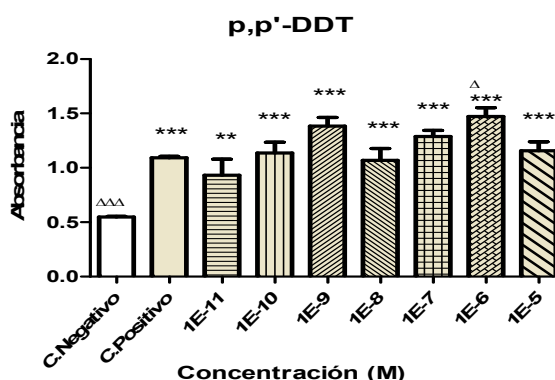
Grupo	Compuestos	Grupo	Compuestos
Ciclodiénicos	Endrín	Difenilalifáticos	<i>p,p'</i> -DDT
	Endrín aldehído		<i>p,p'</i> -DDE
	Endosulfán sulfato		<i>p,p'</i> -DDD
	Heptacloro		Dicofol
	Heptacloro epóxido	Bifenilos Policlorados	PCB# 180
	Dieldrín		PCB# 126
	Aldrín		PCB# 153
	Endosulfán $\alpha\beta$		PCB# 118
Hexaclorociclohexanos	γ -HCH o Lindano		
	HCH técnico		

2.COMPUUESTOS DIFENILALIFÁTICOS**2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO****- P,P'-DDT**

En la Figura 21 se evidencia que todas las concentraciones evaluadas de *p,p'*-DDT mostraron diferencias significativas respecto al control negativo (CN), provocada por una mayor proliferación (desde $1,0E^{-5}M$ hasta $1,0E^{-11}M$). La comparación respecto al control positivo (CP) reveló que tan sólo $1,0E^{-6}M$ presentó diferencias, debida también por una mayor proliferación celular. El resto de molaridades se comportaron del mismo modo que lo hizo el CP, ya que no mostraron diferencias frente a éste.

Por otro lado, al comparar las siete concentraciones entre sí, se detectó que las molaridades intermedias fueron las que indujeron mayor efecto (en concreto, $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-6}M$), no existiendo diferencias significativas entre ellas. Por el contrario, la concentración $1,0E^{-11}M$ originó la menor respuesta (en valores medios de absorbancia) y, a pesar de ello, no mostró diferencias significativas respecto al CP.

Figura 21. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de *p,p'*-DDT en el ensayo *E-Screen*.

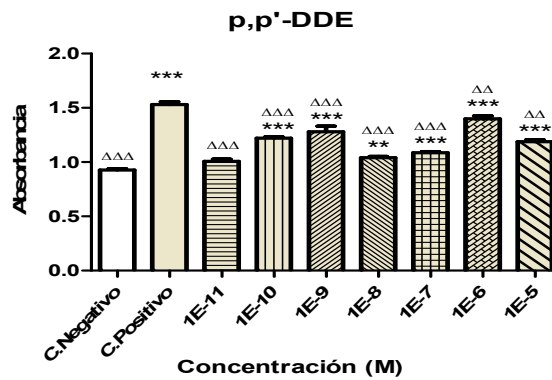


Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$
 Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$; Δ= $p < 0,05$

-p,p'-DDE

En la Figura 22 se aprecia que todas las concentraciones de p,p'-DDE resultaron ser significativamente más proliferativas que el CN, excepto tras la exposición de 1,0E⁻¹¹M. No obstante, a diferencia de su precursor (DDT), ninguna molaridad de p,p'-DDE alcanzó niveles proliferativos, en valor medio, similares al CP. Finalmente, las dos disoluciones que indujeron la mayor respuesta fueron 1,0E⁻⁹M y 1,0E⁻⁶M, al igual que en el caso del p,p'-DDT. En la gráfica se observa que, en términos generales, el efecto proliferativo se sitúa en niveles intermedios entre el CN y el CP.

Figura 22. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de p,p'-DDE en el ensayo E-Screen.



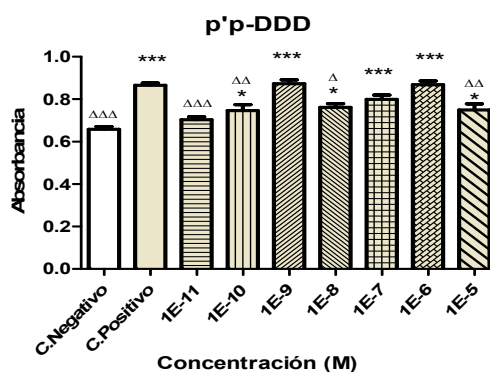
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$; Δ Δ= $p < 0,01$

-p,p'-DDD

La Figura 23 muestra que, para este metabolito del DDT, la exposición a 1,0E⁻¹¹M tampoco presentó diferencias con el CN, al igual que sucedió en el caso del p,p'-DDE. El resto de disoluciones sí produjeron mayor proliferación. Por otro lado, la adición de 1,0E⁻⁹ M, 1,0E⁻⁷ M y 1,0E⁻⁶M derivaron en una respuesta similar al CP, al no detectarse diferencias significativas respecto al mencionado control. Las cuatro diluciones restantes sí difirieron significativamente del CP, al no alcanzar niveles tan elevados como el 17β-estradiol. Finalmente, la máxima respuesta también se detectó a las concentraciones 1,0E⁻⁶M y 1,0E⁻⁹M, al igual que en el caso del p,p'-DDT.

Figura 23. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de *p,p'*-DDD en el ensayo *E-Screen*



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$

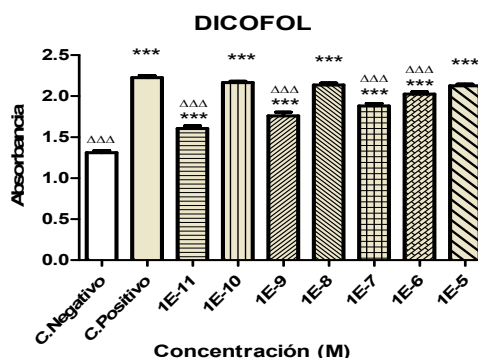
Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ Δ = $p < 0,01$; Δ = $p < 0,05$

- DICOFOL

Los datos plasmados en la Figura 24 revelan que, al igual que el *p,p'*-DDT, todas las concentraciones de dicofol mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al CN, al proliferar en mayor medida que éste. Atendiendo al comportamiento respecto al CP, se detectó que tres concentraciones provocaron la misma intensidad en la respuesta que dicho control: $1,0E^{-10}M$, $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-5}M$. Las restantes cuatro molaridades proliferaron en menor medida que el CP, difiriendo significativamente respecto a éste.

Por último, las dos disoluciones que dieron lugar a las respuestas más elevadas, en valor medio, fueron $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-8}M$, seguido muy de cerca de $1,0E^{-5}M$. En contraposición, $1,0E^{-11}M$ causó la menor proliferación de todas las evaluadas.

Figura 24. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de dicofol en el ensayo *E-Screen*.



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS COMPUESTOS DIFENILALIFÁTICOS

De los cuatro difenilalifáticos analizados (*p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE y dicofol) el *p,p'*-DDT y el dicofol fueron los que indujeron mayor respuesta en comparación al CN en el ensayo *E-Screen*. Ambos son productos de síntesis primigenios, dándose la particularidad, además, de que en la síntesis del dicofol se emplea DDT.

Para cada uno de los difenilalifáticos se obtuvo la media del RPE en porcentaje, la desviación estándar y mediana para cada una de las siete concentraciones evaluadas, reflejados en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo, su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de difenilalifáticos ensayada.

Molaridad (M)	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	Dicofol
1,0E ⁻¹¹	70,76 ± 88,79 11,14	22,15 ± 18,65 22,97	13,17 ± 8,64 15,99	31,97 ± 11,01 27,38
1,0E ⁻¹⁰	107,93 ± 61,27 73,25	42,61 ± 51,50 30,46	48,73 ± 5,10 48,47	93,23 ± 5,60 93,71
1,0E ⁻⁹	153,61 ± 47,31 179,49	103,77 ± 26,94 111,83	58,25 ± 22,97 54,11	48,84 ± 15,32 47,99
1,0E ⁻⁸	95,82 ± 65,36 83,53	49,97 ± 25,43 48,81	18,78 ± 4,86 18,23	90,25 ± 6,98 89,53

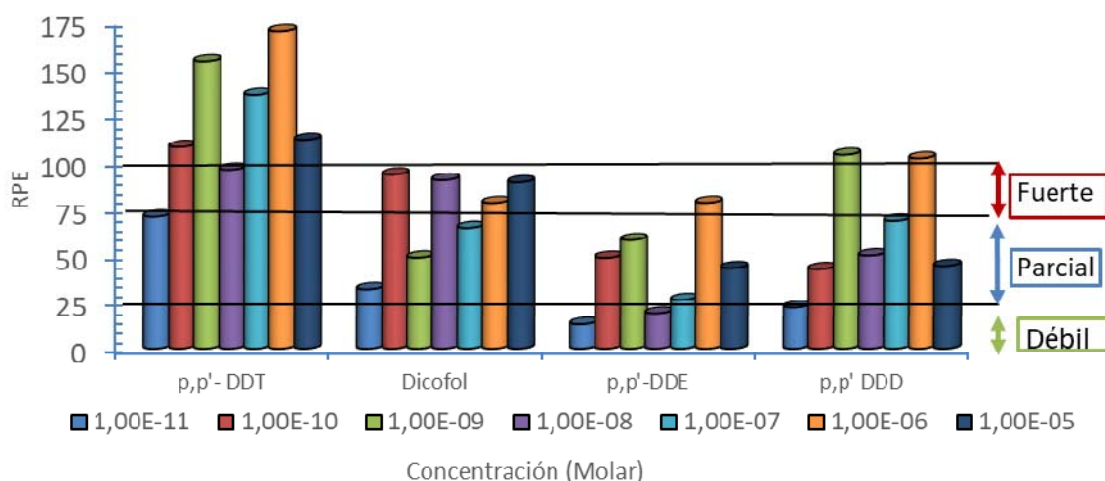
Molaridad (M)	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	Dicofol
1,0E ⁻⁷	135,76 ± 34,61 145,18	68,51 ± 28,29 60,16	26,24 ± 5,43 26,93	64,73 ± 9,87 60,84
1,0E ⁻⁶	169,72 ± 49,26 189,04	101,83 ± 25,79 105,31	78,18 ± 11,43 78,64	78,09 ± 8,96 76,24
1,0E ⁻⁵	111,85 ± 55,98 140,32	44,37 ± 50,48 55,57	43,21 ± 7,95 43,75	89,04 ± 0,02 88,18

Nota: Valor presentado como media del RPE en porcentaje ±desviación estándar y mediana

Como se observa en esta tabla, existen dos concentraciones no consecutivas para el *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD que desencadenan las respuestas más elevadas, 1,0E⁻⁶M y 1,0E⁻⁹M, ambos productos derivados del *p,p'*-DDT. El resto de concentraciones evaluadas originaron una menor proliferación, que disminuye con la molaridad (Figura 25).

Asimismo, en la Tabla 16, y su representación en la Figura 25 se observa que este grupo de compuestos dio lugar a una horquilla de respuestas muy amplia. Un claro ejemplo de ello es el *p,p'*-DDD, para el cual se obtuvieron valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) por los que se clasificarían como débiles y parcialmente estrogénicos (1,0E⁻¹¹M y 1,0E⁻¹⁰M, respectivamente), pero también fuertemente estrogénicos, como a 1,0E⁻⁹M ó 1,0E⁻⁶M. Tanto para el *p,p'*-DDD como para el *p,p'*-DDE se registraron valores de RPE inferiores al 20%, junto con otros valores que superaron ampliamente el 75% del efecto proliferativo relativo de forma intercalada, evidenciando un comportamiento oscilante en la respuesta.

Figura 25. Efecto proliferativo relativo (RPE) de los difenilalifáticos



Por último, el dicofol se comportó de manera similar al resto de difenilalifáticos, con la salvedad de que las variaciones en la respuesta a distintas concentraciones fueron de menor intensidad que en el resto de sus congéneres. De cualquier modo, también es considerado como fuertemente estrogénico al desencadenar una respuesta máxima proliferativa del 89% a $1,0E^{-5}M$.

2.COMPUUESTOS CICLODIÉNICOS

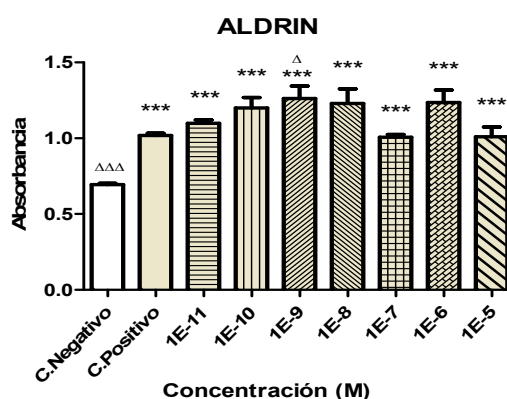
2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

- ALDRÍN

En la Figura 26 se observa como todas las concentraciones de aldrín evaluadas originaron mayor proliferación que el CP, a excepción de la concentración $1,0E^{-9}M$, la cual no difirió significativamente respecto a dicho control. Por tanto, bajo nuestras condiciones de trabajo, el aldrín mostró tener un carácter estrogénico, como mínimo, igual al control positivo empleado.

Por otro lado, las molaridades más efectivas fueron $1,0E^{-8}M$, $1,0E^{-9}M$, $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-6}M$, que resultaron ser estadísticamente iguales entre sí.

Figura 26. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de aldrín en el ensayo *E-Screen*



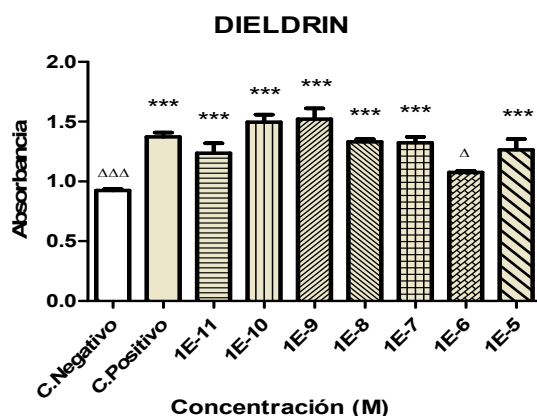
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

- DIELDRÍN

La respuesta del dieldrín fue similar a la de su precursor aldrín. La diferencia más evidente reside en la concentración $1,0E^{-6}M$ la única que proporcionó una respuesta proliferativa igual al CN (Figura 27). Las seis molaridades restantes, difirieron por mayores resultados proliferativos. En cuanto a la comparación de resultados frente al E2, no se detectaron diferencias significativas en seis molaridades evaluadas. Tan sólo la molaridad $1,0E^{-6}M$ difirió del CP. Finalmente, las concentraciones $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-9}M$ destacaron por ser más efectivas en sus valores medios, incluso, que el E2.

Figura 27. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de dieldrín en el ensayo *E-Screen*.



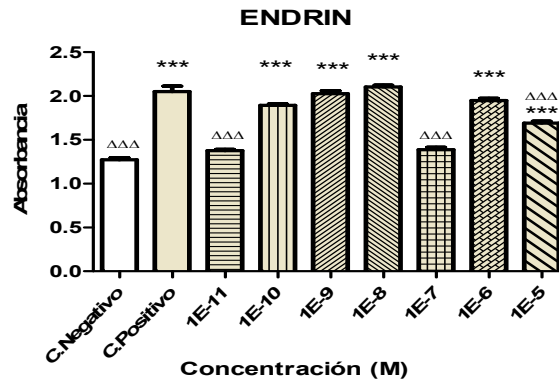
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

- ENDRÍN

En este caso, la Figura 28 revela que dos concentraciones ($1,0E^{-11}M$ y $1,0E^{-7}M$) mostraron una proliferación igual al control negativo. El resto de diluciones analizadas, sí proliferaron significativamente en mayor medida que el control negativo. Por otra parte, las disoluciones $1,0E^{-10}M$, $1,0E^{-9}M$, $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-6}M$ dieron lugar a una proliferación estadísticamente igual al control positivo.

Figura 28. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endrín en el ensayo E-Screen.



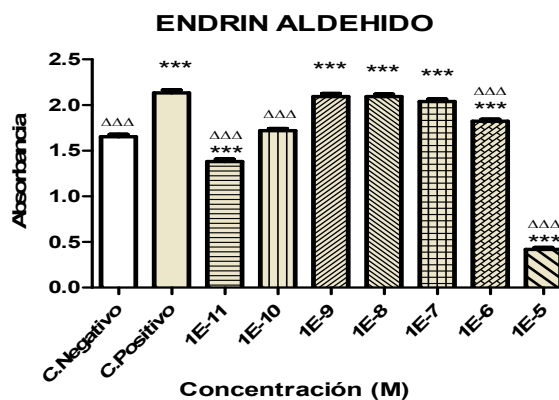
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- ENDRÍN ALDEHÍDO

En la Figura 29 se aprecia que, de las siete concentraciones ensayadas, tan sólo una de ellas no mostró diferencias frente al control negativo ($1,0E^{-10}M$). De las seis molaridades que dieron lugar a diferencias, dos se debieron a una menor proliferación, en concreto, $1,0E^{-11}M$ y $1,0E^{-5}M$. El rango comprendido entre $1,0E^{-9}M$, hasta $1,0E^{-6}M$ sí proliferaron más que el CN. Finalmente, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el CP frente a $1,0E^{-9}M$ ni $1,0E^{-7}M$ siendo, por tanto, las que mayor efecto desencadenaron.

Figura 29. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endrín aldehído en el ensayo E-Screen.



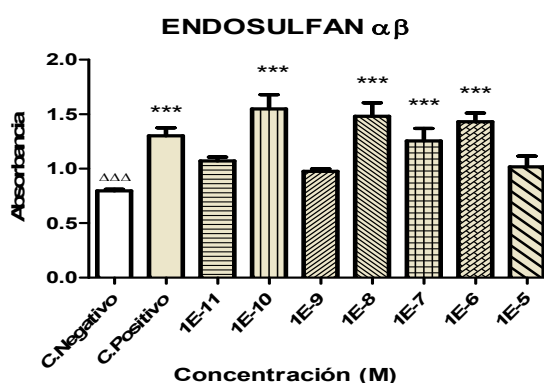
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- ENDOSULFÁN AB

Los resultados para el endosulfán $\alpha\beta$, representados en la Figura 30, revelaron que tres de las siete concentraciones no indujeron variaciones significativas respecto al control negativo ($1,0E^{-11}M$, $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-5}M$). Por su parte, el control positivo no mostró diferencias significativas con ninguna concentración evaluada.

Figura 30. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endosulfán α,β en el ensayo *E-Screen*



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

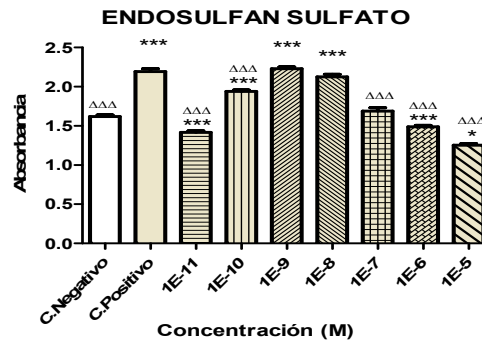
Por último, las dos molaridades que derivaron en los efectos proliferativos más notorios fueron $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-8}M$, sin que presentaran diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

- ENDOSULFÁN SULFATO

Mediante la Figura 31 se visualiza fácilmente que tan sólo la molaridad $1,0E^{-7}M$ no mostró diferencias significativas frente al CN. De las seis concentraciones restantes que sí presentaron diferencias, $1,0E^{-5}M$, $1,0E^{-6}M$ y $1,0E^{-11}M$, dieron lugar a un menor efecto que el CN. Por el contrario, el rango comprendido entre $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-10}M$, desarrollaron mayor respuesta que el control negativo.

Al cotejar los resultados de las disoluciones frente al CP se detectó que $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-8}M$ desarrollaron un efecto de igual magnitud que dicho control, siendo éstas las responsables del mayor efecto observado para el endosulfán sulfato.

Figura 31. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de endosulfán sulfato en el ensayo E-Screen.



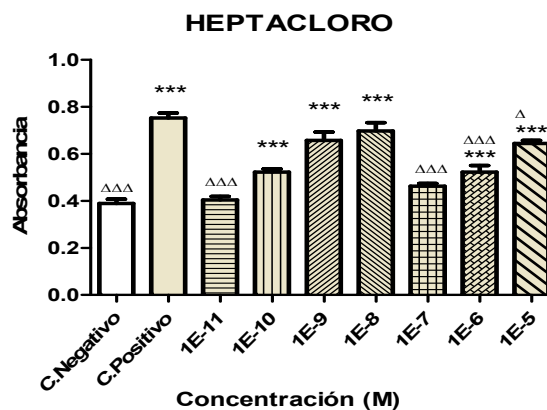
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$, *= $p < 0,05$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

- HEPTACLORO

En este caso, dos concentraciones no mostraron diferencias frente al CN ($1,0E^{-7}M$ y $1,0E^{-11}M$), como se aprecia en la Figura 32. El resto sí desarrollaron una respuesta proliferativa, detectándose además que las molaridades $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-8}M$ no difirieron del control positivo.

Figura 32. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de heptacloro en el ensayo E-Screen



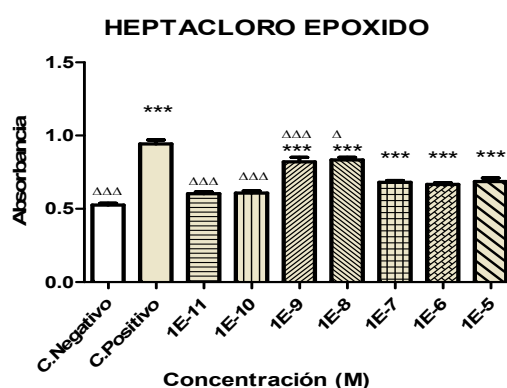
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

- HEPTACLORO EPÓXIDO

Como indica la Figura 33, el heptacloro epóxido a $1,0E^{-11}$ M y $1,0E^{-10}$ M no mostró diferencias frente al control negativo, pero sí el resto de diluciones evaluadas. Por otro lado, las siete molaridades difirieron del control positivo. La representación gráfica evidencia que el efecto total queda acotado entre el CP y el CN, siendo las molaridades $1,0E^{-8}$ M y $1,0E^{-9}$ M las de mayor efecto.

Figura 33. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de heptacloro epóxido en el ensayo *E-Screen*.



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS COMPUESTOS CICLODIÉNICOS

Un primer análisis global, al aplicar el concepto de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) y la categorización de la intensidad de la respuesta, permitió catalogar a todos los ciclodiénicos analizados (aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endosulfán sulfato, endosulfán $\alpha\beta$, heptacloro, heptacloro epóxido), como fuertemente estrogénicos (Tabla 17).

Bajo los parámetros empleados, el aldrín derivó en el máximo Efecto Proliferativo Relativo de los OC de su grupo, con un 175,49% de RPE máximo. Incluso en las dos molaridades que indujeron las menores respuestas, éstas alcanzaron valores análogos al CP. De este modo, resultó ser el compuesto más potente de todos los productos y mezclas evaluadas en el presente estudio. En contraposición, el heptacloro epóxido fue el que mostró la menor intensidad en su respuesta, con un 73,93% de RPE máximo.

Los ciclodiénicos estudiados originaron mayor efecto en las concentraciones centrales de toda la horquilla evaluada, apareciendo un efecto menor en las concentraciones más diluidas y en las más elevadas (Tabla 17). Esta respuesta es muy acusada en el caso del endosulfán sulfato y endrín aldehído, presentando valores negativos en las concentraciones analizadas más distantes.

Tabla 17. Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE), su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de compuestos ciclodiénicos ensayada.

Molaridad (M)	Aldrín	Dieldrín	Endrín	Endrín aldehído
1,0E ⁻¹¹	124,74± 23,05	69,35± 61,27	13,34± 3,71	-56,23± 20,85
	121,19	33,90	11,38	-61,47
1,0E ⁻¹⁰	156,21± 70,92	127,2± 47,18	79,66± 5,86	13,94± 17,72
	119,10	101,67	82,40	9,04
1,0E ⁻⁹	175,49± 84,57	132,86± 66,26	96,92± 12,38	91,49± 24,51
	128,70	93,09	95,20	95,73
1,0E ⁻⁸	165,6± 98,42	90,72± 13,14	106,8± 9,36	91,52± 19,87
	107,64	91,42	108,47	92,52
1,0E ⁻⁷	96,46± 14,82	88,92± 33,36	14,99± 10,48	79,93± 22,22
	101,14	79,04	18,32	84,53
1,0E ⁻⁶	167,56± 66,96	33,62± 7,74	86,99± 11,98	73,51± 17,05
	161,52	31,89	88,44	32,68
1,0E ⁻⁵	97,45± 66,57	75,61± 67,44	53,59± 11,74	-255,72± 17,16
	74,51	33,46	53,12	-254,55

Molaridad (M)	Endosulfán sulfato	Endosulfán αβ	Heptacloro	Heptacloro epóxido
1,0E ⁻¹¹	-35,39 ± 12,18	54,37± 32,32	4,28± 15,56	18,45± 7,55
	-36,79	107,78	-1,48	21,66
1,0E ⁻¹⁰	55,90± 10,83	148,8± 91,56	36,71± 15,57	19,58± 11,02
	55,63	265,66	32,61	16,03
1,0E ⁻⁹	106,65± 13,95	35,64± 13,03	73,81± 25,71	70,75± 26,77
	105,94	76,21	74,25	63,16
1,0E ⁻⁸	88,21± 22,09	135,52± 97,09	84,73± 25,50	73,93± 10,82
	89,52	255,13	86,07	72,76
1,0E ⁻⁷	11,81± 29,29	90,67± 90,78	20,17± 11,08	37,05± 10,48
	2,35	106,70	16,94	38,70
1,0E ⁻⁶	-23,18± 12,65	125,66± 73,80	36,72± 29,21	33,827± 11,96

Molaridad (M)	Endosulfán sulfato	Endosulfán $\alpha\beta$	Heptacloro	Heptacloro epóxido
	-21,94	205,02	24,09	33,42
1,0E ⁻⁵	-64,13± 13,39	43,79± 78,27	70,19± 10,91	38,43± 20,49
	-62,29	38,77	69,99	39,17

Nota: Valor presentado como media del RPE en porcentaje \pm desviación estándar y mediana

Para apreciar con suficiente claridad la respuesta de cada concentración y las diferencias entre los distintos ciclodiénicos, se han plasmado los resultados en distintas figuras. En la Figura 34 se agrupan el aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán $\alpha\beta$ (Figura 35); a continuación, sus derivados endosulfán sulfato y endrín aldehído, por presentar un comportamiento similar. Las particularidades de los dos heptacloros se describen más adelante. Con independencia de la forma de presentar los resultados, todos los compuestos ciclodiénicos evaluados resultaron ser fuertemente estrogénicos en, al menos, una de las concentraciones analizadas.

Figura 34. Efecto proliferativo relativo (RPE) del aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán $\alpha\beta$

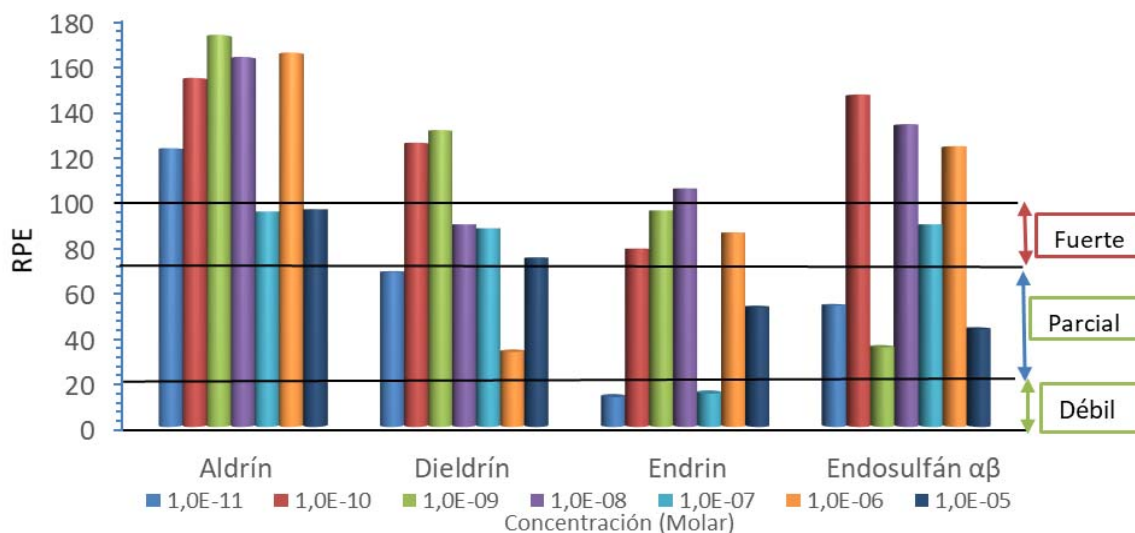
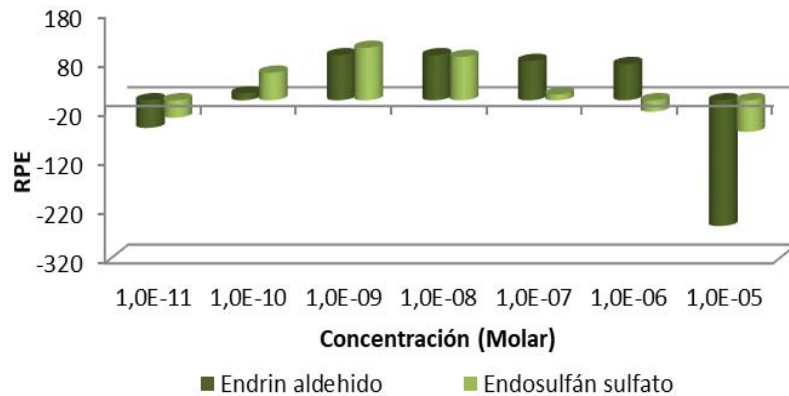


Figura 35. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) de endosulfán sulfato y endrín aldehído

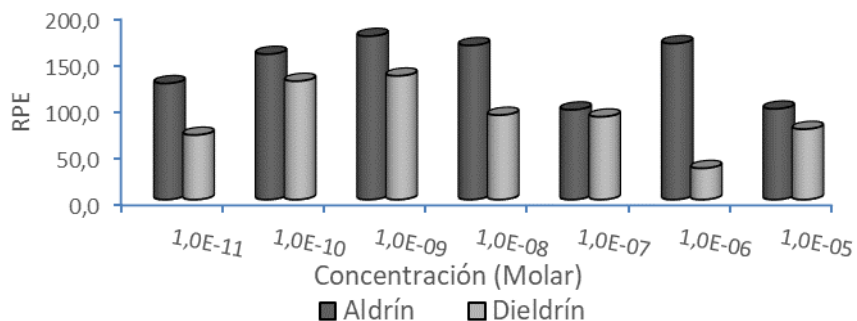


- ALDRÍN Y DIELDRÍN

En el caso particular del aldrín, la concentración que indujo la mayor proliferación fue $1,0E^{-9}M$, con un RPE de 175,49%. Por el contrario, el menor efecto proliferativo resultó de la exposición a $1,0E^{-7}M$ (96,46%), seguido muy de cerca de $1,0E^{-5}M$. A pesar de ser las concentraciones que menor efecto desencadenaron, ambas dieron lugar a una proliferación cercana al control positivo.

En la Figura 36 se comprueba que la concentración $1,0E^{-9}M$ de dieldrín (epóxido del aldrín) originó el mayor efecto proliferativo relativo (RPE), con el 132,86%; frente al menor efecto observado a $1,0E^{-6}M$, con un RPE igual a 33,62%.

Figura 36. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) aldrín y dieldrín.



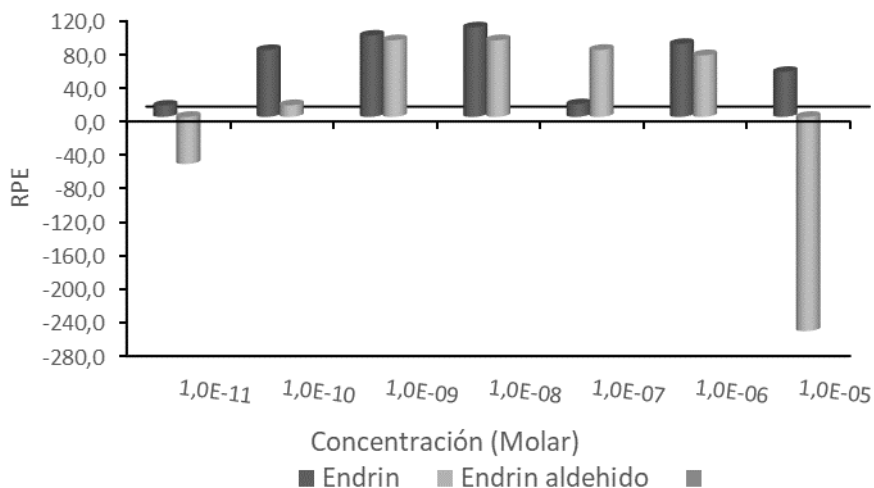
Ambos, aldrín y su epóxido (dielldrín), mostraron un patrón similar, salvo en la concentración $1E^{-6}M$. En cualquier caso, el RPE siempre resultó mayor en aldrín que en el dielldrín.

- ENDRÍN Y ENDRÍN ALDEHÍDO

Siguiendo con la tónica de los compuestos anteriores, la mayor proliferación del endrín se presentó en las concentraciones intermedias concretamente, a $1,0E^{-8}M$ (con un 106,8% de RPE de 106,8%, por tanto, fuertemente estrogénico); frente al 13,33% observado a $1,0E^{-11}M$, la cual resultó ser muy similar a la obtenida a $1,0E^{-7}M$ (14,99%); en cualquier caso, débilmente estrogénico

El endrín aldehído dio lugar a una mayor variación en la respuesta que el endrín (Figura 37). Al igual que en los compuestos anteriores, la máxima proliferación se evidenció en las concentraciones intermedias ($1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-8}M$) con un valor de RPE próximo al 91,5%. Esto permitió clasificar al endrín aldehído como fuertemente estrogénico a dichas concentraciones, pero presentó un efecto claramente opuesto en las concentraciones evaluadas más distantes. Concretamente, la dilución $1,0E^{-5}M$ dio lugar a un efecto negativo de -255,72%, y en la dilución $1,0E^{-11}M$ valores negativo también de RPE de -56,23%.

Figura 37. Efecto Proliferativo Relativo del Endrín y Endrín aldehído



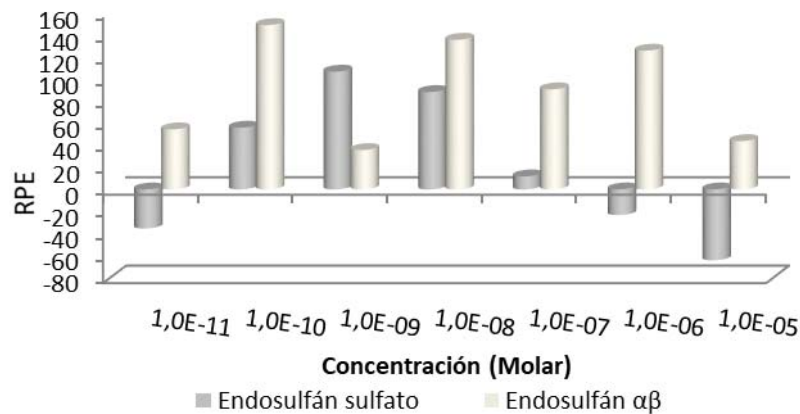
- ENDOSULFÁN AB Y ENDOSULFÁN SULFATO.

El máximo efecto observado para el endosulfán $\alpha\beta$ correspondió a la concentración $1,0E^{-10}M$ con un RPE de 148,8%, por lo que se clasifica como fuertemente estrogénico. La concentración responsable del menor efecto (RPE del 35,63%, parcialmente estrogénico) resultó ser la inmediatamente más diluida, es decir, a $1,0E^{-9}M$. Los datos indican la aparición

de los mayores efectos de forma intercalada entre concentraciones que presentan menor intensidad en la respuesta proliferativa.

Por otra parte, el endosulfán sulfato mostró un patrón completamente diferente (Figura 38). En este caso, predominaron los valores negativos en las concentraciones distantes, existiendo proliferación positiva notoria en las concentraciones comprendidas entre $1,0E^{-8}$ M y $1,0E^{-10}$ M. En éstas, el RPE alcanzó niveles clasificados como fuertemente estrogénicos, como es el caso del 106,65% a $1,0E^{-9}$ M. Sin embargo, el sentido proliferativo cambió de signo en $1,0E^{-11}$ M, $1,0E^{-6}$ M y $1,0E^{-5}$ M, siendo esta última molaridad donde se determinó un valor proliferativo de -64,131%.

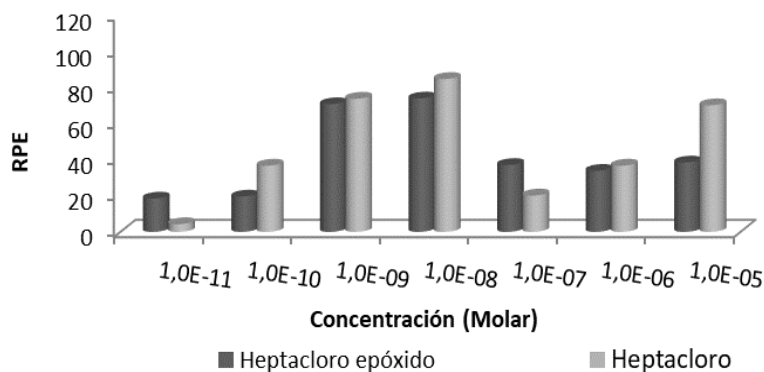
Figura 38 .Efecto Proliferativo Relativo (RPE) de endosulfán $\alpha\beta$ y endosulfán sulfato



- HEPTACLORO Y HEPTACLORO EPÓXIDO

Como se observa en la Figura 39 la respuesta resultó más elevada a concentraciones medias ($1,0E^{-8}$ M y $1,0E^{-9}$ M en ambos casos, Tabla 17), descendiendo a concentraciones adyacentes. Sin embargo, se produjo un repunte en la proliferación celular a $1,0E^{-5}$ M, (RPE igual a 70,19% para en el heptacloro y 156,91% para su epóxido). Se detectó una menor proliferación a $1,0E^{-11}$ M, (RPE igual a 4,28% y de 18,45%, respectivamente), comportándose como débilmente estrogénicos.

Figura 39. Efecto Proliferativo Relativo (RPE) del heptacloro y heptacloro exoepóxido



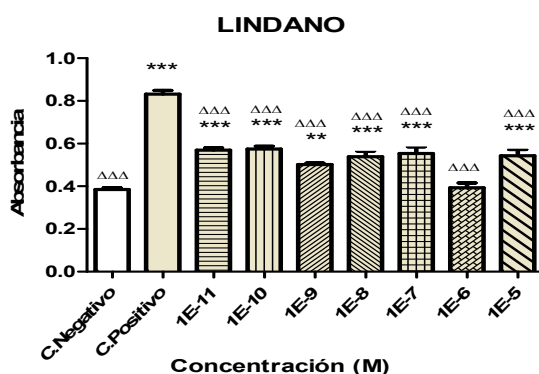
3.COMPUUESTOS HEXACLOROCICLOHEXANOS (HCH)

3.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

- LINDANO (Γ -HCH)

Todas las concentraciones de lindano o γ -HCH presentaron diferencias respecto al CN por ser más proliferativas, excepto $1,0E^{-6}M$ que no mostró diferencias (Figura 40). Del mismo modo, todas las concentraciones resultaron ser significativamente diferentes al control al CP, pero en esta ocasión, debido a una menor respuesta. De la Figura 40 también se destaca una uniformidad del efecto en todas las concentraciones entre sí, sin que se detecten diferencias estadísticas entre ellas, a excepción de la ya mencionada $1,0E^{-6}M$.

Figura 40. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de lindano en el ensayo *E-Screen*



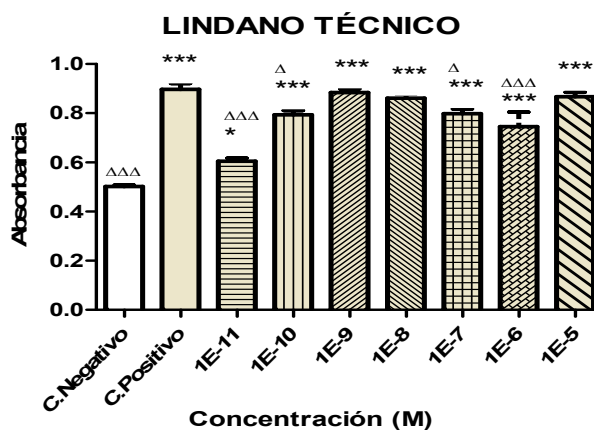
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

- LINDANO TÉCNICO (HCH TÉCNICO)

Como se aprecia en la Figura 41, las siete concentraciones de lindano técnico dieron lugar a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo, debido a una mayor proliferación. A diferencia de su homólogo γ -HCH, se observaron efectos próximos al CP. De la valoración de cada concentración respecto a dicho control se extrae que las molaridades $1,0E^{-9}M$, $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-5}M$ no difirieron significativamente respecto a éste, dando lugar a una respuesta de la misma intensidad que el CP.

Figura 41. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes de lindano técnico en el ensayo *E-Screen*.



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

3.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS HEXACLOROCICLOHEXANOS

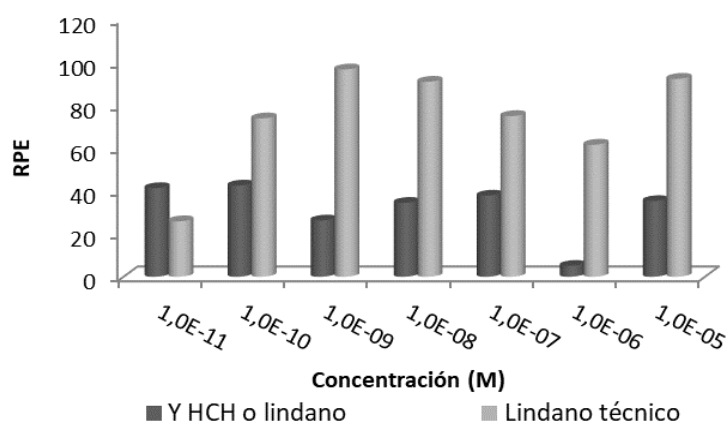
En la Tabla 18 se muestran los resultados del RPE de los hexaclorociclohexanos evaluados, el γ -HCH (o lindano) y el lindano técnico, representados en el Figura 42. Se aprecia fácilmente la diferencia en la intensidad de las respuestas, la cual permite clasificar al lindano técnico como fuertemente estrogénico, y al lindano, como parcialmente estrogénico.

Tabla 18. Hexaclorociclohexanos: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE), su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) ensayada.

Molaridad (M)	γ - HCH o Lindano	Lindano técnico
1,0E ⁻¹¹	41,3 ± 6,07 42,53	25,87± 11,09 28,46
1,0E ⁻¹⁰	42,49 ± 12,52 39,06	73,83± 14,60 74,14
1,0E ⁻⁹	26,24± 5,41 26,66	96,66± 12,06 97,17
1,0E ⁻⁸	34,45± 15,88 35,15	90,91± 13,68 91,86
1,0E ⁻⁷	37,81± 18,49 39,62	74,90± 16,58 71,61
1,0E ⁻⁶	7,88± 26,15 -4,64	61,56± 47,46 84,52
1,0E ⁻⁵	35,26± 17,34 32,47	92,28± 15,86 96,54

Valor presentado como media del RPE en porcentaje ±desviación estándar y mediana

Figura 42 . Efecto Proliferativo relativo (RPE) de hexaclorociclohexanos



Se detectó una respuesta celular diferente a cada uno de los HCH evaluados. En el caso del lindano, la concentración capaz de inducir la máxima proliferación se situó en 1,0E⁻¹⁰M. No obstante, tan sólo demostró poseer entorno al 42,49% del efecto del control positivo (RPE). El resto de concentraciones evaluadas mostraron efectos similares, excepto la concentración 1,0E⁻⁶M, cuyo efecto resultó prácticamente nulo (RPE igual al 7,88%).

Por el contrario, el lindano técnico dio lugar a una respuesta mucho más intensa, alcanzando incluso niveles propios del CP en tres de las concentraciones analizadas. La horquilla de RPE detectada abarcó desde el 25,87% (en el límite entre débil y parcialmente estrogénico) a $1,0E^{-11}M$ hasta casi el 96,66% a $1,0E^{-9}M$ por lo que se le asigna carácter fuertemente estrogénico en su RPE máximo.

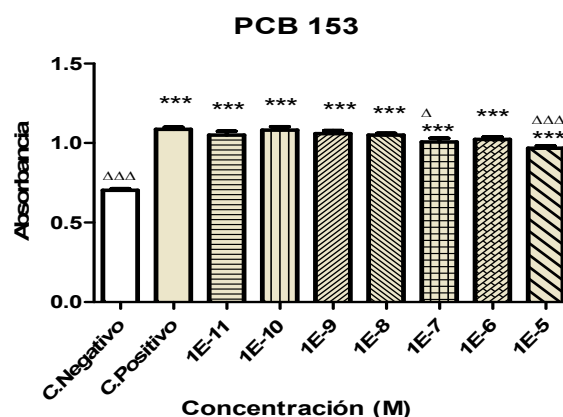
4.COMPUESTOS BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

4.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

- PCB# 153

Se obtuvo una respuesta significativamente mayor en todas las molaridades de PCB# 153 respecto al CN (Figura 43). De la comparación frente al CP $1,0E^{-7}M$ y $1,0E^{-5}M$ dieron lugar a diferencias estadísticamente significativas al producirse una menor proliferación que la inducida por el CP (E2). En cambio, las restantes exposiciones originaron una respuesta estadísticamente igual al dicho CP. La representación gráfica de los datos revela que, en cualquier caso, la proliferación observada en las siete concentraciones se aproximó a la inducida por el E2.

Figura 43 . Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#153 en el ensayo E-Screen



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

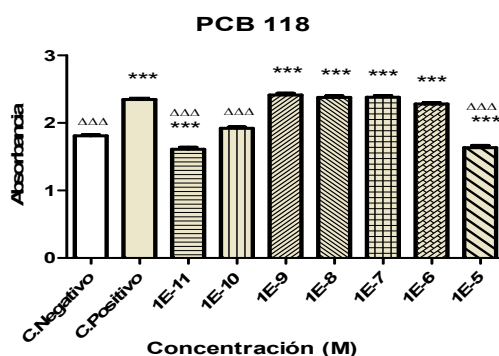
Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

- PCB# 118

La Figura 44 refleja que la única molaridad del PCB# 118 que no presentó diferencias en la respuesta respecto al CN fue la exposición a $1,0E^{-10}M$. Las seis diluciones restantes originaron modificaciones estadísticamente significativas en la normal proliferación del cultivo celular. Sin embargo, se evidencian dos tipos de comportamientos dentro del grupo de las seis molaridades que presentan diferencias frente al CN. Las provocadas por $1,0E^{-5}M$ y $1,0E^{-11}M$ se debieron a un descenso en el número celular. En cambio, las restantes diferencias se debieron a un incremento en la población del cultivo respecto al control negativo (desde $1,0E^{-6}M$ hasta $1,0E^{-9}M$ inclusive).

Además, de la comparación del efecto frente al control positivo se destaca que el rango comprendido entre $1,0E^{-9}M$ hasta $1,0E^{-6}M$ derivó en una respuesta estadísticamente igual a dicho control. No presentaron diferencias estadísticas entre ellas, siendo las que mayores proliferaciones desencadenaron.

Figura 44. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#118 en el ensayo *E-Screen*



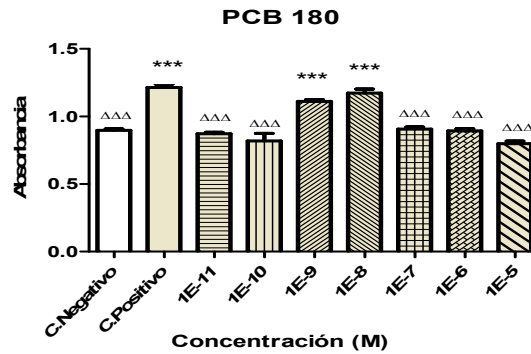
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$
 Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- PCB# 180

La Figura 45 refleja que la exposición a las siete concentraciones del PCB# 180 provocó una respuesta completamente diferente en función de la molaridad seleccionada. La respuesta resultó igual a la detectada en el CP tras la exposición a $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-9}M$. Sin

embargo, las restantes molaridades no desarrollaron ningún efecto, comportándose del mismo modo que el CN y a su vez, sin diferencias entre éstas.

Figura 45. Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PCB#180 en el ensayo E-Screen



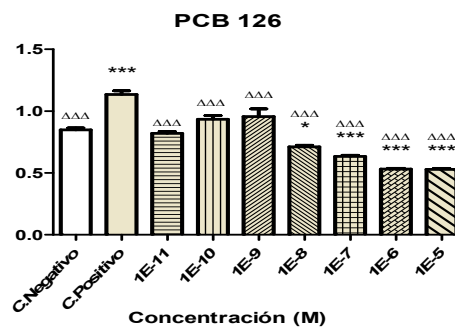
Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- PCB# 126

Por último, en la Figura 46 se observa que las diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo estaban originadas por $1,0E^{-8}M$, $1,0E^{-7}M$, $1,0E^{-6}M$ y $1,0E^{-5}M$. No obstante, las diferencias se debieron a una menor multiplicación celular que en el CN. Sin embargo, las molaridades más diluidas ($1,0E^{-11}M$ hasta $1,0E^{-9}M$) no mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al CN. Finalmente, en todos los casos la proliferación fue significativamente menor que el control positivo.

Figura 46 .Niveles de absorbancia tras la exposición a concentraciones crecientes del congénere PB#126 en el ensayo E-Screen.



Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$

Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

4.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS PCB

Los resultados proliferativos de cada uno de ellos se recogen en la Tabla 19. En ella se observa que para un mismo compuesto se pueden apreciar efectos claramente proliferativos a concentraciones concretas, y al mismo tiempo mostrar valores negativos a otras (por ejemplo, el PCB# 180). Destaca también el caso del PCB# 126 por presentar un efecto proliferativo poco notorio. Por otro lado, el compuesto que mostró menor variación en su respuesta resultó ser el PCB# 153.

Tabla 19. Valores del Efecto Proliferativo Relativo, su desviación estándar y mediana para cada concentración (M) de bifenilos policlorados (PCB) ensayada.

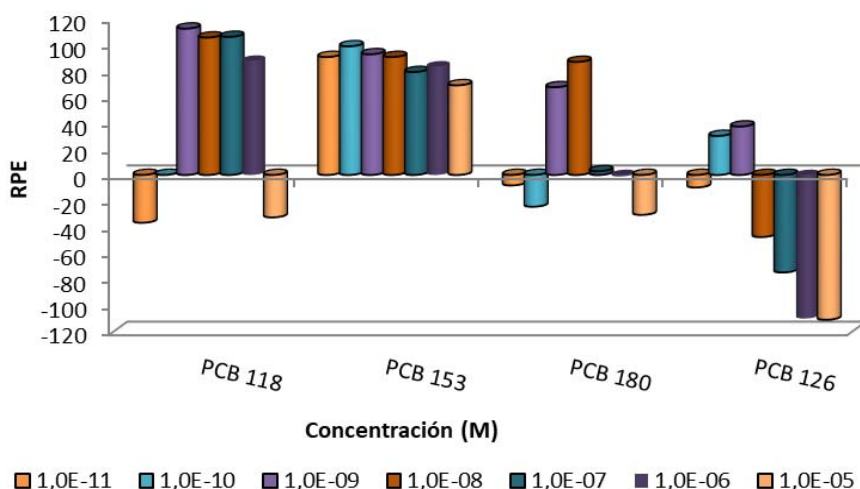
Molaridad (M)	PCB# 118	PCB# 153	PCB# 180	PCB# 126
1,0E ⁻¹¹	-36,71 ± 20,77	90,671± 16,56	-8,01± 12,67	-9,59± 19,10
	-43,81	88,84	-6,68	-7,15
1,0E ⁻¹⁰	0,00 ± 10,33	98,89± 14,63	-24,37± 75,15	30,01± 39,47
	19,20	101,11	12,04	22,87
1,0E ⁻⁹	112,48 ± 18,08	92,79± 12,71	67,45± 14,98	37,22± 81,82
	112,88	94,45	65,71	47,30
1,0E ⁻⁸	105,65 ± 16,67	90,66± 7,77	86,88± 34,43	-47,70± 14,89
	104,33	89,63	93,72	-46,24
1,0E ⁻⁷	106,15 ± 16,69	79,12± 16,07	2,84± 18,67	-74,90± 14,68
	106,37	76,32	7,16	-76,25
1,0E ⁻⁶	87,82 ± 9,97	83,46± 10,45	-1,17± 19,15	-110,31± 16,48
	87,13	84,02	-5,11	-113,59
1,0E ⁻⁵	-32,57± 24,43	68,91± 10,12	-30,63± 20,98	-111,24± 11,24
	-41,40	71,49	-33,44	-107,66

Nota: Valor presentado como media del RPE en porcentaje ±desviación estándar y mediana.

De la Tabla 19 se extrae que tres de los cuatro PCB (el PCB# 118, PCB# 153 y PCB# 180) se clasifican como fuertemente estrogénicos, quedando el PCB# 126 catalogado como parcialmente estrogénico en la máxima concentración efectiva.

En la Figura 47 se representa la respuesta de los cuatro compuestos en cada concentración analizada. Es destacable el comportamiento del PCB# 126, con efectos muy por debajo del CN en cinco de las siete molaridades. En cambio, el PCB# 153 originó una respuesta proliferativa muy notoria, con un 68,9% de RPE como valor más bajo. Finalmente, la molaridad más concentrada y la más diluida dieron lugar a los menores efectos en el grupo de los bifenilos policlorados.

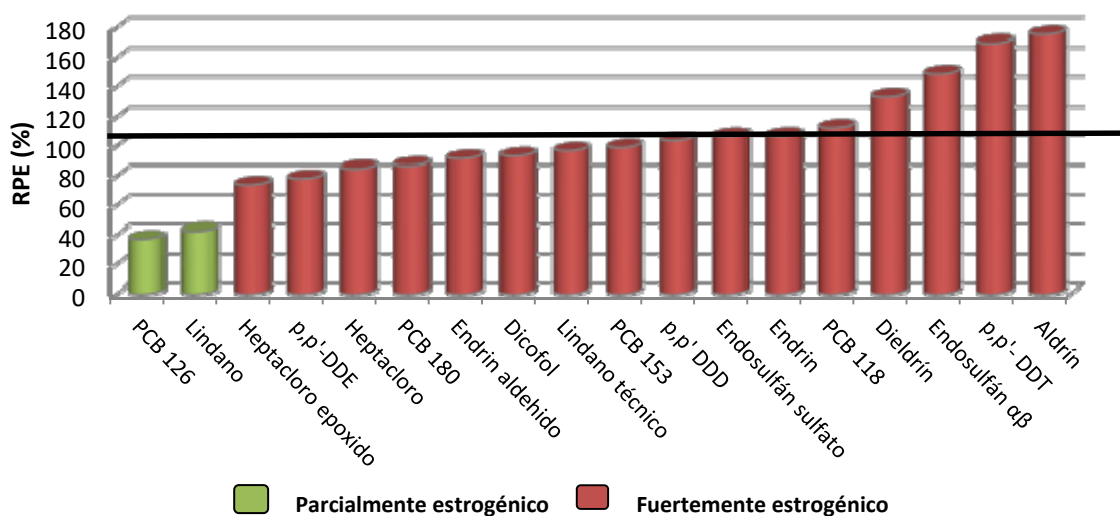
Figura 47 . Efecto proliferativo Relativo de PCB# 118, PCB# 153, PCB# 180 y PCB# 126



RESUMEN DE RESULTADOS EN CONJUNTO

En este apartado se abordan los resultados desde la perspectiva de un único conjunto de ensayos (constituido por los 18 OC evaluados) y destacando resultados comunes a todos ellos. Con ello se pretende dar una visión global que permita destacar resultados que, de otro modo, podrían pasar inadvertidos. En la Figura 48 se representa, en orden creciente, los valores del RPE máximo obtenidos para cada compuesto, resaltando el 100% del efecto por la línea negra (otorgado al control positivo, 1,0E⁻⁹M de E2).

Figura 48. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo de los compuestos testados individualmente



Al aplicar el rango establecido por Andersen et al. (1999) para clasificar los compuestos según su intensidad proliferativa, el heptacloro epóxido se catalogaría como parcialmente estrogénico al tener un 74% de RPE, encontrándose en el límite entre parcial y fuertemente estrogénico, establecido en 75%. Precisamente por hallarse en el límite con la categoría superior y aludiendo al principio de cautela, se ha optado por englobarlo como fuertemente estrogénico.

Sin embargo, el 11,11% del conjunto se clasifica como parcialmente estrogénicos, frente al 88,89% que se catalogan como fuertemente estrogénicos. Dentro de éste último grupo, el 50% supera el 100% del efecto, asignado al control positivo (Tabla 20).

Tabla 20. Clasificación de la potencia estrogénica de los OC evaluados por independiente.

Clasificación	% Respecto al total de organoclorados evaluados	
Parcialmente estrogénicos	11,0%	
Fuertemente estrogénicos	89,0 %	{ El 50% posee efecto inferior al 100% El 50% posee efecto superior al 100%

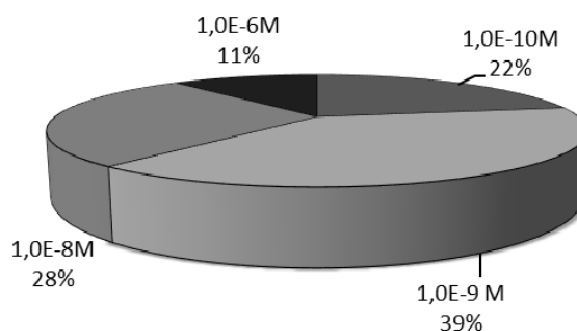
A raíz de los datos presentados en la Tabla 20 y Figura 48 también es posible conocer el carácter estrogénico de cada grupo químico. De este modo se observa que el 100% de los ciclodiénicos y difenilalifáticos estudiados actuaron como fuertemente estrogénicos; que cada hexaclorociclohexano se comportó de forma diferente (fuertemente y parcialmente estrogénicos); y por último se extrae que el 75% de los PCB evaluados desarrollaron un carácter fuertemente estrogénico y tan sólo el 25% lo hizo de forma moderada.

Tabla 21. Carácter estrogénico de cada grupo químico estudiado en porcentaje

Grupo Químico	Compuestos evaluados	Carácter estrogénico	% asignación para cada grupo químico
Ciclodiénicos	8	Fuertemente	100%
Difenilalifáticos	4	Fuertemente	100%
Hexaclorociclohexanos	2	Fuertemente	50%
		Parcialmente	50%
PCB	4	Fuertemente	75%
		Parcialmente	25%

Finalmente, del total de compuestos analizados por individualizado, la concentración que en más ocasiones dio lugar a la máxima proliferación celular sobre la línea MCF-7 correspondió a $1,0E^{-9}M$, concretamente, en el 39% de los compuestos (Figura 49). Le siguen en frecuencia la concentración $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-10}M$. Por tanto, las concentraciones medias desencadenaron en mayor número de ocasiones, los máximos efectos proliferativos en los OC evaluados de forma individualizada.

Figura 49. Frecuencia de aparición de las concentraciones que desencadenan el RPE máximo en los compuestos evaluados individualmente.



CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE III. DISCUSIÓN DE EFECTOS PROLIFERATIVOS INDUCIDOS POR COMPUESTOS ORGANOCORADOS

1.INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

En un primer lugar se reúne información relevante obtenida de la literatura científica alusiva al contenido de este trabajo, con la que discutimos nuestros resultados. Posteriormente, se expone un análisis global de los resultados obtenidos, tras comparar los datos entre los cuatro grupos químicos evaluados.

Antes de abordar la discusión de los datos de cada grupo, conviene recordar los siguientes aspectos para facilitar la comprensión de los resultados y, por ende, su discusión.

- a) Por un lado, se recuerda que los receptores estrogénicos ER α y ER β en el epitelio mamario regulan respuestas opuestas. El primero de ellos posee mayor carácter proliferativo, mientras que el segundo regula la actividad del ER α (información ampliada en el en la Parte II del Capítulo II).

- b) Por otro lado, se recuerda el concepto de agonismo/antagonismo, necesario en la interpretación adecuada los resultados. La designación del efecto agonista de un compuesto sobre un tipo de receptor implica la aparición de la respuesta fisiológica propia de dicho receptor. La referencia de un efecto antagónico sobre un isotipo de receptor (ER α o ER β) indica que de la interacción del compuesto con el receptor se deriva un efecto opuesto a la función propia del mismo, pero es necesario que se produzca la interacción. Este matiz es fundamental cuando predomine un solo tipo de receptor en un tejido, así como conocer los tipos de receptores expresados en la línea celular escogida, puesto que se ha comprobado que el efecto final es el resultado de la regulación de unos isotipos de receptores sobre otros. Un ejemplo de ello es la función del ER β 2, el cual presenta un efecto opuesto al ER α (éste último, responsable de la proliferación celular), pero en ausencia de ER α el ER β puede inducir proliferación, como se indica en el apartado correspondiente de la Parte II del Capítulo II.

2. DISCUSIÓN DE LOS GRUPOS QUÍMICOS EVALUADOS.

2.1. DIFENILALIFÁTICOS

El grupo de los difenilalifáticos se ha estudiado desde muchas perspectivas, por lo que es razonable que se disponga de mucha información desde hace décadas. A pesar de ello, percibimos la falta de consenso a la hora de dictaminar el grado de capacidad estrogénica del DDT y sus metabolitos consultados en la bibliografía (en adelante “ Σ DDT”), a pesar de haber sido estudiados durante muchos años, lo cual, puede parecer paradójico en un primer momento.

Está ampliamente aceptado en la comunidad científica que no todos ellos ejercen ni el mismo efecto ni con la misma intensidad ni tampoco sus isómeros, como se detalla a continuación. Por ello, a la hora de cotejar los datos, se ha de tener en cuenta los isómeros estudiados, además del difenilalifático en cuestión. Un ejemplo de ello son los datos aportados en 1997 por Soto *et al.* (1997) quienes estudiaron la actividad estrogénica concreta para cada isómero de DDT. Observaron que el *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, y *p,p'*-DDT actuaron como totalmente estrogénicos (agonistas) en el ensayo *in vitro* E-Screen, al igual que nuestros resultados en el caso del *p,p'*-DDT; mientras que el *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD los catalogaron como agonistas parciales (en nuestro caso, sí se comporta de este modo el *p,p'*-DDE), actuando el DDT técnico como agonista completo. Muchos autores asignan al *o,p'*-DDT la habilidad de competir con el 17β -estradiol por el receptor estrogénico (ATSDR, 2002). Tanto en su isómero *o,p'*-DDT como la mezcla de éste con *p,p'*-DDT, Lemaire *et al.* (2006) detectaron su capacidad para inducir la transcripción mediada por ER α y ER β de manera dosis dependiente, sobre la línea celular HeLa (sensible a estradiol), incidiendo incluso en el carácter agonista del DDT sobre ER β . De cualquier modo, los estudios *in vivo* parecen indicar que cualquier isómero o metabolito del DDT es menos potente que el 17β -estradiol (ATSDR, 2002) difiriendo nuestros resultados, ya que tanto el *p,p'*-DDT y el *p,p'*-DDD indujeron mayor respuesta que el estradiol (RPE máximos de 169,72% y 103,77%, respectivamente).

Esta capacidad de actuar sobre ambos isómeros podría justificar la elevada proliferación observada por Σ DDT, y principalmente, por el *p,p'*-DDT en este trabajo.

El trabajo publicado por la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2002) recopila información, entre otros aspectos, sobre estudios epidemiológicos, efectos *in vivo* e *in vitro*, y mecanismos de acción planteados para el Σ DDT. Como ocurre en otros compuestos, no siempre existe un consenso claramente establecido en los resultados de las investigaciones. También es posible encontrar documentos más recientes, como el publicado por Mrema *et al.* (2013) donde se citan numerosos artículos en los que se evalúan distintos aspectos para el sumatorio de los difenilalifáticos, entre otros compuestos, sobre ensayos *in vitro* e *in vivo* para Σ DDT, en los que se evaluaron diferentes mecanismos de acción (apoptosis, alteración de enzimas relacionadas con estrés oxidativo, afinidad por los distintos tipos de receptores hormonales etc.).

Además, el DDT actúa sobre las oxidasas que participan en el metabolismo de sustancias endógenas y exógenas, incrementando el catabolismo de los compuestos. Esta interferencia en ocasiones deriva en una disminución del efecto de otros compuestos. Se ha comprobado que la capacidad de incrementar el metabolismo puede ser incluso beneficiosa en ciertas situaciones, como se evidencia en estudios *in vitro* que apuntan que el DDT puede disminuir el riesgo de desarrollo de tumores al incrementar el metabolismo de sustancias promotoras de tumores (ATSDR, 2002).

Por otro lado, el DDE es capaz de interactuar sobre el receptor androgénico y el estrogénico, aunque no del mismo modo sobre ambos. Hace ya tres décadas se publicó el carácter agonista débil del *p,p'*-DDE sobre el receptor estrogénico (Sohoni y Sumpter, 1998). Con posterioridad, se amplió el conocimiento sobre su mecanismo de acción al descubrirse su capacidad anti-androgénica al antagonizar al receptor androgénico (ATSDR 2002; Sanderson y van den Berg 2003). Además, otros estudios han corroborado la hipótesis sobre el mecanismo de acción estrogénico, al no detectar proliferación significativa del DDE sobre células sin capacidad de expresar receptores estrogénicos (ATSDR 2002). En la misma línea, otros autores han incidido en el marcado carácter antagonista androgénico sobre líneas celulares capaces de expresar ER α y receptores androgénicos, responsables de respuestas opuestas en células epiteliales mamarias (Aubé *et al.*, 2008).

Del mismo modo que sucede con el DDT, se ha detectado que el *p,p'*-DDE incrementa las enzimas hepáticas del CYP implicadas en el metabolismo de la testosterona y de la actividad de la aromatasa en distintos estudios *in vivo* sobre ratas (ATSDR, 2002).

En cuanto al dicofol, no existe consenso acerca de su actividad estrogénica y mecanismo de acción, aunque se le confiere semejanzas con el DDE. El dicofol ha sido catalogado como antiestrogénico (Soto *et al.*, 1998) aunque contrariamente también se ha descrito su actividad estrogénica (Okubo *et al.*, 2004), estas últimas afirmaciones más en consonancia con nuestras observaciones. El equipo de Okubo apuntó hacia su capacidad de unión al ER α y AR (receptor estrogénico α y androgénico, respectivamente), detectando también citotoxicidad a elevadas concentraciones (> 10 hasta 100 μ M) en la exposición a cultivo MCF-7, frente a nuestros datos, donde no detectamos citotoxicidad en ninguna concentración testada. A raíz de esta observación, resaltaron la importancia de no vincular como efectos antiestrogénicos la menor proliferación detectada a las dichas molaridades, ya que el descenso en el número celular sería consecuencia de su citotoxicidad. A su vez, en los estudios realizados por Vinggaard *et al.* (1999) sobre MCF7, donde expusieron heptacloro y dicofol a 0.001 μ M, 0,1 μ M y 10 μ M, no detectaron efecto proliferativo significativo. En cambio, en nuestros ensayos todas las molaridades ensayadas de dicofol resultaron ser proliferativas, como ya se ha comentado; y aunque a 0,1 μ M el heptacloro demostró tener un RPE del 20% en nuestros estudios, en las otras dos concentraciones indicadas del citado estudio, sí resultaron ser parcialmente proliferativas, como se apunta en el apartado correspondiente al heptacloro.

2.2. CICLODIÉNICOS

No todos los compuestos de este grupo se han estudiado con la misma profundidad en la bibliografía científica, no encontrándose información relevante relacionada con el objeto de nuestro estudio para todos los compuestos. A lo largo de este apartado se aportan datos puntuales de hexaclorociclohexanos, puesto que frecuente encontrar trabajos en los que se han estudiado conjuntamente con ciclodiénicos, por lo que resulta interesante reflejar las posibles comparaciones.

A raíz de los resultados obtenidos hemos detectado un paralelismo entre el orden de salida al mercado de los ciclodiénicos (y de la aparición de sus metabolitos) y el número de concentraciones que presentaron diferencias significativas respecto al control negativo. Mención especial merecen el endrín aldehído y el endosulfán sulfato, como se describe más adelante. Según recoge Matolcsy en su libro *Chemistry Pesticide* (Matolcsy *et al.*, 1988), cronológicamente, los primeros ciclodiénicos sintetizados fueron el clordano (el cual no es objeto de estudio de esta tesis, pero es el precursor del heptacloro y su epóxido) y el aldrín. El aldrín, por tanto, es el ciclodiénico estudiado que salió a la venta en primer lugar resultando ser, además, no sólo el ciclodiénico más proliferativo, sino también el que mayor efecto produjo de todos los OC analizados. En el caso del aldrín, todas las molaridades estudiadas dieron lugar a una proliferación mayor que el control negativo. El dieldrín, primer metabolito del aldrín, proliferó en mayor medida que el control negativo en seis de las siete concentraciones estudiadas, por lo que no mostró diferencias en una de ellas. De la degradación del dieldrín aparece el endrín, que presentó dos concentraciones sin diferencias significativas respecto al control negativo, al igual que el heptacloro y el heptacloro epóxido.

Pocos años tras la comercialización del clordano y del aldrín apareció el endosulfán (Matolcsy *et al.*, 1988). El endosulfán técnico, constituido a partir de la mezcla de los isómeros α y β , es el que presentó mayor número de concentraciones sin diferencias estadísticamente significativas frente al control negativo (CN) de los ciclodiénicos analizados.

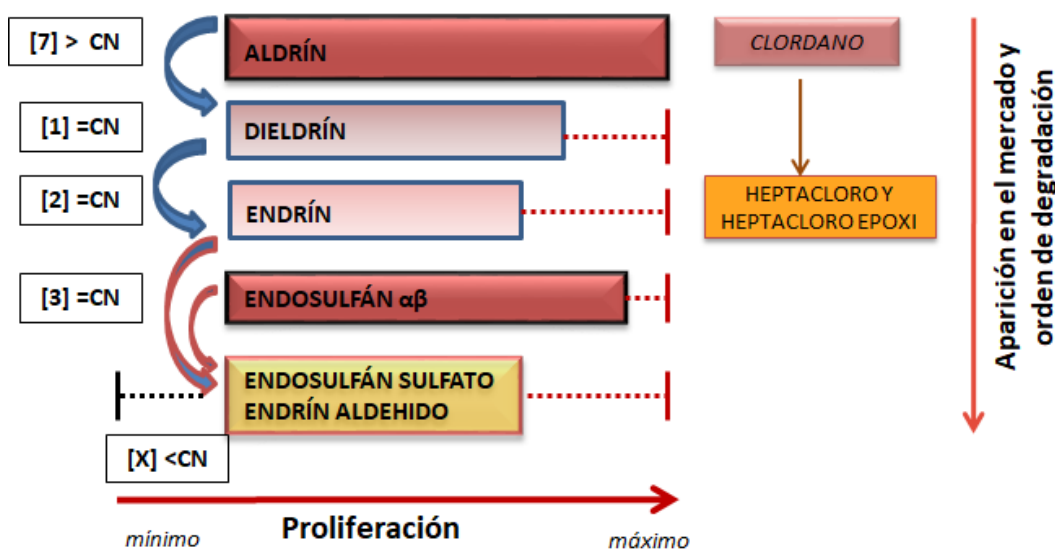
Asimismo, detectamos que la presencia de grupos aldehídos y sulfatos procedentes de reacciones de biotransformación del endrín y endosulfán respectivamente, dieron lugar a compuestos que indujeron menor proliferación que el CN. Los procesos citotóxicos y la inhibición de la proliferación por actividad antiestrogénica no deben confundirse, a pesar de que en ambas situaciones derive en una disminución del número de células (León *et al.*, 2006; Okubo *et al.*, 2004).

Por tanto, se observa una disminución de la proliferación/efecto/toxicidad desde los primeros compuestos hasta los últimos productos comercializados, al mismo tiempo que se aprecia cómo los productos de degradación de los compuestos originales dan lugar a compuestos cada vez menos estrogénicos.

No obstante, esta disminución de la inducción de la proliferación no debería asumirse como una garantía de mayor seguridad, ya que en todos ellos se aprecian concentraciones que dan lugar a efectos proliferativos de igual intensidad que el control positivo. Por ello es recomendable ser cautelosos ante la exposición y valoración del riesgo de todos ellos, teniendo en cuenta que el efecto resultante puede variar de manera significativa en función de la concentración seleccionada.

En la Figura 50 se esquematizan los aspectos más reseñables anteriormente comentados.

Figura 50. Esquemización del nivel de proliferación de los compuestos ciclodiénicos, teniendo en cuenta el orden de aparición de los productos de degradación y su aparición en el mercado.



En granate se representan los tres productos “originales” a partir de los cuales aparecen el resto de compuestos analizados. El clordano y aldrín se sitúan al mismo nivel en la figura por ser los que se comercializaron en primer lugar; el endosulfán también en granate, se sitúa en niveles inferiores en la figura ya que salió al mercado pocos años más tarde. Mediante fechas se indican los compuestos según el orden en el que se producen los productos de degradación de cada uno de los ciclodiénicos citados. A izquierda, junto a cada compuesto, se indica el número de molaridades sin diferencias significativas respecto al CN,

incluida la respuesta detectada en el endrín aldehído y endosulfán sulfato, que mostraron dos y tres concentraciones respectivamente con niveles proliferativos inferiores al CN. Dicha información se representa mediante “[X]<CN” en la figura 50. Por último, la flecha roja inferior indica el grado la intensidad proliferativa de cada uno de ellos respecto al aldrín, compuesto en donde todas las concentraciones evaluadas mostraron mayor carácter proliferativo que el control negativo, y cuya menor proliferación se asemejó al CP en nuestro estudio.

El potencial estrogénico del dieldrín y del endosulfán se cita desde finales de los noventa (Andersen *et al.*, 2002; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 1997; Mrema *et al.*, 2013; Rasmussen *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 1997), aunque desde mediados de dicha década comenzó a demostrarse la actividad estrogénica del dieldrín, endosulfán y lindano en células procedentes de tumores mamarios y, posteriormente, en diferentes investigaciones (Lemaire *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 1995, 1994). En el año 1994, Soto y colaboradores obtuvieron resultados de un efecto proliferativo relativo para el dieldrín (10 μ M) de 54.89% respecto del control positivo (17 β -estradiol a 10 pM) sobre la línea celular MCF-7. En cambio, en nuestro caso mostró un 90,72% a 1 nM. Por su parte, Wade *et al.* (1997) observaron un incremento celular igual a 3.4 veces respecto del control en MCF-7 expuestas a dieldrín 50 μ M. No obstante, Briz *et al.* (2011) detectaron mayor sensibilidad para el dieldrín al obtener proliferación significativa a 5 μ M.

Los efectos derivados de la interacción de los perturbadores endocrinos dependen de multitud de factores, entre los que se destaca la expresión de receptores hormonales. En este sentido, se ha propuesto una mayor afinidad del dieldrín frente al ER α respecto al endosulfán y lindano (Scippo *et al.*, 2004; Sumbayev *et al.*, 2005), así como mayor afinidad por ER α que por ER β (Gale *et al.*, 2004). Esta información explicaría nuestras observaciones ya que el dieldrín resultó ser más proliferativo que el endosulfán sulfato y los hexaclorociclohexanos. La información aportada por Lemaire *et al.*, (2006) se encuentra en la misma línea, apuntando que el endosulfán es capaz de activar al ER α y antagonizar débilmente al ER β , incrementando así la actividad proliferativa del endosulfán (puesto que la acción propia del ER β es la regulación de su homólogo ER α) puntualizando además, que tanto el aldrín como el dieldrín no antagonizan al receptor α , pero sí ejercen efecto

antagónico sobre el ER β , aumentando así el número de células al inhibir la actividad antiproliferativa propia del ER β .

La capacidad de la doble acción (agonismo/antagonismo) para un mismo compuesto y la afinidad desigual sobre uno u otro tipo de receptor explicaría nuestros resultados, especialmente los referentes al aldrín. Este compuesto, como ya se ha indicado, es el que dio lugar al mayor efecto proliferativo relativo de todos los OC y mezclas analizadas. Según lo apuntado anteriormente en referencia a la actividad sobre cada isotipo de receptor estrogénico, en presencia de ER α y ER β la respuesta proliferativa se vería potenciada frente a las células que tan sólo expresan un tipo de receptor. En otras palabras, el aldrín, al igual que el dieldrín, serían afines al receptor estrogénico (por su capacidad de interactuar tanto con α como con β , pero con carácter agonista para el ER α y antagonista para el ER β). El equipo de Lemaire *et al.* (2006) evaluó la capacidad antiestrogénica de 49 compuestos sobre líneas transfectadas para ER α y ER β . Sus resultados mostraron que tanto el aldrín como el dieldrín no antagonizaron al receptor alfa, pero sí ejercían efecto antagónico sobre el ER β , justificando así la acción proliferativa de dichos organoclorados hallados en nuestro trabajo.

Por su parte, Briz *et al.* (2011) estudiaron el mecanismo de acción no genómicos del dieldrín, endosulfán y lindano sobre dos poblaciones celulares neuronales, por medio de una interacción directa con los receptores estrogénicos. Observaron que el dieldrín, en cultivo neuronal primario, es capaz de activar la respuesta estrogénica por procesos no genómicos, al incrementar la regulación extracelular de la kinasa 1 y 2, resultando una respuesta semejante a la obtenida tras la exposición de 10 nM de E2. También detectaron que la exposición de lindano, dieldrín y endosulfán, reducían los niveles de ER α , pero no de ER β en neuronas de la cortical y en tejido cerebeloso.

Además de todo lo mencionado, estos tres compuestos (aldrín, endosulfán y lindano) también han sido catalogados como antagonistas androgénicos, e incluso se ha descrito la inhibición de la actividad aromatasa por parte del lindano y del endosulfán (Andersen *et al.* 2002; Li *et al.*, 2008; Nativelle-Serpentini *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios realizados por Kojima *et al.* (2004), mostraron que el lindano no inhibía la señal androgénica.

Con independencia de la acción sobre los receptores hormonales, otra forma de modificar el sistema endocrino es influenciando indirectamente sobre éste, del mismo modo que se ha descrito para los ciclodiénicos. Esta capacidad la tiene, entre otros compuestos, el endosulfán y el dieldrín, al inducir las enzimas del CYP1 responsables del metabolismo del estradiol (Mrema *et al.*, 2013).

Respecto al heptacloro y su epóxido, no abundan los estudios sobre su capacidad para alterar el sistema endocrino, por lo que su interpretación debe ser cautelosa. Los escasos documentos publicados revelan que no existe una afección sobre el sistema endocrino ni en animales ni en el ser humano, por parte del heptacloro ni del heptacloro epóxido. Sí se ha postulado, en ensayos *in vitro* sobre roedores, diferentes alteraciones de la glándula adrenal en función de la dosis, del mismo modo que parece ser que no se ven afectadas las ni las hormonas tiroideas ni el tiroides (ATSDR, 2007). Estudios sobre la capacidad de interacción de siete pesticidas con los isotipos de ER en el pez medaka (*Oryzias latipes*), revelaron que el heptacloro no era capaz de activar a ninguno de ellos, o lo hacía en escasa medida. En cambio, el endosulfán tan sólo demostró actividad sobre el ER α , ambos productos, en un rango de $1,0E^{-11}M$ hasta $1,0E^{-6}M$ (Chakraborty *et al.*, 2011).

Aunque ya se ha mencionado en el apartado de los difenilalifáticos, en el trabajo publicado por Vinggaard *et al.* (1999) se menciona que el heptacloro no activó los receptores estrogénicos a $0,001 \mu M$, $0,1 \mu M$ y $10 \mu M$, al no mostrar proliferación estadísticamente significativa sobre MCF-7. Resultados coincidentes con los estudios realizados por Lemaire *et al.* (2006), sobre la capacidad del heptacloro para activar/inhibir ambos tipos de receptores estrogénicos, al no mostrar ninguna actividad estrogénica sobre ellos a $10 \mu M$. En cambio, no podemos afirmar que se comportaron del mismo modo ni el heptacloro ni su epóxido en nuestro trabajo. A $10 \mu M$ observamos que el heptacloro se comportó como parcialmente estrogénico (con cerca del 70% de RPE), valor similar al observado a $0,001 \mu M$; en cambio, a $0,1 \mu M$ tan sólo supuso un 20% del RPE. En cambio, la forma epóxida indujo una proliferación similar al heptacloro en la concentración más baja, frente a los valores próximos al 37,5% detectados en las dos diluciones restantes.

2.3. HEXACLOROCICLOHEXANOS (HCH): LINDANO O γ -HCH Y LINDANO TÉCNICO

De los dos HCH, el lindano o γ -HCH se ha estudiado con mayor frecuencia en este campo. Lemaire y *et al.* (2006) concluyeron que el lindano, a 10 μ M, no desarrolla actividad estrogénica sobre ninguno de los dos tipos de receptores estrogénicos. A la misma concentración, en nuestros ensayos se observó un efecto proliferativo de 37,8%, ascendiendo hasta 74,9% en el lindano técnico. En cambio, ensayos realizados por Okubo *et al.* (2004) evidenciaron la capacidad citotóxica del lindano a elevadas concentraciones, señalando, además, la necesidad de no confundir citotoxicidad con actividad antiestrogénica cuando se detecte un descenso del número celular. *A priori*, en nuestros ensayos no se observaron problemas de citotoxicidad para ninguno de los dos HCH. No obstante, la proliferación celular inducida por el γ -HCH a $1E^{-6}$ M no difirió del control negativo.

Existe cierta controversia sobre el tipo de efecto y el grado de la modificación de la respuesta estrogénica para los HCH, aunque la capacidad de interactuar con distintos receptores hormonales está bien documentada desde hace décadas. Es posible encontrar información referente a la capacidad estrogénica del lindano desde finales del siglo XX (Flouriot *et al.*, 1995), e incluso se constata la capacidad del lindano de inhibir la síntesis de ADN en tejido reproductor (Tiemann *et al.*, 1996). Con el paso de los años se ha ido profundizando en el conocimiento sobre el mecanismo de acción, lo que ha permitido que varios autores aseveren que el lindano se comporta como antagonista para el ER α , al mismo tiempo que actúa como agonista del ER β (Briz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008; Maranghi *et al.*, 2007). Sin embargo, Briz y *et al.* (2011) apuestan por una predominancia del carácter antagonista del ER más allá del agonista, lo cual estaría en consonancia con nuestros resultados para el lindano (ya que el valor máximo de RPE fue 42,5% a $1E^{-10}$ M). Se ha constatado que también antagoniza al receptor androgénico (aunque sí parece tener cierta actividad sobre éste), así como su capacidad de inhibir a la aromatasa (Li *et al.* 2008; Maranghi *et al.*, 2007). Por tanto, parece que hay consenso a la hora de no catalogar al lindano como un potente estrogénico, al no actuar por mecanismos de acción eminentemente proliferativos.

En cambio, el lindano técnico actuó de manera diferente en nuestro estudio, alcanzando valores de RPE próximos al 96%. Por ello se le catalogó como fuertemente

estrogénicos. No hemos encontrado estudios similares con los que comparar nuestros resultados, pero puesto que éste es una mezcla de isómeros, generalmente, por la combinación de α -HCH (53 - 70%), β -HCH (3- 14%), γ -HCH (11- 18%), δ -HCH (6- 10%) y ϵ -HCH (3 - 5%) (MAGRAMA, 2013), podemos hacer una valoración haciendo referencia a los datos hallados para algunos de ellos. Según los estudios de Kojima *et al.* (2004), el isómero β y el isómero δ fueron los únicos que indujeron transcripción del ER α y ER β , mientras que el isómero γ (o lindano) tan sólo produjo efecto sobre el ER β , describiéndose también su capacidad para inhibir a la aromatasa (Li *et al.*, 2008; Maranghi *et al.*, 2007). En cambio, el isómero α no actuó sobre ninguno de los receptores estrogénicos. Por otra parte, ningún isómero parece inhibir la señal del receptor androgénico (AR) (Kojima *et al.*, 2004). Por tanto, tres isómeros presentan actividad sobre el ER β (cuya función principal es regular a su homólogo α), mientras que dos de ellos lo harían también sobre ER α (con mayor carácter proliferativo). Además, el lindano técnico desencadena un efecto muy similar sobre los receptores estrogénicos que el endosulfán, según aporta Lemaire *et al.* (2006), aludiendo a la capacidad del ciclodiénico para activar al ER α y antagonizar débilmente al ER β . Todo lo aportado podría explicar el elevado resultado obtenido en nuestros ensayos

2.4. BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

Los compuestos bifenilos policlorados forman un grupo muy heterogéneo, compuesto por 209 congéneres. La respuesta biológica que desencadenan depende de su estructura química, ya que, en función del patrón de sustitución de los hidrógenos de sus anillos fenólicos- en los que juega un papel importante las moléculas de cloro- el efecto varía. Así pues, es conveniente conocer la estructura química, en especial si es coplanario/no coplanario y el grado de cloración de las moléculas (Plíšková *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014) para prever cómo se comportarán los compuestos y el posible efecto derivado. Los PCB se suelen agrupar en función de su patrón de sustitución. Aquellos en donde los grupos clorados se sustituyen en posiciones orto (2,2',6,6') se denominan no coplanares; y las moléculas en las que el cloro no ocupa posiciones orto, se refieren como coplanarios o tipo dioxina. También forman parte del grupo de los "tipo dioxina" los que tan sólo tienen un átomo de cloro en una de las cuatro posiciones orto, denominado también como PCB mono-ortoclorados (Faroon *et al.*, 2003).

Quizá, debido a la heterogeneidad del grupo no es posible obtener información sobre los efectos derivados de la exposición que sean extrapolables a todos los congéneres de PCB. Por ello con frecuencia se alude en la literatura científica a la inconsistencia de los datos, falta de información o necesidad de seguir investigando para poder incrementar el conocimiento sobre los riesgos asociados a la exposición.

Por el contrario, sí parece que existen características estructurales comunes a cada grupo (coplanar/no coplanar) que inducen efectos propios de cada uno de ellos, aunque también es posible encontrar efectos intermedios para aquellos casos en que se den propiedades químicas intermedias. En otras palabras, la estructura química conlleva unos mecanismos de acción concretos y, por tanto, efectos característicos según sean coplanares o no. Por ejemplo, la exposición a orto no coplanares suele relacionarse con neurotoxicidad, antiestrogenicidad etc. (Plíškova *et al.*, 2005).

Se ha detectado que los congéneres con bajos niveles de cloración se unen a los receptores androgénicos (Ah) desencadenando los efectos asociados a ello. Sin embargo, a mayor grado de cloración en posición orto, mayor dificultad de mantener la posición coplanaria, modificándose al mismo tiempo el mecanismo de acción. En el grupo de los orto sustituidos y solo algún mono-orto sustituido (PCB# 105 y PCB# 118) muestran cierta afinidad por el receptor Ah, los cuales presentan una toxicidad similar a las moléculas de dioxina (Faroon *et al.*, 2003).

En cuanto a la *planaridad* de los mismos, los coplanarios no orto sustituidos activan el receptor arilo hidrocarbano (AhR), mecanismo a través del cual desempeñan la mayoría de sus efectos tóxicos (Van Den Berg *et al.*, 1998). Además de estas premisas, el tipo de ensayo empleado y las condiciones del mismo podrían jugar un papel importante en los resultados. Un claro ejemplo de ello son los resultados aportados por Radice *et al.* (2008), quienes hallaron que los PCB# 118 y PCB# 153 inducen proliferación celular en cultivo MCF-7 (entre otros no incluidos en esta investigación), frente a lo sugerido por (Zhang *et al.*, 2014), quienes detectaron que el PCB# 118 y PCB# 180 se comportaban como antiestrogénicos por ser antagonistas frente a ER α , mientras que obtuvieron actividades estrogénicas para el PCB# 128. Curiosamente, y aunque pueda parecer contradictorias las informaciones de Radice *et al.* (2008) y de Zhang *et al.* (2014) nuestros datos apoyan ambas posturas. El PCB#

118 se comportó como parcialmente y fuertemente estrogénicos (tal y como apunta el equipo de Radice), sin provocar alteración de la proliferación celular a $1,0E^{-10}M$, y presentando niveles por debajo del CN al mismo tiempo ($1,0E^{-5}M$ y $1,0E^{-11}M$), lo que podría ir en la línea de lo establecido por Zhang *et al.* (2014). Del mismo modo, el PCB# 153 originó proliferación elevada en todas las concentraciones evaluadas, al igual que postula Radice *et al.* (2008). Por tanto, parece oportuno hacer hincapié en la necesidad de conocer el comportamiento de las sustancias en más de una concentración, aportando no sólo el efecto máximo (generalmente, el más proliferativo), sino también el comportamiento en su conjunto. De esta manera se facilitaría la comparación de información de diferentes estudios.

Muchos de los efectos de los PCB se achacan a sus metabolitos hidroxilados, capaces de unirse a la proteína transportadora de la hormona tiroidea, interfiriendo, por tanto, en la función de la glándula tiroidea. Algunos de ellos son capaces de interactuar con el ER α . Otra particularidad de este tipo de moléculas es que, en líneas generales, las sustituciones de los grupos funcionales en posición *para* poseen mayor capacidad estrogénica (Van den Berg *et al.*, 2003), característica que comparten los cuatro bifenilos policlorados evaluados en este trabajo. Todos ellos demostraron un incremento de la proliferación celular, aunque en el caso del PCB# 126 no fue suficiente como para ser estadísticamente significativa respecto al control negativo.

Por otro lado, se ha indicado que los efectos para ciertos PCB estarían originados por fenómenos de estrés oxidativo, y no por interferencias con el sistema hormonal. Se ha documentado que la capacidad de inducir ROS por parte de compuestos como el PCB# 126 y PCB# 153 está directamente relacionada con estrés oxidativo celular y muerte celular de T47D y MDAMB231 (Lin y Lin, 2006). Estos hallazgos han propiciado que, autores como Aubé *et al.* (2011), sugieran que el descenso en la proliferación celular tras la exposición a altas concentraciones de dichos PCB en sus estudios, son debidos a fenómenos de estrés oxidativo. Este mecanismo de acción podría explicar el comportamiento observado en nuestros análisis para el PCB# 126, puesto que, en cinco de las siete molaridades evaluadas, el efecto proliferativo relativo observado resultó menor al CN, fenómeno que podría explicarse por procesos de estrés oxidativo. En cambio, no detectamos este efecto en el caso del PCB# 153.

De los PCB coplanarios, los doce considerados más tóxicos son el PCB# 77, PCB# 81, PCB# 126, PCB# 169, PCB# 105, PCB# 114, PCB# 118, PCB# 123 PCB# 156, PCB# 157, PCB# 167 y el PCB# 189 (<http://www.inchem.org>). De los cuatro compuestos analizados por nosotros, dos de ellos se encuentran en el listado (PCB# 118 y PCB# 126). De éstos, el que dio lugar al mayor Efecto Proliferativo Relativo (RPE) fue el PCB#118, con un 106,15% de RPE, aunque el PCB# 153 presentó valores muy próximos a éste). El que produjo un mayor descenso celular (muy por debajo del control negativo), fue el PCB# 126.

3. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS DE LOS ORGANOCLORADOS

Al realizar un análisis global de los resultados proliferativos de los dieciocho compuestos, hemos comprobado que los datos coinciden con los estudios realizados por Lemaire *et al.* (2006). Estos autores estudiaron la afinidad específica sobre ambos isotipos de receptor estrogénico y el Efecto Proliferativo Relativo (RPE) de 49 sustancias *in vitro*. Atendiendo únicamente a los compuestos coincidentes con los de esta tesis, al ordenar aquellos que mostraron actividad sobre ER α de mayor a menor respuesta en el estudio de Lemaire y colaboradores, obtuvieron el siguiente listado: *o,p'*-DDT > mezcla de DDT (18% *o,p'*- DDT+ 75% *p,p'*-DDT) > endosulfán > dieldrín > endrín. Por su parte, los únicos que mostraron actividad sobre el ER β resultaron ser el *o,p'*-DDT y la mezcla de DDT. Además de los mencionados OC, evaluaron el lindano y el heptacloro, pero no mostraron efecto alguno. Estos resultados referentes a la actividad ejercida sobre el ER α (vinculada a la proliferación celular) coinciden con nuestros análisis, puesto que, tanto dichos ciclodiénicos como el DDT, se comportaron como fuertemente estrogénicos en nuestros ensayos. E incluso, al ordenar decrecientemente los compuestos de nuestro trabajo en función del RPE máximo observado, nuestros resultados coinciden con el gradiente de actividad sobre el ER α publicado por los citados autores. Para facilitar la relación de los datos mentados, recordamos los valores obtenidos en esta tesis: *p,p'*-DDT 169,8% > endosulfán $\alpha\beta$ 148,79% > dieldrín 132,864% > endrín 106,8%), reflejados en la Figura 48 y en la Tabla 22.

Centrándonos en el dieldrín, endosulfán y lindano, los autores Scippo *et al.* (2004) y Sumbayev *et al.* (2005) propusieron una mayor afinidad por parte del dieldrín frente al ER α respecto al endosulfán y lindano, así como mayor afinidad por ER α que por ER β (Gale *et al.*, 2004). Comparando esta información con la intensidad proliferativa obtenida por nosotros,

se aprecia que los datos son coherentes ya que, si bien el endosulfán $\alpha\beta$ resultó ser ligeramente más proliferativo que el dieldrín, ambos fueron notoriamente más estrogénicos que el lindano (Figura 48).

Aunar en una sola tabla los datos obtenidos más destacados ofrece una visión global de los resultados del estudio. Por ello, en la Tabla 22 se reflejan los valores del máximo Efecto Proliferativo Relativo observado (RPE máx) y la concentración (M) a la que se observó dicha proliferación. Se aprecia que, en no pocas ocasiones, la máxima proliferación se registra en las concentraciones medias analizadas. Esta observación coincide con datos recogidos en el documento de Diamanti-Kandarakis (2009), donde se indica que las sustancias hormonalmente activas suelen ejercer su máximo efecto a dosis intermedias, citando a PCB y ciertos pesticidas organoclorados.

Tabla 22. Valores de Efecto Proliferativo Relativo (RPE) máximo, Efecto Proliferativo y concentración efectiva molar de cada organoclorado.

	Compuesto	RPE (%) máx.	Máx. Concentración efectiva (Molar)
Difenil alifáticos	<i>p,p'</i> -DDT	169,72	1,0E ⁻⁹
	<i>p,p'</i> -DDD	103,77	1,0E ⁻⁹
	Dicofol	93,23	1,0E ⁻¹⁰
	<i>p,p'</i> -DDE	78,18	1,0E ⁻⁶
Ciclodiénicos	Aldrín	175,49	1,0E ⁻⁹
	Endosulfán $\alpha\beta$	148,80	1,0E ⁻⁹
	Dieldrín	132,86	1,0E ⁻⁹
	Endrín	106,80	1,0E ⁻⁸
	*Endosulfán sulfato	106,65	1,0E ⁻⁹
	* Endrín aldehído	91,52	1,0E ⁻⁸
	Heptacloro	84,73	1,0E ⁻⁸
	Heptacloro epóxido	73,93	1,0E ⁻⁸
HCH	Lindano técnico	96,66	1,0E ⁻⁹
	γ HCH o Lindano	42,49	1,0E ⁻¹⁰
PCB	* PCB 118	112,48	1,0E ⁻⁹
	PCB 153	98,89	1,0E ⁻¹⁰
	* PCB 180	86,88	1,0E ⁻⁸
	* PCB 126	37,22	1,0E ⁻⁹

Sustancias con un rango amplio de efecto, pudiendo presentar valores negativos.

No resulta sencillo establecer una generalización más allá de la similitud detectada con Diamanti-Kandarakis (2009) respecto al predominio de los efectos en concentraciones próximas a 1 pM. Hemos comprobado que en muchas ocasiones las investigaciones evalúan unas pocas concentraciones, las cuales no siempre coinciden entre los distintos autores (como se refleja en cada caso más adelante), dificultando la comparación de resultados entre estudios.

Del mismo modo, es interesante apreciar el carácter estrogénico de cada grupo químico estudiado, basado en el máximo efecto proliferativo (información recogida en la Tabla 21). Si bien, hay que tener en cuenta que para un mismo compuesto este carácter puede variar en función de la concentración testada. Estas variaciones no se dan en todos los productos, ni con la misma intensidad. En la Tabla 23 se recogen los productos que dieron lugar a un efecto proliferativo notoriamente diferente en función de la concentración analizada. Se indica el Efecto proliferativo relativo (RPE) máximo y la concentración responsable de dicho efecto tanto para el máximo efecto observado como para el efecto relativo más bajo detectado. Se aprecia que en aquellos casos en los que aparecieron valores negativos, éstos se registraron en las concentraciones más extremas. Es decir, tanto en las más diluidas como en las más concentradas, acotando el rango de proliferación positiva a partir de dichas molaridades.

Tabla 23. Compuestos con efecto contrapuesto en función de la concentración evaluada y concentración a la que aparecieron

Compuesto	(%) RPE máximo	Máxima concentración efectiva (Molar)	Mínimo Efecto Proliferativo (%)	Mínima concentración efectiva (Molar)
Endosulfán sulfato	106,65	1,0E ⁻⁹	-64,13	1,0E ⁻⁵
Endrín aldehído	91,52	1,0E ⁻⁸	-255,72	1,0E ⁻⁵
PCB 118	112,48	1,0E ⁻⁹	-36,71	1,0E ⁻¹¹
PCB 180	86,88	1,0E ⁻⁸	-30,63	1,0E ⁻⁵
PCB 126	37,23	1,0E ⁻⁹	-111,25	1,0E ⁻⁵

Por norma general, hemos detectado que los estudios referentes a efectos proliferativos, en muchas ocasiones se ciñen a destacar el máximo efecto detectado, o al menos, no es frecuente que se resalten los efectos menos notorios. Esta tendencia podría deberse a que parte de la comunidad científica considere como más probable, la aparición de un efecto perjudicial a partir de los mayores efectos detectados y, por tanto, puede parecer que ésta información sea la más relevante. Sin embargo, a raíz de nuestras observaciones consideramos que también deberían tenerse en cuenta aquellas respuestas que den lugar a una proliferación menor a la normal proliferación para la línea celular estudiada. Cuestiones a parte son el origen de dicho resultado, ninguno de ellos objeto de esta tesis, ya que podrían estar implicados fenómenos de citotoxicidad, inhibición de la mitosis, fenómenos de estrés oxidativo, entre otros. Sea como fuere, consideramos oportuno poner de manifiesto estos resultados.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE IV. EFECTO PROLIFERATIVO INDUCIDO

POR MEZCLAS DE COMPUESTOS

ORGANOCORADOS

1.INTRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CONTENIDO

En este bloque se plasman los resultados obtenidos tras la exposición del cultivo celular MCF-7 a ocho mezclas de organoclorados, agrupados en función del número de compuestos que las integran. Para cada grupo de mezclas (binarias, ternarias, cuaternaria y senaria) se dividen los resultados en dos apartados consecutivos:

- a) Resultados de las diferencias estadísticamente significativas obtenidos en los análisis pertinentes, destacando las diferencias de cada dilución frente al control negativo (CN) y posteriormente, frente al control positivo (CP).
- b) Resultados tras la aplicación del concepto del efecto proliferativo relativo (RPE) (Soto *et al.*, 1994). En función de la intensidad proliferativa del efecto observado, las mezclas se han clasificado siguiendo la división establecida por Andersen *et al.* (1999) (débil, parcial y fuertemente estrogénicas, según posean un RPE inferior al 25%, entre el 25% y el 75% o superior al 75%).

Por último, se refleja el análisis de la información estrogénica de las mezclas analizando los resultados en base a los datos obtenidos por sus integrantes, lo cual permite un abordaje en profundidad de las mezclas y obtener una visión global tanto de las mezclas, como de sus componentes.

Antes de entrar en materia de apartado es conveniente recordar la composición de las mezclas. En la Tabla 24 se indican los componentes, el grupo químico al que pertenece cada uno de ellos, el porcentaje de participación de cada sustancia en la mezcla, la molaridad final de cada concentración de la serie evaluada (para cada mezcla se prepararon 7 concentraciones seriadas). Asimismo, se indica la concentración a la que se encuentra cada componente en cada dilución seriada.

Tabla 24 Diseño de las mezclas sometidas al *E-Screen*

Mezcla	Compuestos y su % de participación en la mezcla	Rango de concentraciones (M)	Molaridad de cada OC en diluciones seriadas (M)
MEZCLAS BINARIAS			
MB d/d/	<i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE (50:50)	1,7E ⁻⁷ a 1,7E ⁻¹³	8,5E ⁻⁸ a 8,5E ⁻¹⁴ cada uno
MB c/d/ 1	Endosulfán αβ + <i>p,p'</i> -DDE (75:25)	1,0E ⁻⁶ a 1,0E ⁻¹²	Endosulfán αβ: 7,5E ⁻⁷ a 7,5E ⁻¹³ ; <i>p,p'</i> -DDE: 2,5E ⁻⁷ a 2,5E ⁻¹³
MB c/d/ 2	Endosulfán αβ + <i>p,p'</i> -DDT (75:25)	1,0E ⁻⁶ a 1,0E ⁻¹²	Endosulfán αβ: 7,5E ⁻⁷ a 7,5E ⁻¹³ ; <i>p,p'</i> -DDT: 2,5E ⁻⁷ a 2,5E ⁻¹³
MB h/c/	Lindano técnico + endosulfán αβ (50:50)	1,0E ⁻⁷ a 1,0E ⁻¹³	5,0E ⁻⁸ a 5,0E ⁻¹⁴ cada uno
MEZCLAS TERNARIAS			
MT c/d/d/	Endosulfán αβ + <i>p,p'</i> -DDT + <i>p,p'</i> -DDE (75:12,5:12,5)	3,0E ⁻⁷ a 3,0E ⁻¹³	1,0E ⁻⁷ a 1,0 E ⁻¹³ cada uno
MB h/d/d/	Lindano técnico + <i>p,p'</i> - DDT+ <i>p,p'</i> -DDE (75:12,5:12,5)	1,0E ⁻⁶ a 1,0E ⁻¹²	Lindano tec.:7,5E ⁻⁶ a 7,5E ⁻¹² ; <i>p,p'</i> -DDT y <i>p,p'</i> -DDE: 1,25E ⁻⁶ a 1,25E ⁻¹²
MEZCLA CUATERNARIA			
MB c/c/d/d/	Aldrín+ dieldrín + <i>p,p'</i> - DDT + <i>p,p'</i> -DDE (25:25:25:25)	1,0E ⁻⁶ a 1,0E ⁻¹²	2,5E ⁻⁶ a 2,5E ⁻¹²
MEZCLA SENARIA			
MS c/c/c/d/d/h/	Endosulfán αβ + aldrín + dieldrín+ <i>p,p'</i> -DDT+ <i>p,p'</i> - DDE +lindano téc. (50:12,5:12,5:6,25:6,25:1 2,5)	6,0E ⁻⁷ a 6,0E ⁻¹³	1,0E ⁻⁷ a 1,0E ⁻¹³

*Grupo Químico: c= ciclodiénicos, h= hexaclorociclohexanos, d= difenilalifáticos.

A continuación, se exponen los resultados de las mezclas agrupadas en función del número de organoclorados que las componen.

2. EFECTO DE LAS MEZCLAS BINARIAS

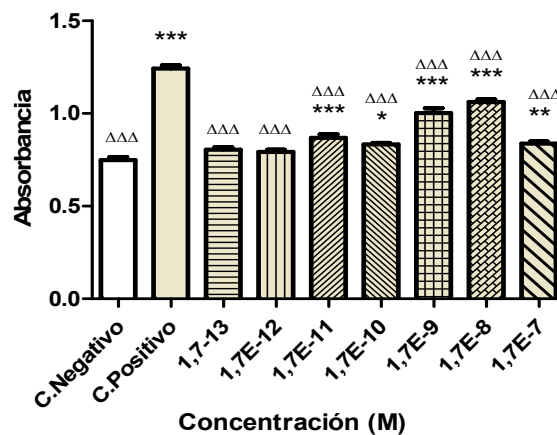
2.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se diseñaron cuatro mezclas binarias combinando cuatro productos, pertenecientes a tres grupos químicos: difenilifáticos (*p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE), un ciclodiénico (endosulfán $\alpha\beta$) y un hexaclorociclohexano (lindano técnico).

- MEZCLA BINARIA MB D/D/: *p,p'*-DDT+*p,p'*-DDE (50:50)

En la Figura 51 se comprueba que la exposición a cinco de las siete concentraciones, desde $1,7E^{-11}M$ hasta $1,7E^{-7}M$ incluido, derivó en una respuesta proliferativa significativamente mayor que la presentada por el CN. Por el contrario, las dos molaridades más bajas, $1,7E^{-13}M$ y $1,7E^{-12}M$, no se diferenciaron de dicho control. No obstante, en ningún caso se alcanzaron valores del CP, siendo $1,7E^{-8}M$ la concentración que mayor proliferación, de media, indujo para esta combinación.

Figura 51. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB d/d/ # (*p,p'*-DDT+*p,p'*-DDE; 50:50)



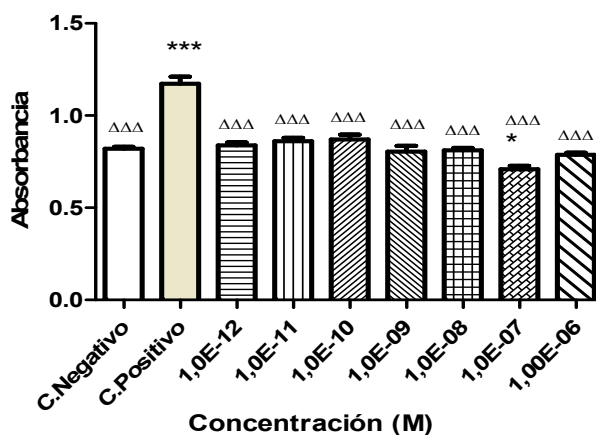
* Respecto al control negativo: ***= $p<0,001$; **= $p<0,01$; *= $p<0,05$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p<0,001$

- MEZCLA BINARIA MB C/D 1: ENDOSULFÁN AB+ P,P'-DDE (75:25).

Los resultados de esta combinación, reflejados en Figura 52, indican que tan sólo la exposición a $1,0E^{-7}M$ mostró diferencias respecto al CN, originadas por una menor proliferación del cultivo celular. Por tanto, ninguna dilución dio lugar a una respuesta similar al CP, difiriendo todas significativamente de dicho control.

Figura 52. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB c/d/1# (# endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDE; 75:25)



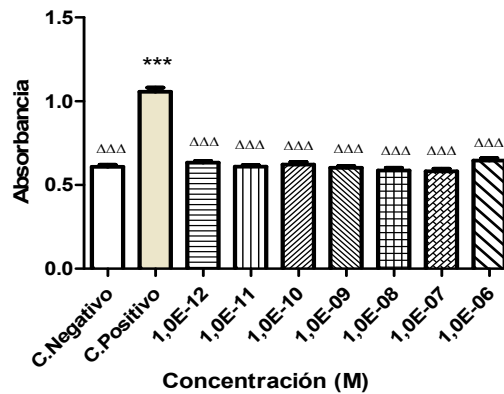
* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$

Δ Respecto al control positivo.: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- MEZCLA BINARIA MB C/D2/: ENDOSULFÁN $\alpha\beta$ + p,p'- DDT (75:25)

La respuesta a la exposición de la mezcla MB c/d/2/, representada en la Figura 53 no alteró la normal proliferación celular del cultivo MCF-7. En otras palabras, no se detectaron diferencias significativas respecto al CN en ningún caso. Del mismo modo, tampoco aparecieron diferencias en el efecto entre las siete diluciones ensayadas. Consecuentemente, todas las concentraciones evaluadas mostraron diferencias frente al CP.

Figura 53. Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB c/d/2 # (# endosulfán $\alpha\beta$ + *p,p'*- DDT; 75:25)



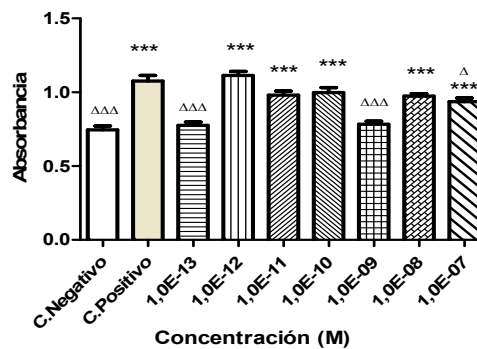
* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Δ Respecto al control positivo.: Δ Δ Δ = $p < 0,001$

- MEZCLA BINARIA MB H/C: LINDANO TÉCNICO+ ENDOSULFÁN $\alpha\beta$ (50:50).

En la Figura 54 se observa que dos molaridades ($1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-13}M$) no difirieron del CN. Las restantes concentraciones, sí mostraron diferencias significativas debidas a una mayor proliferación celular. Al cotejar la intensidad en la respuesta respecto al CP, se observó que cuatro de ellas (desde $1,0E^{-12}M$ hasta $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-8}M$) se equipararon en intensidad a dicho control.

Figura 54 . Niveles de absorbancia de la mezcla binaria MB h/c/# (# Lindano técnico + endosulfán $\alpha\beta$; 50:50).



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ = $p < 0,05$

2.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS MEZCLAS BINARIAS

Atendiendo a la clasificación de Andersen *et al.* (1999), únicamente la mezcla binaria de lindano técnico y endosulfán $\alpha\beta$ (MB h/c/#), produjo una elevada proliferación sobre el cultivo MCF-7, comportándose como una mezcla fuertemente estrogénica, con un RPE máximo de 112,07% (Tabla 25). La mezcla binaria de difenilalifáticos MB d/d/ resultó ser parcialmente estrogénica (RPE máximo de 63,57%) y las otras dos combinaciones binarias, compuestas por endosulfán y un difenilalifático, apenas mostraron actividad proliferativa (MB c/d/1/ y MB c/d/2/) al no sobrepasar en ningún caso el 15% de proliferación, apareciendo incluso en algún caso, valores negativos.

Tabla 25. Mezclas binarias: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración analizada.

Concentración (M)	MB d/d/	Concentración (M)	MB c/d/1/	MB c/d/2/	MB h/c/
$1,70E^{-13}$	11,36 ± 9,33 11,12	$1,0E^{-13}$			8,97 ± 26,91 -0,92
$1,70E^{-12}$	8,66 ± 10,00 10,61	$1,0E^{-12}$	4,81 ± 18,09 10,32	5,71 ± 7,04 6,22	112,07 ± 30,78 121,72
$1,70E^{-11}$	24,28 ± 14,63 22,06	$1,0E^{-11}$	11,22 ± 19,64 13,86	0,36 ± 8,02 -1,45	71,19 ± 22,50 69,74
$1,70E^{-10}$	17,06 ± 6,05 18,72	$1,0E^{-10}$	14,19 ± 29,06 12,87	3,24 ± 12,43 6,33	76,76 ± 32,61 82,05
$1,70E^{-9}$	51,24 ± 21,07 53,09	$1,0E^{-9}$	-4,52 ± 32,28 13,15	-1,07 ± 8,50 -1,45	11,36 ± 24,87 11,39
$1,70E^{-8}$	63,57 ± 10,87 64,17	$1,0E^{-8}$	-2,46 ± 10,37 -8,66	-4,65 ± 13,30 -8,79	69,44 ± 16,73 71,57
$1,70E^{-7}$	17,83 ± 9,46 16,69	$1,0E^{-7}$	-31,46 ± 18,32 -25,38	-5,65 ± 12,32 -6,34	57,78 ± 28,86 65,94
		$1,0E^{-6}M$	-9,54 ± 9,92 -10,08	8,57 ± 11,60 7,45	

Valor presentado como media del RPE en porcentaje \pm desviación estándar y mediana.

MB d/d/=p,p'-DDT +p,p'-DDE (50:50); MB c/d/1/= Endosulfán $\alpha\beta$ +p,p'-DDE (75:25); MB c/d/2/
=Endosulfán $\alpha\beta$ +p,p'-DDT (75:25); MB h/c/ = Lindano técnico+ Endosulfán $\alpha\beta$ (50:50).

3. MEZCLAS TERNARIAS

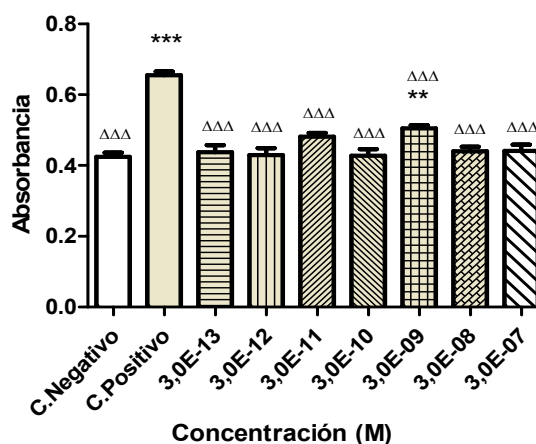
3.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se diseñaron dos mezclas ternarias compuestas por la combinación de dos difenilalifáticos (p,p'-DDT y p,p'- DDE), el ciclodiénico endosulfán $\alpha\beta$, y el hexaclorociclohexano lindano técnico.

- MEZCLA TERNARIA MT C/D/D/#: ENDOSULFÁN AB +P,P'-DDT +P,P'-DDE (75:12,5:12,5)

La Figura 55 refleja que la exposición a $3,0E^{-9}M$ dio lugar a una proliferación mayor estadísticamente significativa que el CN. Dicha molaridad resultó ser, además, la más efectiva en proliferación celular, seguida de la $3,0E^{-11}M$. Por el contrario, la proliferación detectada en el resto de concentraciones no difirió del CN. En cuanto a la comparación respecto al CP, en ningún caso se alcanzó la tasa de proliferación celular similar, presentándose diferencias significativas con todas las diluciones analizadas.

Figura 55 . Niveles de absorbancia de la mezcla ternaria MT c/d/d/ # (# endosulfán $\alpha\beta$ +p,p'-DDT +p,p'-DDE; 75:12,5:12,5).



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$

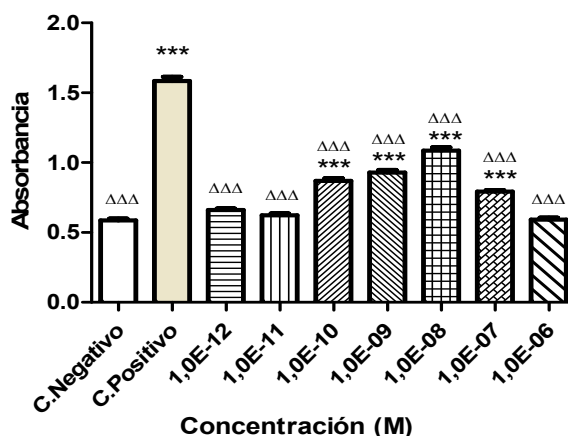
Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

- MEZCLA TERNARIA MT H/D/D/#: LINDANO TÉCNICO +P,P'-DDT+P,P'-DDE (75:12,5:12,5)

La información obtenida de la exposición a la mezcla ternaria de lindano, *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE (MT h/d/d/#) se refleja en la Figura 56. Cuatro de las siete diluciones fueron significativamente más proliferativas que el CN, concretamente desde $1,0E^{-7}M$ hasta $1,0E^{-10}M$. Por el contrario, las dos más diluidas y la más concentrada no difirieron significativamente del CN ($1,0E^{-12}M$, $1,0E^{-11}M$ y $1,0E^{-6}M$).

De las molaridades que originaron efecto proliferativo, $1,0E^{-8}M$ fue la más efectiva, aunque de menor magnitud que el efecto observado por el CP, mostrando diferencias estadísticas frente al estradiol.

Figura 56. Niveles de absorbancia de la mezcla ternaria MT h/d/d/# (# lindano técnico +*p,p'*-DDT+ *p,p'*-DDE; 75:12,5:12,5).



*Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$

3.2. CATEGORIZACIÓN DE LAS CAPACIDAD PROILFERATIVA DE LAS MEZCLAS TERNARIAS

En la Tabla 26 se plasman los datos del efecto proliferativo relativo (RPE) de las mezclas ternarias y de sus componentes, donde se destaca el valor máximo obtenido en cada mezcla. Como se indicó anteriormente, ambas mezclas ternarias tenían en su composición *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE, siendo el tercer componente en una de ellas el endosulfán $\alpha\beta$ (MT c/d/d/) y en la otra lindano técnico (MT h/d/d/), ambas mezclas con las proporciones 75:12,5:12,5.

Tabla 26. Mezclas ternarias: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración.

Molaridad (M)	MT c/d/d/#	MT h/d/d/#
3,0E ⁻¹³	5,86 ± 29,08 -4,45	
1,0E ⁻¹²		6,28 ± 2,92 6,03
3,0E ⁻¹²	2,47 ± 27,07 0,90	
1,0E ⁻¹¹		3,09 ± 6,26 25,72
3,0E ⁻¹¹	24,79 ± 19,93 30,60	
1,0E ⁻¹⁰		24,08 ± 8,19 42,55
3,0E ⁻¹⁰	1,61 ± 26,76 -12,05	
1,0E ⁻⁹		29,13 ± 4,37 -0,43
3,0E ⁻⁹	6,88 ± 17,00 32,25	
1,0E ⁻⁸		42,50 ± 4,47 2,58
3,0E ⁻⁸	6,88 ± 19,29 13,77	
1,0E ⁻⁷		17,49 ± 5,52 30,14
3,0E ⁻⁷	7,39 ± 29,67 0,54	
1,0E ⁻⁶		0,58 ± 2,86 16,06

Valor presentado como media del RPE en porcentaje ± desviación estándar y mediana.

MT c/d/d/: endosulfán αβ +p,p'-DDT +p,p'-DDE (75: 12,5: 12,5) MT h/d/d/: Lindano técnico +p,p'-DDT +p,p'-DDE (75:12,5:12,5).

Por tanto, para la mezcla que contenía endosulfán (MT c/d/d/), el máximo efecto proliferativo se alcanzó a 3,0E⁻¹¹M, con un RPE de 24,79%, encontrándose en el límite entre débil y parcialmente estrogénico. Debido a que el límite de la siguiente categoría (parcialmente estrogénico) está establecido en 25%, a esta mezcla se le asignó carácter

parcialmente estrogénico atendiendo al principio de precaución y asumir el efecto más indeseable posible. En ningún caso aparecieron valores negativos en esta combinación, en la que predominó la presencia del ciclodiénico endosulfán $\alpha\beta$, frente a los difenilalifáticos, p,p' -DDT y p,p' -DDE.

En cambio, para la mezcla ternaria que contenía lindano técnico, la molaridad más efectiva resultó ser $1,0E^{-8}M$. El efecto proliferativo relativo obtenido fue del 42,50%, catalogándose como parcialmente estrogénica. No obstante, en cinco de las siete disoluciones evaluadas, el efecto obtenido fue considerado como débilmente estrogénico.

4. MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA.

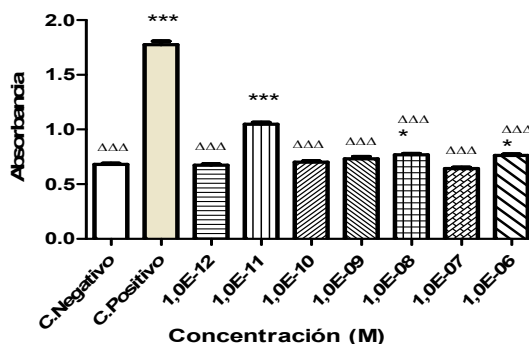
4.1. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

- MEZCLA CUATERNARIA. MC C/C/D/D/: ALDRÍN + DIELDRÍN + p, p' -DDT + p, p' -DDE (25:25:25:25)

La mezcla cuaternaria MC c/c/d/d/ se constituyó a partir de dos ciclodiénicos y dos difenilalifáticos en proporciones iguales: aldrín, dieldrín, p,p' -DDT y p,p' -DDE (Tabla 24).

La Figura 57 reveló que las concentraciones $1,0E^{-11}M$, $1,0E^{-8}M$ y $1,0E^{-6}M$ dieron lugar a respuesta proliferativa estadísticamente mayor que el CN. Sin embargo, ninguna alcanzó el efecto obtenido por el CP, por lo que las siete concentraciones mostraron diferencias significativas frente a dicho control. Como se observa en la Figura 57, la molaridad $1,0E^{-11}M$ originó el máximo efecto observado.

Figura 57 .Niveles de absorbancia de la mezcla cuaternaria MC c/c/d/d/ # (# aldrín+ dieldrín + p, p' -DDT + p, p' -DDE; 25:25:25:25).



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$
 $\Delta \Delta \Delta$ Respecto al control positivo: $\Delta \Delta \Delta = p < 0,001$

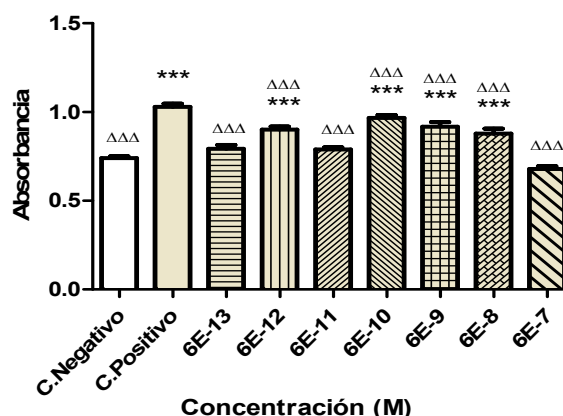
- MEZCLA SENARIA, MS C/C/C/D/D/H/: ENDOSULFAN $\alpha\beta$ + ALDRIN + DIELDRÍN + p.p'-DDT+ p.p'-DDE + LINDANO TÉCNICO (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5)

Esta combinación se compuso a partir de 6 compuestos organoclorados. El 50% del total correspondió al endosulfán $\alpha\beta$; el 25% correspondió a dos drines en igual proporción (aldrín y dieldrín); el 12,5% correspondió a dos difenilalifáticos (p,p'-DDT y p,p'-DDE) en igual proporción; y el 12,5% restante, constituido por lindano técnico. El rango de concentraciones de la mezcla evaluada abarcó desde $6,0E^{-7}M$ hasta $6,0E^{-13}M$. En esta horquilla de concentraciones, cada OC se encontraba en el rango de molaridades de $1,0E^{-7}M$ hasta $1,0E^{-13}M$ respectivamente.

La información plasmada en la Figura 58 indica que, de las siete concentraciones de la mezcla senaria, la respuesta frente a $6,0E^{-13}M$, $6,0E^{-11}M$ y $6,0E^{-7}M$ no presentó diferencias significativas respecto al CN. Las restantes disoluciones sí mostraron diferencias originadas por una mayor proliferación ($6,0E^{-12}M$, $6,0E^{-10}M$ hasta $6,0E^{-8}M$ inclusive).

De la comparación frente al CP se observó que, excepto la dilución $6,0E^{-10}M$, todas dieron lugar a una respuesta estadísticamente inferior al control positivo. La concentración indicada ocasionó, por tanto, el mayor efecto observado para esta combinación.

Figura 58. Niveles de absorbancia de la mezcla senaria MS c/c/c/d/d/h/ # (#Endosulfan $\alpha\beta$ + Aldrin + Dieldrín + p,p'-DDT+ p,p'-DDE + Lindano técnico; 50:12,5:12,5:6,25:6,25;12,5).



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$; Δ Δ = $p < 0,01$; Δ = $p < 0,05$

4.2. CATEGORIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LA MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA

En la Tabla 27 se recogen los valores del efecto proliferativo relativo (RPE) de las combinaciones formadas por cuatro y seis compuestos.

Tabla 27. Mezclas cuaternaria y senaria: Valores del Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) de cada concentración.

Concentración (M)	MS c/c/c/d/d/h/	Concentración (M)	MC c/c/d/d/
$6,0E^{-13}$	18,19 ± 29,36 14,23	$1,0E^{-12}$	-0,71 ± 3,97 -1,00
$6,0E^{-12}$	55,46 ± 23,48 49,73	$1,0E^{-11}$	33,51 ± 6,86 32,69
$6,0E^{-11}$	16,94 ± 15,98 17,78	$1,0E^{-10}$	1,72 ± 5,06 2,06
$6,0E^{-10}$	78,22 ± 21,79 78,12	$1,0E^{-9}$	4,63 ± 9,83 3,76
$6,0E^{-9}$	60,98 ± 36,02 58,26	$1,0E^{-8}$	8,02 ± 5,65 9,19
$6,0E^{-8}$	47,89 ± 38,60 39,69	$1,0E^{-7}$	-3,62 ± 5,24 -3,19
$6,0E^{-7}$	-20,95 ± 16,88 -17,41	$1,0E^{-6}$	7,42 ± 6,03 6,59

Valor presentado como media del RPE en porcentaje ± desviación estándar y mediana.

MS c/c/c/d/d/h/=Endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE + lindano técnico

(50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5); MC c/c/d/d/= aldrín + dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE (25:25:25:25)

Para la combinación cuaternaria, de las siete diluciones seriadas, la molaridad $1,0E^{-11}M$ resultó ser la más proliferativa, provocando un efecto máximo igual a 33,51%. Según la clasificación establecida por Andersen *et al.* (1999), se cataloga como una mezcla parcialmente estrogénica, situándose en el rango inferior de la horquilla establecida. El resto de diluciones ensayadas dieron lugar a proliferaciones menores al 10%, e incluso rondando valores negativos.

Sin embargo, la mezcla senaria desencadenó una respuesta amplia, abarcando desde valores proliferativos catalogados como débiles (e incluso valores negativos a $6,0E^{-7}M$) hasta el mayor efecto observado a $6,0E^{-10}M$, con un RPE máximo del 78,22%, clasificándose como

fuertemente estrogénica. De todas las mezclas analizadas, ésta fue la segunda en intensidad de respuesta proliferativa.

5. ESTROGENICIDAD DE LAS MEZCLAS FRENTE A SUS COMPONENTES

En este bloque se profundiza en el análisis de los resultados de los efectos proliferativos. Para ello, se ha destacado la información relevante sobre cada grupo de mezclas haciendo especial hincapié en la molaridad de cada componente a la concentración que indujo la máxima proliferación de cada una de ellas. Este dato se ha cruzado con la proliferación observada tras la exposición de cada organoclorado de forma individualizada, para valorar una posible variación en la intensidad del efecto.

5.1. MEZCLAS BINARIAS

Antes de analizar cada concentración binaria es necesario recopilar algunos de los resultados obtenidos más relevantes. En la Tabla 28 se recoge la siguiente información: a) el máximo efecto proliferativo relativo (RPE) derivado de la exposición en porcentaje (RPE, máximo) y la molaridad responsable de la misma; b) la concentración que dio lugar a un menor número de células en aquellos casos en los que aparecieron valores negativo (mínimo efecto proliferativo) y el valor en porcentaje de dicho efecto; c) la molaridad que le corresponde a cada uno de los productos presentes en las concentraciones responsables del máximo y del mínimo efecto observado

Tabla 28. Mezclas binarias: Valores y clasificación del efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) máximo) y RPE mínimo, concentración a la que aparecen, molaridad de cada OC en dicha disolución (todo ello en porcentaje) y su grupo químico.

	RPE Máximo			RPE Mínimo efecto		
	RPE (%) y Efecto	Concent. Mezcla (M)	Concent. Compuesto (M)	RPE (%)	Concent mezcla (M)	Concent. Compuesto (M)
MB d/d/	63,57 Parcial	1,7E ⁻⁸	5,0E ⁻⁹ <i>p,p'</i> -DDT 5,0E ⁻⁹ <i>p,p'</i> -DDE			
MB c/d/ 1	14,19 Débil	1,0E ⁻¹⁰	7,5E ⁻¹¹ Endosulfán 2,5E ⁻¹¹ <i>p,p'</i> -DDE	-31,46	1,0E ⁻⁷	7,5E ⁻⁸ 2,5E ⁻⁸
MB	8,57	1,0E ⁻⁶	7,5E ⁻⁷ Endosulfán	-5,65	1,0E ⁻⁷	7,5E ⁻⁸

c/d/ 2	Débil		2,5E ⁻⁷ p,p'-DDT	2,5E ⁻⁸
MB	112,07	1,0E ⁻¹²	5,0E ⁻¹³ Lindano	
h/c /	Fuerte		5,0E ⁻¹³ Endosulfán	

MB d/d/=p,p'-DDT +p,p'-DDE (50:50); MB c/d/1/ Endosulfán αβ +p,p'-DDE (75:25) MB c/d/2/ =Endosulfán αβ + p,p'-DDT (75:25) ; MB h/c/ = Lindano técnico+ Endosulfán αβ (50:50)
 Grupo Químico: c= ciclodiénico, h= hexaclorociclohexanos, d= difenilalifáticos

Como se observa en la Tabla 28 solo se obtienen valores negativos de RPE en las combinaciones cuyo RPE máximo permitiría tan solo clasificarlas como débilmente estrogénicas, concretamente las mezclas binarias de endosulfán y difenilalifáticos.

A continuación, se discuten los resultados de cada combinación, prestando especial atención a los datos obtenidos para cada OC evaluados por individualizado.

- MEZCLA BINARIA MB D/D: P,P'-DDT +P,P'-DDE (50:50)

Para la combinación de difenilalifáticos (p,p'-DDT y p,p'-DDE), la concentración más proliferativa fue 1,7E-8M, mostrando un RPE de 63,57% (Tabla 29). A dicha concentración, cada OC se hallaba a una molaridad de 8,5E-9M. Puesto que no se evaluó esa misma concentración de forma independiente para cada difenilalifático, en la Tabla 29 se plasman los valores analizados más próximos.

Tabla 29. Mezcla binaria MB d/d/ # (# p,p'-DDT+ p,p'-DDE): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

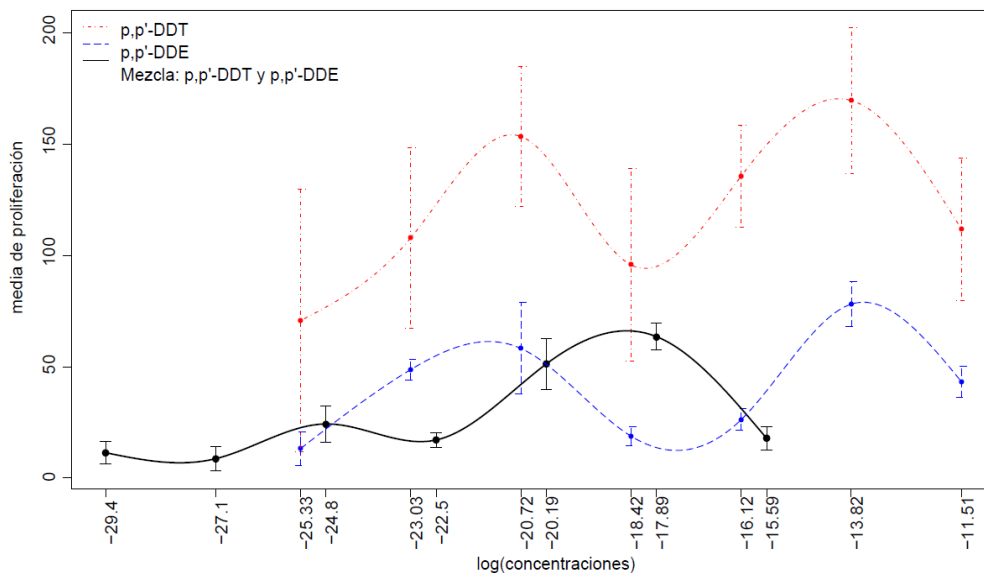
Concentración (M)	RPE (%) p,p'-DDT	RPE (%) p,p'-DDE	RPE (%) Máximo, MB d/d (p,p'-DDT + p,p'-DDE)
*1,0E-9	153,61	58,25	
*1,0E-8	95,82	18,78	
1,7E-8			63,57
Efecto proliferativo	Fuerte	Parcial/débil	Parcial

*Concentración más cercana a la hallada en la disolución más proliferativa de la mezcla para cada componente de la mezcla.

El resultado de la máxima proliferación se produjo por la combinación a partes iguales de *p,p'*-DDT (fuertemente estrogénico) y *p,p'*-DDE (parcialmente estrogénico), observándose un resultado final catalogado como parcialmente estrogénico.

La diferencia en la intensidad proliferativa entre la mezcla y sus integrantes se produce en la mayoría de concentraciones analizadas, por lo que no es exclusivo de la máxima concentración efectiva. Esta tendencia se aprecia claramente al cruzar los datos del efecto de la mezcla con el de sus integrantes en una misma figura (Figura 59).

Figura 59. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) de la mezcla binaria MB d/d/ # (# *p,p'*-DDT+ *p,p'*-DDE) y de sus integrantes, en base logarítmica.



- MB C/D/ 1: ENDOSULFÁN AB +P,P'-DDE (75:25)

En la combinación binaria de endosulfán $\alpha\beta$ y *p,p'*-DDE, el 75% estuvo representado por el ciclodiénico, y el 25% por el difenilalifático *p,p'*-DDE. Como se indicó en la Tabla 24, esta mezcla binaria obtuvo su máximo efecto a $1,0E^{-10}M$, lo que implica que el endosulfán $\alpha\beta$ se encontraba al $7,5E^{-11}M$ y el *p,p'*-DDE a $2,5E^{-11}M$. La respuesta proliferativa derivada en ésta concentración fue del 14,19%.

En la Tabla 30 figuran, para cada una de las concentraciones mencionadas, el efecto proliferativo correspondiente. Puesto que no se analizó exactamente la misma molaridad en

las mezclas, se recuperan los datos de las dos analizadas más próximas de forma individual para cada OC.

Tabla 30. MB c/d/1/: Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

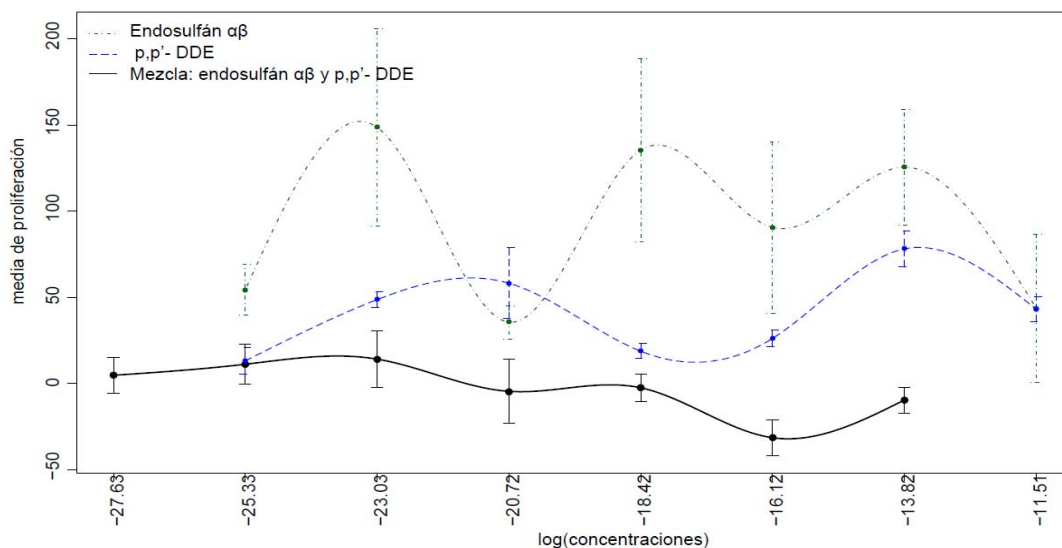
Concentración (M)	RPE (%) Endosulfán $\alpha\beta$	RPE (%) p,p' -DDE	RPE (%) Máximo, MB c/d/1/ (Endosulfan $\alpha\beta$ + p,p' -DDE)
* $1,0E^{-11}$	54,37	13,17	
$7,5E^{-11}$			14,19
* $1,0E^{-10}$	148,80	48,72	
Efecto proliferativo	Parcial/fuerte	Débil/parcial	Débil

**Concentración más cercana a la hallada en la disolución más proliferativa de la mezcla para cada componente de la mezcla.*

El endosulfán $\alpha\beta$, a una concentración de $1,0E^{-11}M$ originó un RPE de 54,37%, es decir, mostró un carácter parcialmente estrogénico. No obstante, la concentración inmediatamente superior derivó en un RPE de 148,80%, fuertemente estrogénico. Por su parte, el p,p' -DDE a $1,0E^{-11}M$ dio lugar a un RPE de 13,17% (débilmente estrogénico) y 48,72% a $1,0E^{-10}M$ (parcialmente estrogénico). Sin embargo, el resultado final de esta combinación resultó ser débilmente estrogénica, con tan sólo un RPE de 14,19% respecto al control positivo.

Al plasmar los datos del efecto proliferativo relativo, tanto de la mezcla como de sus componentes, en base logarítmica, se obtienen las siguientes curvas, donde se aprecia el comportamiento de cada uno de éstos (Figura 60) y la diferencia de efecto entre ellos.

Figura 60 . Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la mezcla binaria MB c/d/1# (# endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDE) y en sus integrantes, en base logarítmica



- MEZCLA BINARIA MB C/D/2/: ENDOSULFÁN $\alpha\beta$ + p,p' -DDT (75:25)

La máxima concentración efectiva se produjo a $1,0E^{-6}M$, con un RPE de 8,57%. En esta concentración de la mezcla, el endosulfán $\alpha\beta$ se encontraba a $7,5E^{-7}M$, y el p,p' -DDT a $2,5E^{-7}M$. El estudio de estos compuestos de forma individual, a las citadas concentraciones, originó los valores recogidos en la Tabla 31.

Tabla 31. MB c/d/2/ # (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada

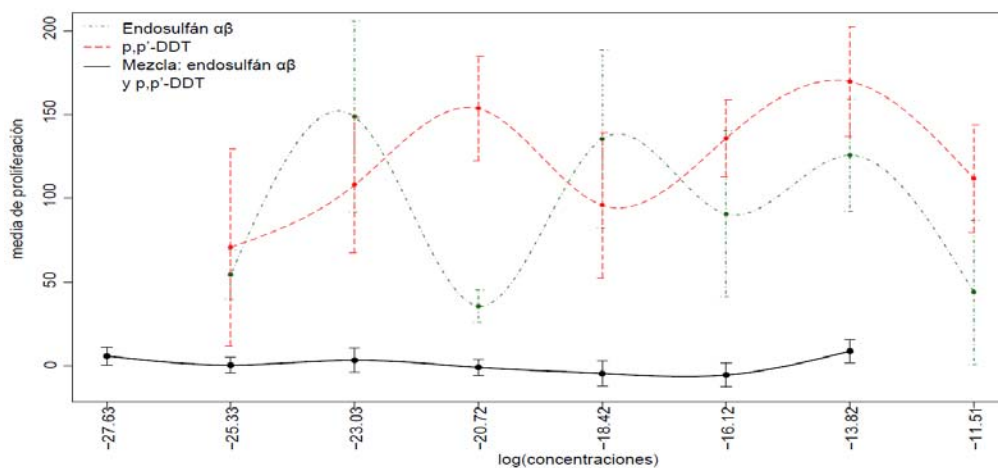
Concentración (M)	RPE (%) Endosulfán $\alpha\beta$	RPE (%) p,p' -DDT	RPE (%) Máximo, MB c/d 2 (Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT)
$1,0E^{-7}$	90,67	135,76	
$1,0E^{-6}$	125,66	169,72	8,57
Efecto proliferativo	Fuerte	Fuerte	Débil

Por tanto, la mezcla constituida a partir de las concentraciones indicadas en la Tabla 31, y teniendo en cuenta que endosulfán constituyó el 75% y el p,p' -DDT el 25%, respectivamente, se produjo una respuesta proliferativa relativa máxima de 8,57%. Consecuentemente, se catalogó como una mezcla débilmente estrogénica. No obstante, las

molaridades analizadas más próximas de forma individualizada, se clasificaron como fuertemente estrogénicas.

En la Figura 61 se han representado conjuntamente las tres respuestas: la MB c/d/2/# (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT) por un lado, y las respuestas de sus dos integrantes obtenida en ensayos previos, lo cual permite comprender mejor la información anteriormente descrita.

Figura 61. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla binaria MB c/d/2/# (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT) y de sus integrantes, en base logarítmica



Se observa claramente el descenso del efecto de la mezcla respecto al detectado por sus integrantes, además de la uniformidad de los resultados, al no apreciarse variaciones notorias del efecto en la mezcla.

- MEZCLA BINARIA MB H/C/: LINDANO TÉCNICO + ENDOSULFÁN AB (50:50)

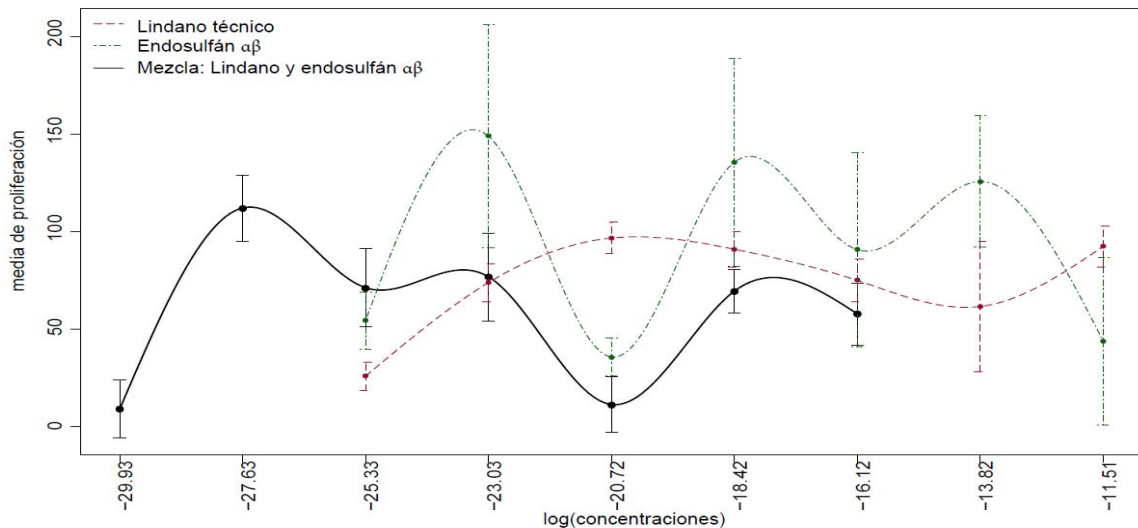
Esta combinación se compuso por un hexaclorociclohexano (HCH) lindano técnico y un ciclodiénico (endosulfán $\alpha\beta$), a partes iguales. En ésta, la concentración que dio lugar al máximo efecto fue $1,0E^{-12}M$, mostrando un RPE igual a 112,07% (datos indicados en la Tabla 28). En la citada dilución, cada OC se encontraba a $5,0E^{-13}M$. No se dispone de la información proliferativa de molaridades tan bajas para ninguno de los dos organoclorados, puesto que la horquilla evaluada para los compuestos de forma independiente abarcó desde $1,0E^{-5}M$ hasta $1,0E^{-11}M$. En cualquier caso, es oportuno resaltar que la mayor proliferación, superando ligeramente el valor del control positivo, se observó a concentraciones muy

diluidas, siendo esta mezcla la que contenía las molaridades más diluidas de todas las mezclas evaluadas. Ante tal perspectiva, posiblemente se debería seguir profundizando en el estudio de efectos proliferativas a concentraciones inferiores que las estudiadas en el presente estudio. Este dato revela que, incluso a concentraciones de $1,0E^{-12}M$, se producen efectos proliferativos catalogables como fuertemente estrogénicos.

Se destaca también la información contenida en la Tabla 28 donde se detecta que la mezcla binaria de lindano técnico y endosulfán $\alpha\beta$ (MB h/c/) fue la mezcla que mayor respuesta proliferativa originó, tanto en intensidad de respuesta como de número de concentraciones que indujeron efecto. No presentando, además, ninguna respuesta negativa.

Al integrar en un solo gráfico los datos de los dos compuestos que componen la mezcla MB h/c/, y los datos de cada concentración de ésta en base logarítmica, se obtiene la Figura 62.

Figura 62. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la MB c/d/2/ # (# lindano técnico + endosulfán $\alpha\beta$ y en sus integrantes, en base logarítmica.



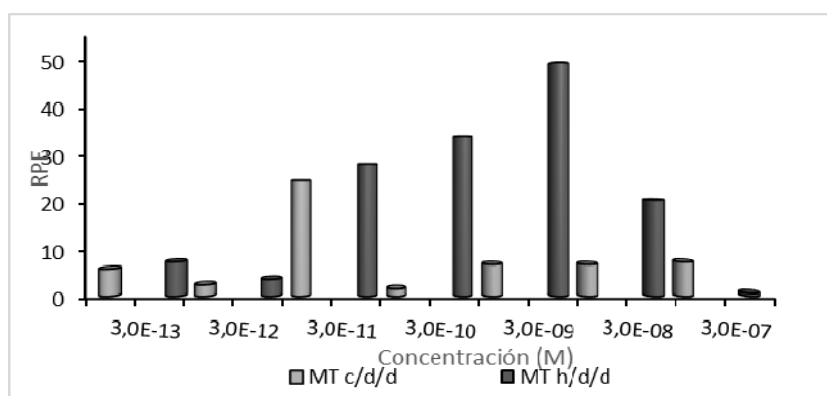
Se observa en la Figura 62 que predomina el efecto del endosulfán sobre la mezcla, aunque los efectos de dicha mezcla sean de menor intensidad que el inducido por el endosulfán $\alpha\beta$ solo.

5.2. MEZCLAS TERNARIAS

Los datos revelan que la mezcla ternaria de lindano técnico y *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE (MT h/d/d/) resultó ser un 58,33% más proliferativa que la mezcla formada por el ciclodiénico junto con los dos difenilalifáticos (MT c/d/d/), a pesar de que en ambas ternarias los difenilalifáticos participaron en el mismo porcentaje (12,5% cada uno de ellos), suponiendo el 75% de la participación el lindano técnico y el endosulfán $\alpha\beta$ en las respectivas mezclas.

Al representar los datos del efecto proliferativo se observa el comportamiento de ambas mezclas, evidenciándose la diferencia en la intensidad en la respuesta (Figura 63).

Figura 63 . Efecto Proliferativo Relativo de las mezclas ternarias ensayadas.



MT c/d/d/: Endosulfán $\alpha\beta$ + *p,p'*-DDT+ *p,p'*-DDE; MT h/d/d/:Lindano técnico+ *p,p'*-DDT+ *p,p'*-DDE

- MEZCLA TERNARIA MT C/D/D: ENDOSULFÁN AB + P,P'-DDT + P,P'-DDE (75:12,5:12,5)

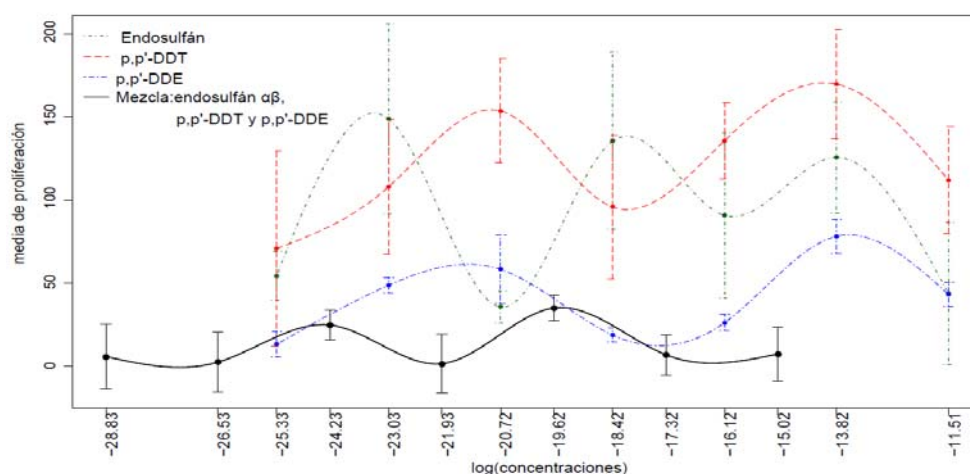
En la Tabla 32 se resumen los valores proliferativos más relevantes, al igual que en las mezclas anteriores. En esta combinación ternaria, la molaridad $3,0E^{-11}M$ fue la más efectiva, hallándose cada OC a $1,0E^{-11}M$. En los análisis previos, donde se evaluó cada organoclorado individualmente, en esta concentración el endosulfán $\alpha\beta$ presentó carácter parcialmente estrogénico, el *p,p'*-DDT se mostró como parcialmente estrogénico, y el *p,p'*-DDE como débilmente estrogénico; representando el 75% de la mezcla el endosulfán, y el 25% restante repartido por igual entre los dos difenilalifáticos (*p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE).

Tabla 32. MT c/d/d/ # (#endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT + p,p' -DDE): Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE en porcentaje) de la mezcla y RPE en porcentaje de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

Concentración (M)	RPE (%)			
	Endosulfán $\alpha\beta$	p,p' -DDT	p,p' -DDE	Máximo MT c/d/d/
$1,0E^{-11}$	54,37	70,76	13,17	
$3,0E^{-11}$				24,78
Efecto Proliferativo	Parcial	Parcial	Débil	Débil/Parcial

En la Figura 64 se plasman los datos proliferativos de cada concentración de la mezcla y de los obtenidos en sus componentes, en base logarítmica.

Figura 64. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla ternaria (MT c/d/d/ # (#endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT + p,p' -DDE) y de sus componentes



- MT H/D/D/: LINDANO TÉCNICO + P,P'-DDT+ P,P'-DDE (75:12,5:12,5)

La mezcla ternaria MT h/d/d/ dio lugar a una respuesta del 42,49% de RPE máximo, en donde el lindano técnico (máximo integrante, con un 75% de representación) se hallaba a $7,5E^{-8}M$, y los difenilalifáticos a $1,25E^{-8}M$ y 12,5 % cada uno de ellos (información recogida en la Tabla 24). En la Tabla 33 se recupera la información sobre las concentraciones más próximas ensayadas para cada uno de ellos, el lindano técnico y el p,p' -DDT derivaron en una respuesta fuertemente estrogénica, mientras que el p,p' -DDE resultó ser débilmente estrogénico.

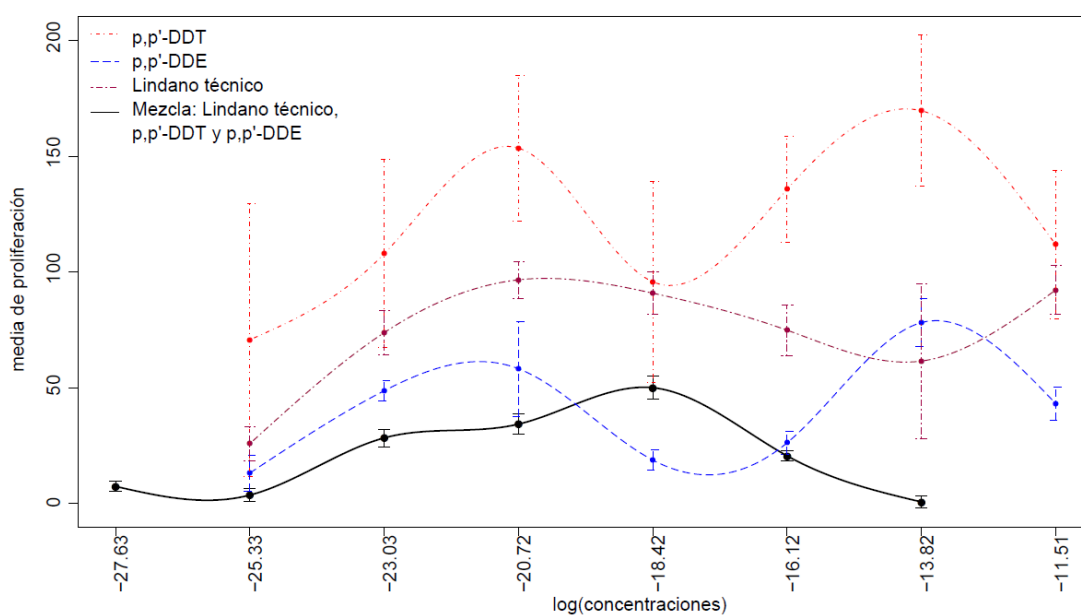
Tabla 33. MT h/d/d/ # (#Lindano técnico + p,p'-DDT+ p, p'-DDE.) Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE (en porcentaje) de sus integrantes, a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

Concentración (M)	RPE (%)			MT h/d/d/ (lindano + p,p'-DDT + p,p'-DDE)
	Lindano técnico	p,p'-DDT	p,p'-DDE	
*1,0E-7	74,9			
*1,0E-8		95,81	18,78	
1,0E-8				42,49
Efecto proliferativo	Fuerte	Fuerte	Débil	Parcial

*Concentración más cercana a la hallada en la disolución más proliferativa de la mezcla para cada componente de la mezcla.

En la Figura 65 se representan, en base logarítmica, los datos proliferativos de cada concentración de la mezcla y de los obtenidos por sus componentes.

Figura 65. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados para la mezcla ternaria MT h/d/d/ # (# Lindano técnico + p,p'-DDT+ p, p'-DDE) y de sus componentes



5.3. MEZCLA CUATERNARIA Y SENARIA

- MC C/C/D/D/: ALDRÍN+ DIELDRÍN +p,p'-DDT +p,p'-DDE (25:25:25:25)

La única mezcla constituida por cuatro compuestos, a partes iguales, se diseñó con dos ciclodiénicos (aldrín y dieldrín) y los dos difenilalifáticos. Esta combinación mostró su máxima proliferación a $1,0E^{-11}M$, en la que cada OC se hallaba a su vez, a $2,5E^{-12}M$. Como en los casos anteriores, es interesante analizar el efecto que provocó cada componente de la mezcla en la concentración que provocó la mayor respuesta en los análisis individualizados y poder valorar las semejanzas respecto a la mezcla. No obstante, de forma individual no se evaluó la molaridad $2,5E^{-12}M$, siendo la más próxima la obtenida por el valor $10E^{-11}M$ (véase Tabla 16 y Tabla 17). Como se aprecia en la (Tabla 34), el aldrín fue el único fuertemente estrogénico; el *p,p'*-DDE se comportó de forma débilmente estrogénica; y el *p,p'*-DDT, junto con el dieldrín, parcialmente estrogénicos por desencadenar valores cercanos al 70% de RPE en ambos casos.

Tabla 34. MC c/c/d/d/: Valor del efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) máximo de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

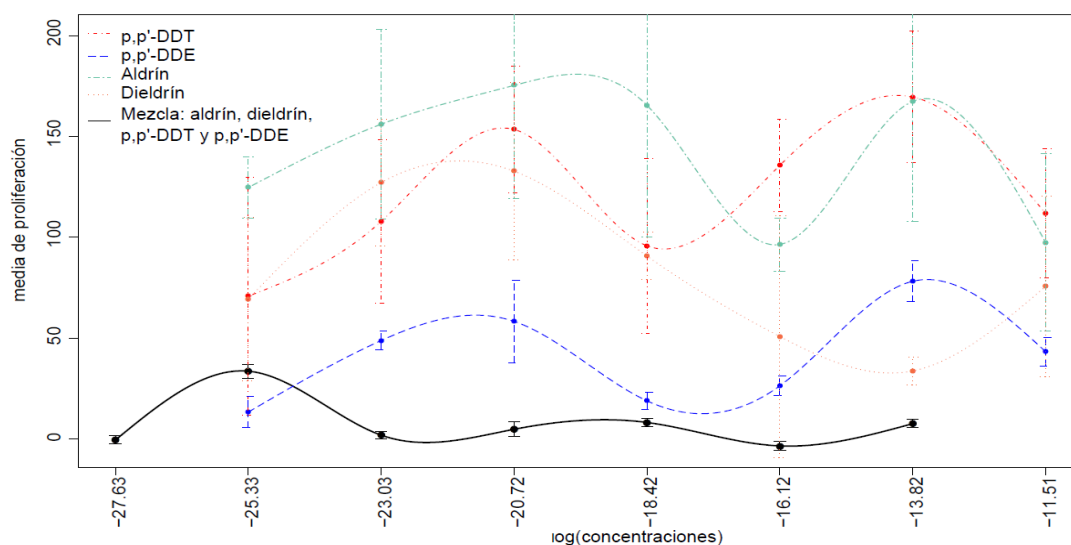
Concentración (M)	RPE (%)				MC c/c/d/d/
	Aldrín	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	Dieldrín	
$1,0E^{-11}$	*124,74	*70,76	*13,17	*69,35	33,51
Efecto estrogénico	Fuerte	Parcial	Débil	Parcial	Parcial

**Concentración analizada para cada componente de forma individual más cercana a la molaridad de éstos en la concentración más efectiva de la MC c/c/d/d/.*

MC c/c/d/d/= aldrín + dieldrín + p,p'-DDT+ p,p'-DDE (25:25:25:25)

Al integrar en un solo gráfico los datos de los dos compuestos que componen la mezcla MC c/c/d/d/, y los datos de cada concentración de ésta en base logarítmica, se obtiene la Figura 66.

Figura 66. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados para la mezcla cuaternaria MC c/c/d/d/# (#aldrín + dieldrín+ p,p'-DDT+ p,p'-DDE) y de sus componentes



-MEZCLA SENARIA-MS C/C/C/D/D/H/: (ENDOSULFÁN $\alpha\beta$ + ALDRÍN + DIELDRÍN +p,p'-DDT+ p,p'-DDE + LINDANO TÉCNICO (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5)

Esta última mezcla se constituyó con seis organoclorados, tres de ellos ciclodiénicos, dos difenilalifáticos, y un hexaclorociclohexano. En la Tabla 34 se plasma el valor de RPE derivado de la exposición de la concentración más proliferativa ($6,0E^{-10}M$) de la mezcla, junto con el efecto proliferativo observado en los ensayos previos de cada OC a la concentración más próxima a la anteriormente indicada. Se tiene en cuenta, por tanto, el efecto que presentó cada compuesto de forma individualizada con la molaridad de cada uno de ellos presente en la concentración más efectiva de la mezcla. Se reflejan las dos concentraciones más cercanas a $6,0E^{-10}M$ evaluadas en los OC individualmente, en concreto, $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-9}M$ para cada compuesto.

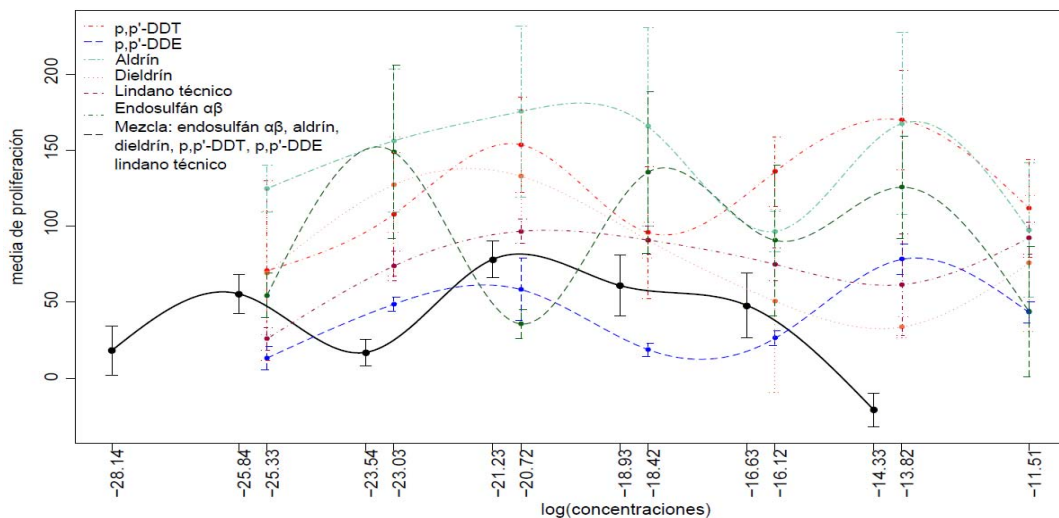
Tabla 35. MS c/c/c/d/d/h/, Mezcla senaria: Valor del máximo efecto proliferativo relativo (RPE, en porcentaje) de la mezcla y RPE de sus integrantes a la molaridad más próxima evaluada de forma individualizada.

Concentración (M)	RPE (%)						
	Endosulfán $\alpha\beta$	Aldrín	Dieldrín	<i>p,p'</i> - DDT	<i>p,p'</i> - DDE	Lindano técnico	MS c/c/c/d/d/h/
*1,0E ⁻¹⁰	148,80	156,21	127,2	107,93	48,72	73,83	
6,0E ⁻¹⁰							78,22
*1,0E ⁻⁹	35,64	175,49	132,86	153,60	58,25	96,66	
Efecto proliferativo	Fuerte/parcial	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Parcial	Fuerte	Fuerte

*Concentraciones analizadas de cada componente de forma individual más cercana a la molaridad de éstos en la concentración más efectiva de la mezcla MS c/c/c/d/d/h/ = Endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + Dieldrín + *p,p'*-DDT + *p,p'*-DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5)

La máxima respuesta permitió catalogar la mezcla como fuertemente estrogénica. A la concentración más próxima estudiada para cada uno de sus OC, todos se mostraron como fuertemente estrogénicos, a excepción del *p,p'*-DDE que se catalogó como parcialmente estrogénico. No obstante, el efecto del endosulfán $\alpha\beta$ está supeditado a la concentración seleccionada. Al integrar en un solo gráfico los datos de los dos compuestos que componen la mezcla MS c/c/c/d/d/h/ y los datos de cada concentración de ésta en base logarítmica, se obtiene la Figura 67.

Figura 67. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) de la mezcla senaria MS c/c/c/d/d/h/ (#Endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + Dieldrín + *p,p'*-DDT + *p,p'*-DDE + lindano técnico) y de sus componentes.



6. ANÁLISIS GLOBAL DE LAS MEZCLAS Y DE SUS COMPONENTES

El análisis de los resultados de las mezclas desde varias perspectivas, más allá de los datos numéricos, permitió obtener información relevante a nivel global, en donde juegan un papel fundamental la información de los resultados de los dieciocho organoclorados estudiados.

Para facilitar la comprensión de este apartado, en primer lugar, se resume en la Tabla 36 las concentraciones que dieron lugar al máximo efecto proliferativo, las cuales se corresponden con concentraciones comprendidas entre $1,0E^{-10}M$, $1,0E^{-11}M$ y $1,0^{-8}M$.

Tabla 36. Valores del máximo Efecto Proliferativo Relativo (RPE, en porcentaje) y su concentración responsable para cada mezcla analizada

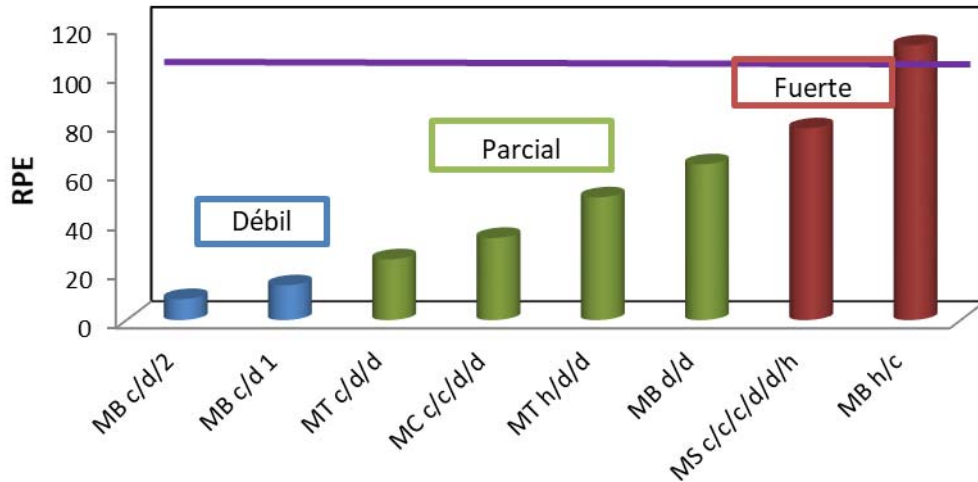
Mezcla	RPE (%)	Máxima Concentración efectiva (M)
MB d/d/	63,57	$1,7E^{-8}$
MB c/d/ 1	14,19	$1,0E^{-10}$
MB c/d/ 2	8,57	$1,0E^{-6}$
MB h/c/	112,07	$1,0E^{-12}$
MT c/d/d/	24,79	$3,0E^{-11}$
MT h/d/d/	42,49	$1,0E^{-8}$
MC c/c/d/d/	33,51	$1,0E^{-11}$
MS c/c/c/d/d/h/	78,22	$6,0E^{-10}$

MS c/c/c/d/d/h/=endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5); MB d/d/= p,p'-DDT + p,p'-DDE (50:50); MT c/d/d/= endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB c/d/ 1 =endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDE (75:25); MB c/d/ 2=Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT (75:25); MC c/c/d/d/= aldrín+ dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE (25:25:25:25); MT h/d/d/=lindano técnico + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB h/c/ = lindano técnico+ endosulfán $\alpha\beta$ (50:50)

Al representar la información de la Tabla 36 en un gráfico de barras (Figura 68) se observa que de las ocho mezclas evaluadas, el 25% se cataloga como débilmente estrogénicas, al igual que las fuertemente estrogénicas, por lo que el 50% restante se

clasifica como parcialmente estrogénicas. De las dos mezclas fuertemente estrogénicas, tan sólo una supera ligeramente el efecto del control positivo, representado por la línea negra.

Figura 68. Efecto Proliferativo Relativo de las mezclas evaluadas

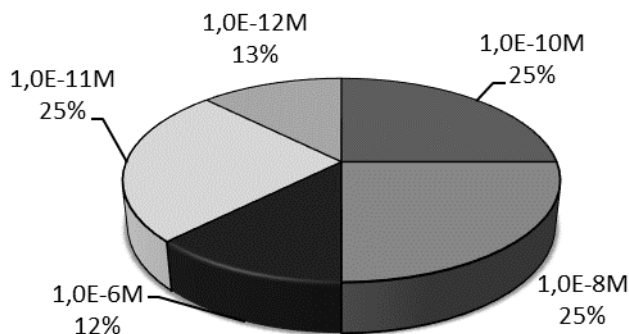


MS c/c/c/d/d/h=endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5); *MC c/c/d/d*= aldrín+ dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE (25:25:25:25); *MT c/d/d*= endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); *MT h/d/d*=lindano técnico + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); *MB d/d*= p,p'-DDT + p,p'-DDE (50:50); *MB c/d/1*=endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDE (75:25); *MB c/d/2*= Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT (75:25); *MB h/c*= lindano técnico+ endosulfán $\alpha\beta$ (50:50)

Una vez representados los datos globales de las mezclas es conveniente el estudio comparado de éstos frente a los organoclorados que las integran, lo que permite continuar ahondando en la extracción de información de resultados.

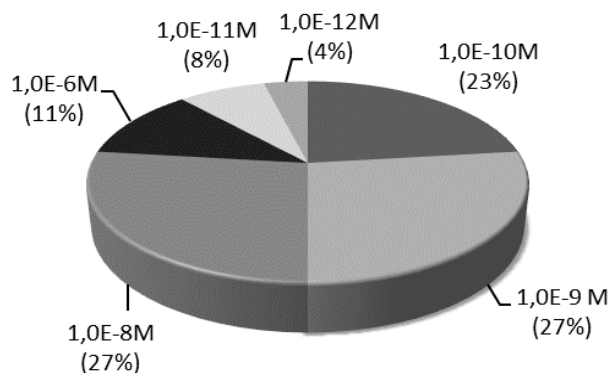
Tanto para el caso de los compuestos estudiados de forma individualizada (véase la Figura 49) como para las mezclas, las concentraciones intermedias del rango evaluado son, con mayor frecuencia, las que dieron lugar al máximo efecto proliferativo. No obstante, se aprecia un reparto más equitativo en el caso de las mezclas (Figura 69), ya que las molaridades $1,0E^{-8}M$, $1,0E^{-10} M$ y $1,0E^{-11}M$ obtuvieron, cada una de ellas, el 25% de los máximos efectos observados respecto del total de las mezclas analizadas.

Figura 69. Frecuencia de las concentraciones responsables del máximo Efecto Proliferativo Relativo en las mezclas



Si no se tiene en cuenta la diferenciación entre OC evaluados por individualizados y el grupo “mezclas”, y se analiza de forma conjunta las concentraciones que originaron el máximo efecto, se obtiene la Figura 70. En esta figura se observa que las concentraciones intermedias $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-8}M$ asumen la mayoría de los máximos efectos observados, al representar el 27% de la casuística cada uno de ellas, seguido de la molaridad $1,0E^{-10}M$, con un 23%. En cambio, la concentración $1,0E^{-12}M$ tan sólo fue responsable del máximo efecto en un 4% tanto de las mezclas como de los ensayos sobre los dieciocho organoclorados. La concentración más elevada, $1,0E^{-5}M$, no derivó en la máxima respuesta en ningún caso.

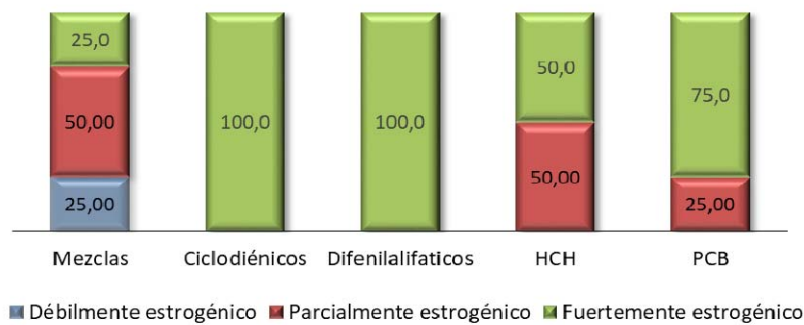
Figura 70. Frecuencia de las concentraciones responsables del máximo Efecto Proliferativo Relativo en los ensayos de los OC por individualizado y en los ensayos de las mezclas(*)



*Con el fin de facilitar la visualización, se ha equiparado la molaridad de las mezclas con la más próxima de los OC ensayados por independiente, puesto que en ciertos casos no son exactamente iguales

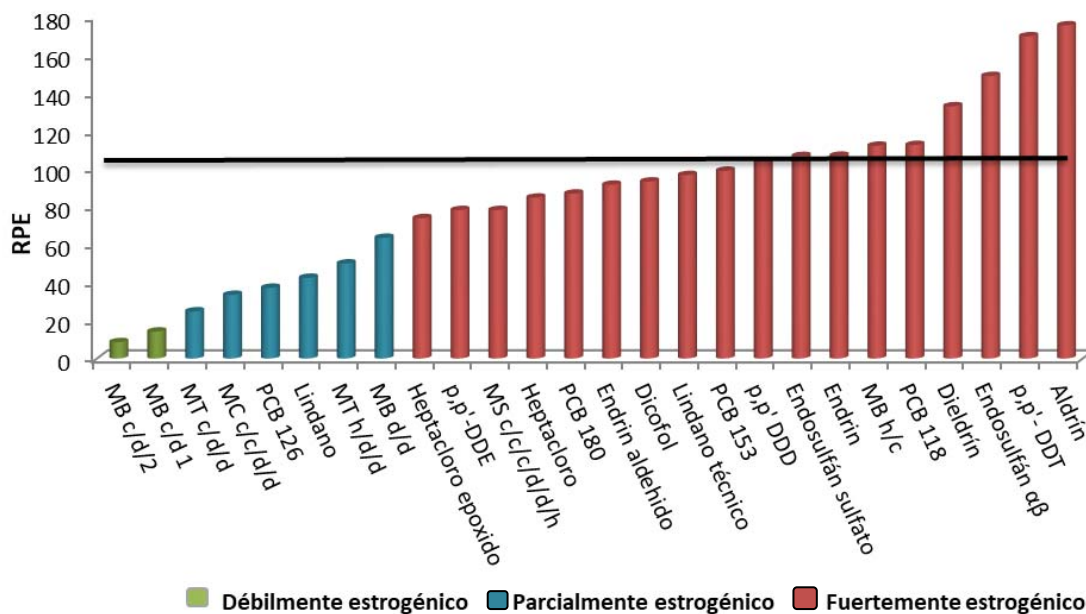
Otro aspecto a destacar es la mayor intensidad en la respuesta de los compuestos evaluados por independiente, frente a las mezclas. Respecto al total de ensayos realizados, se detectó que el 7,69% resultaron ser débilmente estrogénicos, el 23,08% se caracterizaron por ser parcialmente estrogénicos y el 69,23% del total de los compuestos y mezclas evaluadas se comportaron como fuertemente estrogénicos. Se destaca, atendiendo únicamente a las mezclas, que se catalogaron en su mayoría, como parcialmente estrogénicas. Esta misma información, pero representada de otro modo, se plasma en la Figura 71, en donde se refleja el porcentaje que supone cada categoría estrogénica dentro de cada grupo químico y mezclas, siguiendo la clasificación establecida por Andersen *et al.* (1999).

Figura 71. Comportamiento estrogénico de cada grupo químico y sus mezclas con respecto al total de análisis



Al plasmar gráficamente cada elemento evaluado en orden creciente, según el RPE máximo, se obtiene la Figura 72 en donde se ha representado el control positivo (al que se le asigna el 100% del RPE) por la línea negra.

Figura 72. Presentación de los OC y sus mezclas en orden creciente según el Efecto Proliferativo Relativo máximo (en valor medio), coloreados según su carácter débil, parcial o fuertemente estrogénicos.



MS c/c/c/d/d/h=Endosulfán αβ+ aldrín + Dieldrin +p,p'-DDT +p,p'-DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5); MB d/d/= p,p'-DDT +p,p'-DDE (50:50); MT c/d/d/= endosulfán αβ + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB c/d /1/= endosulfán αβ +p,p'-DDE (75:25); MB c/d/2/=endosulfán αβ + p,p'-DDT (75:25) MC c/c/d/d/= aldrín+ dieldrin + p,p'-DDT + p,p'-DDE (25:25:25:25); MT h/d/d/=lindano técnico + p,p'-DDT +p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB h/c/ = lindano técnico+ endosulfán αβ (50:50)

De esta Figura 72 se concluye que los OC estudiados de forma individualizada desencadenan efectos más intensos que en las mezclas, al no detectarse ningún compuesto débilmente estrogénico. Del total de análisis catalogados como parcialmente estrogénicos el 66,6% corresponden a mezclas y el 33,3% restantes, está representado por uno de los dos hexaclorociclohexanos (γ-HCH o lindano) y el PCB# 126. Por tanto, las mezclas englobaron resultados más variados, predominando la respuesta de intensidad intermedia y apareciendo a partes iguales las otras dos categorías.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE V. DISCUSIÓN DE LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS INDUCIDOS POR MEZCLAS DE COMPUESTOS ORGANOCORADOS

Aunque no se suele especificar en los documentos científicos, definir conceptos básicos como aditividad, sinergia o antagonismo, e incluso el concepto de estrogenicidad, ayudarían a unificar los diseños experimentales, y se evitarían ambigüedades en los resultados, puesto que no siempre se interpretan estos conceptos del mismo modo. Por eso, antes de abordar la discusión de los resultados de las mezclas, conviene concretar conceptos para facilitar la comprensión de los mismos y, por ende, su discusión.

- a) Como ya se ha indicado anteriormente, existen dos isotipos principales de receptores estrogénicos (ER) implicados en la regulación de la función estrogénica, el ER α y ER β . Dentro de la función estrogénica se incluye la proliferación celular, regulada por los ER. El ER α destaca por promover la proliferación, mientras que el segundo, controla dicho efecto. No obstante, existen otros receptores capaces de interactuar con los ER directa/indirectamente, influyendo en el efecto final. En esta interacción juegan un papel destacado los receptores androgénicos, al interferir en la señal estrogénica, aunque existen varias reacciones cruzadas con otros receptores y sistemas enzimáticos. Toda esta información se detalla en la Parte II del Capítulo II.
- b) El concepto de *aditividad*, ampliamente empleado por los documentos científicos, no siempre es empleado con el mismo significado. Kortenkamp (2007) apunta que el concepto de aditividad en toxicología no es equiparable al término matemático. Aclara que, un efecto aditivo es la consecuencia de la participación de todos los integrantes de la mezcla, frente al concepto matemático que establece que el efecto es la suma del efecto de cada componente. En toxicología, el efecto aditivo puede ser sinérgico o antagónico. Este matiz puede ser decisivo a la hora de valorar los efectos observados, o de emitir conclusiones y predicciones.
- c) Por otro lado, parece que el término *estrogenicidad* no siempre está bien entendido o aplicado, o al menos, induce a confusión. El concepto de *estrogenicidad* implica la unión de estrógenos/compuestos a receptores estrogénicos (ya sea α y/o β), pero no alude a si se produce un efecto agonista o antagonista (Kortenkamp, 2007). No es extraño detectar que se define un compuesto como antiestrogénico al unirse al receptor β , por ejemplo, no siendo apropiado si lo que se pretende transmitir es la

idea de que no se detecta proliferación, ya que se estaría desencadenando la función propia del ER β .

Con frecuencia se ha propuesto la teoría de que la exposición a mezclas desencadena efectos más perjudiciales que la exposición de un solo compuesto, asumiendo que el efecto final acontece como sinergia o como sumatorio de los efectos de cada compuesto (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). En Pakistán y Bélgica, debido a un almacenamiento inadecuado de malatión, se produjeron episodios de potenciación de toxicidad al aumentar el isomalatión (Aldridge *et al.*, 1979; Baker *et al.*, 1978), como consecuencia de la inhibición de la carboxilesterasa (responsable de la metabolización del malatión) inducida por el isomalatión (Hernández *et al.*, 2013; Maroni *et al.*, 2000). Del mismo modo, también se han descrito situaciones de sinergias de mezclas binarias, como se recoge en la revisión de Cedergreen (2014). A pesar de estos ejemplos, este tipo de efecto no siempre se detecta.

A priori, la elevada capacidad proliferativa de ciertos organoclorados (OC) podría inducir a pensar que las mezclas compuestas por grupos fuertemente estrogénicos darán lugar a efectos proliferativos notorios, frente a las mezclas de compuestos de grupos estrogénicamente menos potentes. Sin embargo, nuestros datos no apoyaron tal hipótesis. Evans *et al.* (2012) también apuntaron que la aparición de mayores efectos en las mezclas frente a sus componentes no se produce en todas las situaciones y, que en no pocas ocasiones, el efecto observado en las mezclas es menor que el producido por sus integrantes, como también sucede en nuestro estudio. Wade *et al.* (1997) observaron que la exposición conjunta de dieldrín y endosulfán no induce sinergia en la estrogenicidad, ni en ensayos *in vivo* ni *in vitro*. En nuestro caso, es difícil concretar si sucede lo mismo para dichos OC, puesto que la exposición conjunta de éstos fue en concomitancia con otros compuestos (Tabla 24). Se han publicado diversos estudios de distinta naturaleza donde se hace referencia al efecto de mezclas. Rizzati *et al.* (2016) elaboraron un estudio basado en la comparación de 78 trabajos realizados entre el año 2000 y 2014, seleccionados en función de determinados criterios, pero excluyendo datos ecotoxicológicos. Agruparon los estudios en cinco efectos/categorías, en función del efecto que otorgó cada autor a sus mezclas: adición, sinergia, antagonismo, potenciación y sin interacción. En el trabajo mencionado se recogen estudios que combinan únicamente insecticidas, pero también otros grupos como fungicidas y/o herbicidas. Atendiendo únicamente a los 40 trabajos de mezclas de

insecticidas, el 45% dieron lugar a efectos aditivos, el 30% a sinergias, en el 15% no hubo interacción, el 10% derivaron en efectos antagónicos y en ningún caso apareció potenciación del efecto. En nuestro trabajo no se han aplicado los conceptos de aditividad, sinergias o antagonismo, ya que hemos detectado una falta de consenso al aplicar estos conceptos, que hace que abogemos por omitirlos. Sobre este aspecto ya se ha hecho mención en la introducción del capítulo, en donde se plasman conceptos como aditividad o antagonismo entendidos por Kortenkamp (2007). En cualquier caso, con carácter general, en las ocho mezclas evaluadas no se produjo ningún efecto mayor que el observado por los componentes de forma individual, siendo la tónica predominante un efecto menor. Esta información se resume en la Tabla 38 (donde se plasman los datos tanto de las mezclas como de los integrantes a las concentraciones responsables del máximo efecto en la mezcla) y Tabla 36, (donde se recogen los valores de RPE máximo obtenido en las siete concentraciones analizadas).

De otra parte, se recuerda que las respuestas que presentaron ciertos OC en nuestro estudio de forma individualizada, no se ajustan a las curvas clásicas dosis-respuesta. Conviene hacer un inciso sobre los análisis mencionados, que contribuirán al desarrollo de la discusión de las mezclas. Al representar los datos de los OC es frecuente detectar la imagen de *onda* en varios de los OC evaluados, con independencia de que la intensidad de la máxima respuesta varía en función del producto, así como la concentración responsable de la misma. Muestra de ello son la Figura 73 y la Figura 74, donde se han representado los resultados de siete compuestos, agrupados en función de su similitud en su curva dosis-respuesta.

Figura 73. Conjunto de compuestos con curvas dosis-respuesta similares (a)

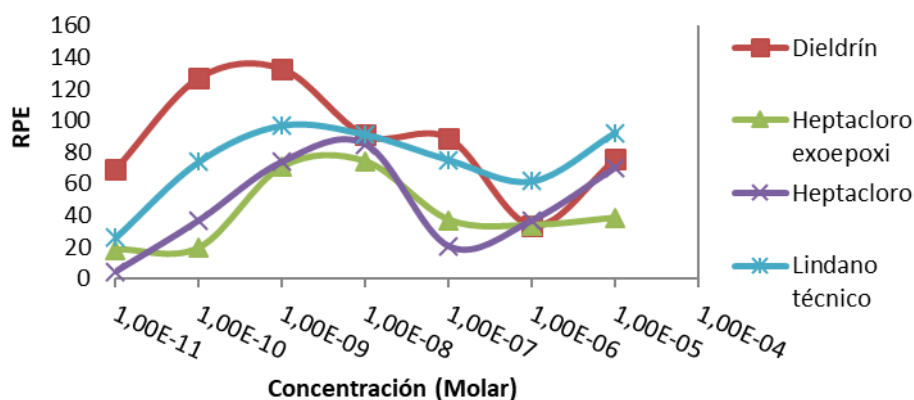
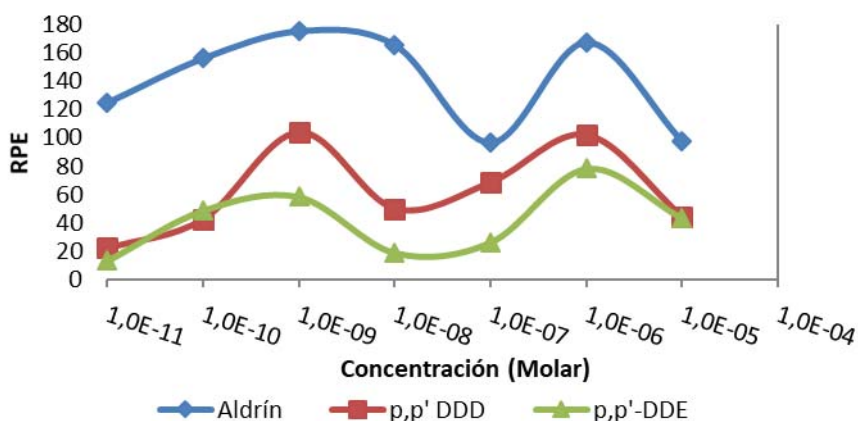


Figura 74. Conjunto de compuestos con curvas dosis-respuesta similares (b)



Esta situación implica que, por un lado, en un compuesto la elección de la concentración condiciona la clasificación, pudiendo ser, desde débilmente estrogénico hasta fuertemente estrogénico, atendiendo a la clasificación propuesta por Andersen *et al.* (1999) que cataloga los compuestos en tres categorías en función del RPE (Soto *et al.*, 1995), como débilmente estrogénico (RPE <25%), parcialmente estrogénico (RPE comprendido entre el 25% y 75%) y fuertemente estrogénicas (RPE >75%). Resulta útil conocer cuál es la máxima capacidad proliferativa de cada sustancia, pero es necesario también conocer cuál es el efecto a otras concentraciones para no sobreestimar o infravalorar el efecto de una sustancia al pretender extrapolar los datos a situaciones no estudiadas.

Se obtuvieron efectos distintos en función de la concentración seleccionada tanto para los OC como para sus mezclas (como se aprecia en las Figura 67, Figura 73, y Figura 74), aunque los mayores efectos observados se produjeron a concentraciones intermedias (Figura 49 y Figura 69). Esta observación también fue reflejada por Diamanti-Kandarakis (2009), quienes apuntaron que compuestos como PCB y ciertos pesticidas organoclorados son capaces de comportarse como sustancias con actividad hormonal, las cuales se caracterizan por desencadenar el mayor efecto a dosis intermedias. Indistintamente del tipo de respuesta, detectamos que no existe un modelo único de respuesta que sea aplicable a todos los análisis realizados.

Rizzati *et al.* (2016) seleccionaron trabajos donde aparecieron sinergias al combinar insecticidas en líneas celulares humanas o cultivo primario de células humanas (Das *et al.*,

2007; Payne *et al.*, 2001; Savary *et al.*, 2014). Sobre estos mismos sistemas *in vitro*, Josse *et al.* (2014) hallaron efectos antagónicos; y Valerón *et al.* (2009) y Josse *et al.* (2014), efectos aditivos. Por último, también se reflejan estudios en donde no detectaron interacción o efectos aditivos (Mumtaz *et al.*, 2002). Con estos ejemplos referentes únicamente a insecticidas, se aprecia que no parece detectarse un único tipo de efecto que permita extrapolar los resultados a todos los compuestos ni siquiera, de un mismo grupo químico. Entre los OC más empleados en los estudios de mezclas que Rizzati *et al.* (2016) seleccionaron en su trabajo, se encuentra el aldrín, DDE, DDT, dicofol, endosulfán, endrin, β -HCH dieldrín y lindano, todos ellos incluidos en el diseño de las mezclas de esta tesis.

La falta de consenso entre los autores a la hora de evaluar el efecto de las mezclas es patente. No es extraño encontrar publicaciones en las que se rebaten estudios o informes, *a priori*, con suficiente rigor científico (ATSDR, 2005; Lamb *et al.*, 2014). Con independencia de las controversias científicas, es complejo obtener un único resultado válido extrapolable a todos los ensayos sobre mezclas, puesto que son muchos los factores que se deben tener en cuenta en la respuesta observada. Surgen discrepancias importantes, por ejemplo, a la hora de ratificar la información obtenida mediante estudios *in vitro* en sistemas *in vivo* (Kortenkamp, 2007).

El diseño de las mezclas conlleva la elección de la/las concentraciones de exposición, punto en el que suelen existir muchas diferencias entre ensayos. Como es de esperar, el resultado diferirá en función de la concentración objetivo. Sin embargo, no siempre los mayores resultados proliferativos se obtienen en el mismo rango de molaridades, apareciendo en unas ocasiones a las más diluidas y en otras, en aquellas más concentradas (Tabla 37).

Tabla 37. Relación del valor máximo de efecto proliferativo relativo de cada compuesto/mezcla y la concentración asociada a dicho efecto

Compuesto/ Mezcla	RPE max (%)	Máxima Concentración efectiva (M)
<i>p,p'</i> - DDT	169,72	1,0E-6
<i>p,p'</i> -DDE	78,18	1,0E-6
MB c/d /2/	8,57	1,0E-6
Heptacloro epóxido	73,93	1,0E-8
Endrin	106,80	1,0E-8
Endrin aldehido	91,52	1,0E-8
Heptacloro	84,73	1,0E-8
PCB 180	86,88	1,0E-8
MT h/d/d/	50,05	1,0E-8
<i>p,p'</i> - DDD	103,77	1,0E-9
Aldrín	175,49	1,0E-9
Dieldrín	132,86	1,0E-9
Endosulfán sulfato	106,65	1,0E-9
Lindano técnico	96,67	1,0E-9
PCB 118	112,48	1,0E-9
PCB 126	37,22	1,0E-9
Dicofol	93,23	1,0E-10
Y HCH o lindano	42,49	1,0E-10
PCB 153	98,89	1,0E-10
MB c/d/1/	14,19	1,0E-10
MS c/c/c/d/d/h/	78,22	6,0E-10
Endosulfán $\alpha\beta$	148,80	1,0E-10
MC c/c/d/d/	33,51	1,0E-11
MT c/d/d/	24,79	3,0E-11
MB h/c /	112,07	1,0E-12
MB d/d/	63,57	1,7E-8

MS c/c/c/d/d/h/=endosulfán $\alpha\beta$ + aldrín + dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5); MB d/d/= p,p'-DDT + p,p'-DDE (50:50); MT c/d/d/= endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB c/d /1/ =endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDE (75:25) MB c/d/2/ =Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT (75:25); MC c/c/d/d/= aldrín+ dieldrín + p,p'-DDT + p,p'-DDE (25:25:25:25); MT h/d/d/=lindano técnico + p,p'-DDT + p,p'-DDE (75:12,5:12,5); MB h/c/ = lindano técnico+ endosulfán $\alpha\beta$ (50:50)

Como se indica en el apartado referente a los resultados de las mezclas, en el presente estudio hemos detectado que las proliferaciones más intensas aparecieron en tres concentraciones intercaladas, $1,0E^{-8}M$, $1,0E^{-10}M$ y $1,0E^{-11}M$. En varias ocasiones se ha evidenciado la aparición de la misma magnitud en la respuesta a concentraciones no consecutivas junto con otras intensidades de forma intercalada, en una misma mezcla (Tabla 25), fenómeno que también aparece en la exposición de OC de forma individual. Las variaciones del efecto, a lo largo de la serie de concentraciones ensayadas, dificulta la descripción de un único modelo de respuesta. Estos efectos aparecen, por ejemplo, en la mezcla binaria MB h/c/, la cual desarrolló un RPE próximo al 70% (parcialmente estrogénico), pero tan sólo alcanzó valores de RPE del 11,36% a $1,0E^{-9}M$; o en el caso del p,p'-DDD, donde la proliferación rondó el 45% en $1,0E^{-10}M$, $10E^{-8}M$ y $1,0E^{-5}M$, y entorno al 100% a $1,0E^{-9}M$ y $1,0E^{-6}M$ (Tabla 16 y Figura 25).

Por otra parte, también aparecieron valores negativos, valores que también aparecieron en los estudios de Aubé *et al.* (2011). Estos datos negativos podrían deberse a varias causas, como citotoxicidad o procesos de inhibición de la mitosis, entre otros (León *et al.*, 2006; Okubo *et al.*, 2004). Quizá sean los mismos motivos los que pudieran justificar los resultados de Aubé *et al.* (2011), quienes detectaron proliferación celular de MCF-7 a concentraciones de mezclas del orden de dilución 100×10^3 y 50×10^3 , pero a concentraciones elevadas (diluciones del orden de 10×10^3 y 5×10^3) obtuvieron resultados negativos. Entre las posibles causas que podrían explicar un menor efecto observado en las mezclas se encuentra la saturación de los receptores estrogénicos a elevadas concentraciones de compuestos agonistas (Charles *et al.*, 2002) que abogan más por la interferencia en la señal estrogénica que derive en un menor efecto proliferativo, como sucede con los compuestos androgénicos

(Chen *et al.*, 2001; Reen *et al.*, 2002; Safe, 1998). Por tanto, el menor efecto de las mezclas detectado en nuestros estudios (Tabla 36), en comparación con el efecto de sus componentes (Tabla 22), no es un caso aislado en la literatura científica.

Al profundizar en el análisis de los resultados de las mezclas, analizando tanto los máximos efectos de las mismas, como los valores obtenidos en los ensayos de los OC que las conforman, se han detectado ciertas relaciones que se extraen, implícitamente, de la Tabla 38 y que se discuten a continuación.

Tabla 38. Resumen del efecto de cada mezcla evaluada

Mezcla y clasificación estrogénica	Ciclodiénicos			Difenilalifáticos		HCH
	Endosulfán $\alpha\beta$	Aldrín	Dieldrín	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	Lindano técnico
MS c/c/c/d/d/h/ Fuerte	50% Parcial/ Fuerte	12,5% Fuerte	12,5% Fuerte	6,25% Fuerte	6,25% Parcial	12,5% Fuerte
MC c/c/d/d/ Parcial		25% Fuerte	25% Parcial	25% Parcial	25% Débil	
MT h/d/d/ Parcial				12,5% Fuerte	12,5% Débil	75% Fuerte
MT c/d/d/ Parcial	75% Parcial			12,5% Parcial	12,5% Débil	
MB h/c/ Fuerte	50% *					50% *
MB c/d/2/ Débil	75% Fuerte			25% Fuerte		
MB c/d/1/ Débil	75% **Parcial/ fuerte				25% **Débil/parcial	
MB d/d/ Parcial				50% Fuerte	50% **Débil/parcial	

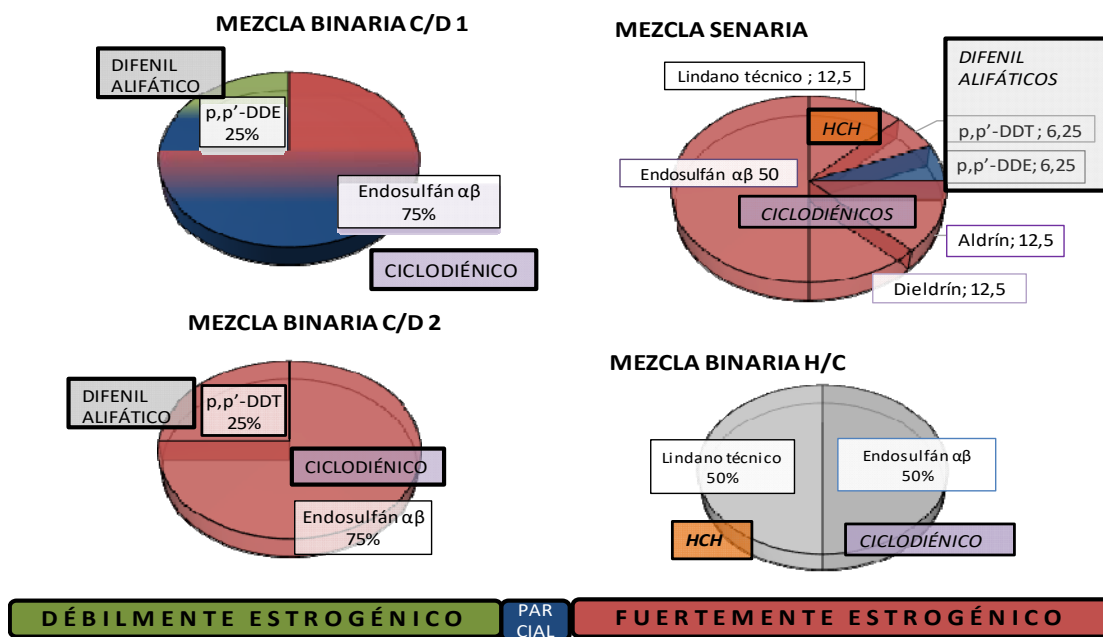
Porcentaje de participación de cada compuesto junto con la clasificación del carácter estrogénico observado individualmente a la molaridad a la que se encontraba cada OC, en la concentración más proliferativa de la mezcla; Bajo la numeración de cada mezcla, se indica su efecto máximo observado.

*: No se dispone del dato para la concentración de los OC requerida. **: La clasificación estrogénica varía en función de la concentración seleccionada más cercana a la disolución más proliferativa de la mezcla.

Esta tabla ofrece una visión general de los factores que juegan un papel fundamental en los resultados, como son: el carácter estrogénico de la mezcla (débil, parcial o fuerte); el porcentaje que representa cada organoclorado en el conjunto de la mezcla; y la información que se extrae al analizar la concentración responsable del máximo efecto. Al desglosar la información contenida en éstas concentraciones, observamos que la concentración responsable del máximo efecto de las mezclas no siempre se corresponde con la concentración responsable del máximo efecto en los ensayos de los OC por individualizado. Por ello, en la Tabla 38, se indica el carácter estrogénico que mostró cada componente a la concentración que originó el máximo efecto en la mezcla. La importancia que se deriva de esta información se observa más fácilmente en la Figura 75 y en la Figura 76, al otorgar una coloración a cada intensidad: débilmente estrogénico (verde), parcialmente estrogénico (azul) y fuertemente estrogénico (granate).

Por tanto, la coloración no representa a los distintos grupos químicos, sino a la clasificación estrogénica que se asignó en los ensayos individualizados a cada componente por separado a la concentración que, en la mezcla, supuso el máximo efecto.

Figura 75. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas débilmente/fuertemente estrogénicas



Mezcla Binaria c/d/1/: en función de la molaridad seleccionada para cada uno de los OC, se observó distinta intensidad proliferativa en los ensayos realizados de forma individualizada. Mezcla binaria h/c/: No se evaluó, para ninguno de los dos integrantes, la concentración que dio lugar a la máxima respuesta en la mezcla, por lo que no se les ha asignado ningún efecto

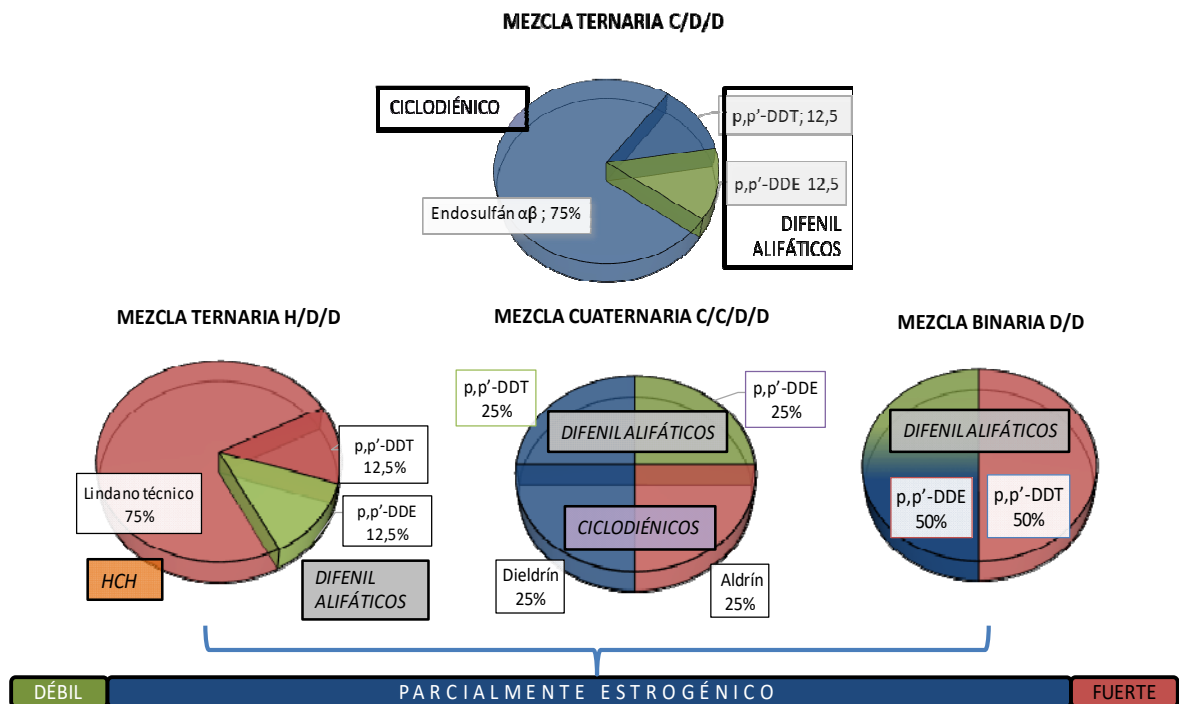
Observamos también en la Figura 75 que el porcentaje de participación de cada OC no se relacionó directamente con el efecto final. Se aprecia, fácilmente, cómo la mezcla binaria MB c/d/2/, conformada por endosulfán $\alpha\beta$ y p,p' -DDT (ambos fuertemente estrogénicos) al 75% y 25% respectivamente, derivó en un efecto máximo menor, catalogado como débilmente estrogénico. De forma similar ocurrió con la combinación binaria c/d/1/, compuesta por endosulfán $\alpha\beta$ y p,p' -DDE y (representados por el 75% y 25%). Con la salvedad de que, en este caso, los efectos observados de forma individual variaban en función de si se seleccionaba la concentración de los OC más próxima por arriba o por debajo de la molaridad más efectiva en la mezcla. De ahí que se ha representado con las dos coloraciones correspondientes, tanto el ciclodieno como el difenilalifático.

Tan sólo dos mezclas fueron catalogadas como fuertemente estrogénicas, la senaria y la binaria MB h/c/. Esta última, constituida por el hexaclorociclohexano lindano técnico, y el ciclodiénico endosulfán $\alpha\beta$, para los cuales no se tienen datos sobre su capacidad estrogénica a la molaridad que mayor efecto se observó en la mezcla. En cuanto a la mezcla senaria, tan sólo el p,p' -DDE (al 6,25%) mostró ser parcialmente estrogénico en su evaluación individual; los cinco compuestos restantes, fueron fuertemente estrogénicos, al igual que el efecto máximo de la mezcla.

Quedan, por tanto, cuatro mezclas con carácter parcialmente estrogénico: las dos mezclas ternarias MT h/d/d/ (lindano técnico, p,p' -DDT y p,p' -DDE), y MT c/d/d/ (endosulfán $\alpha\beta$, p,p' -DDE y p,p' -DDT), la cuaternaria MC c/c/d/d/ (dieldrín, aldrín, p,p' -DDT y p,p' -DDE) y la binaria MB d/d/ (p,p' -DDT y p,p' -DDE), representadas en la Figura 76. Estas fueron, además, las únicas en las que no participó el endosulfán $\alpha\beta$. En los tres casos, el carácter que presentó el p,p' -DDE fue el menor de todos los componentes, catalogado como débilmente estrogénico. En este sentido, se ha de puntualizar que, para la mezcla binaria MB d/d/, la molaridad que mayor proliferación indujo no fue evaluada de forma individualizada para sus componentes, por lo que se ha tomado como referencia los valores analizados inmediatamente superior e inferior. Para el p,p' -DDT, ambos valores mostraron ser

fuertemente estrogénicos, pero para el *p,p'*-DDE sí variaba, siendo parcialmente o débilmente estrogénico. Por lo tanto, en la mezcla binaria al *p,p'*-DDE se le asignan las dos coloraciones pertinentes. Estas fueron, además, las únicas en las que no participó el endosulfán $\alpha\beta$, a excepción de la MT c/d/d/. La mezcla ternaria, conformada por endosulfán $\alpha\beta$, *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDT también originó un efecto proliferativo, a priori, menor: entre débil y parcialmente estrogénico a pesar de que el *p,p'*-DDT y el endosulfán $\alpha\beta$ constituyeron el 87,5% del total, con carácter parcialmente estrogénico (con RPE del 54,37% y 70,6% respectivamente). El 12,5% restante estaba representado por el *p,p'*-DDE, con capacidad débilmente estrogénica (RPE del 13,17%). Sin embargo, es necesario puntualizar que esta mezcla ternaria presentó un RPE del 24,8%, encontrándose el límite con la siguiente categoría en el 25%. Si se aplican estrictamente las divisiones establecidas por Andersen *et al.* (1999), esta mezcla se clasificaría como débilmente estrogénica. Sin embargo, precisamente por hallarse en el límite, se ha decidido que prevalezca el principio de cautela e incluirla en la categoría siguiente, como “parcialmente estrogénica”. En cualquier caso, parece que en estas cuatro mezclas se produce un efecto más balanceado, ya que el resultante es una estrogénicidad parcial, partiendo de compuestos con efectos tanto fuertemente estrogénicos como débilmente estrogénicos (Figura 76).

Figura 76. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas parcialmente estrogénicas.



A raíz de la información resumida en la figura 75 y en la Tabla 38 se pueden intuir los mecanismos de acción y las distintas afinidades que podrían explicar por qué los resultados obtenidos en las mezclas, en general, son menores que el de sus integrantes. Se observa, por ejemplo, que la presencia del *p,p'*-DDE suele modular el efecto proliferativo a la baja; o que la conjunción del ciclodiénico endosulfán $\alpha\beta$ y los difenilalifáticos también induce un menor efecto que por separado; frente a la concomitancia entre el endosulfán $\alpha\beta$ y HCH técnico, que parece que no afecte de la misma manera, al no originarse una respuesta de menor intensidad. Indudablemente, detrás del mecanismo de acción de cada compuesto y las distintas afinidades por cada receptor (ER α , ER β , receptor androgénico, activación del CYP etc.), está la clave de la respuesta ya que cada uno de ellos contribuye de distinta manera en la señal estrogénica. Como se ha indicado oportunamente, un mismo compuesto es capaz de unirse a más de un receptor y, de esta unión, derivarse un efecto agonista o antagonista (Gaido *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 2004; Maness *et al.*, 1998; Okubo *et al.*, 2004). Junto con ello, se ha de tener en cuenta la función propia de cada uno de los receptores a los que son susceptibles de unirse cada OC. De este modo, el agonismo sobre ER α induce proliferación, y el antagonismo del efecto del ER β también podría propiciarlo al tener cada isotipo funciones distintas (Kortenkamp, 2007). Sin embargo, no hay que perder de vista que la afinidad por cada uno de ellos no tiene por qué ser de la misma intensidad, uniéndose más eficazmente sobre unos que sobre otros (Kojima *et al.*, 2004; Gale *et al.*, 2004). Además, hay que recordar que un mismo compuesto es capaz de interactuar con distintos mecanismos de acción, por lo que el efecto final dependerá no sólo de un tipo de receptor. Por ejemplo, se ha comprobado que un mismo compuesto es capaz de interactuar con el ER α , ER β y sobre el receptor androgénico (Kojima *et al.*, 2004); inhibiendo la función de la aromatasa (como parece ser el caso del lindano) (Li *et al.*, 2008; Maranghi *et al.*, 2007), o incrementando de las enzimas hepáticas del CYP implicadas en el metabolismo de la testosterona y la actividad aromatasa por parte del *p,p'*-DDE (ATSDR, 2002). Pero en la respuesta final hay que tener en cuenta, además, un posible efecto de saturación de receptores (Charles 2002; Lagarde *et al.*, 2015, visto en Konterkamp 2007) o la modificación en la expresión de receptores condicionada por las sustancias químicas bajo determinadas condiciones. Así, la exposición a largo plazo a compuestos como el endosulfán y dieldrín entre otros xenoestrógenos, es capaz de modificar la expresión de ER α y ER β (Briz *et al.*, 2011; Grunfeld y Bonefeld-Jorgensen, 2004), como se ha detectado en células epiteliales y neuronales. Sin embargo, la

variación en la expresión de ER no sólo se produce frente a xenoestrógenos. También se ha detectado tras la exposición en varios tejidos a distintas concentraciones de su ligando natural (E2), tanto en machos como en hembras de medaka (*Oryzias latipes*) (Chakraborty *et al.*, 2011).

Por tanto, para poder comprender el efecto de las mezclas se ha de tener en consideración los mecanismos de acción de cada OC. Esta información, junto con las observaciones más destacadas que se desprenden de la Figura 75, 76 y en la Tabla 38, se abordan en los siguientes párrafos:

- a) Los difenilalifáticos se hallan en siete de las ocho mezclas. En ellas se aprecia una predominancia del efecto del *p,p'*-DDE, derivando hacia un menor efecto proliferativo sobre el resto de componentes de las mezclas. Este fenómeno se podría explicar por la capacidad que poseen éstos OC de inducir la transcripción de ambos receptores estrogénicos (ER) (Kojima *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006), así como el marcado carácter antiandrogénico, ligeramente superior para el *p,p'*-DDE (Kojima *et al.*, 2004), responsables de respuestas opuestas en células epiteliales mamarias (Aubé *et al.*, 2008).
- b) En las dos mezclas en las que participa el lindano técnico (junto con el ciclodiénico endosulfán $\alpha\beta$ por un lado, y los difenilalifáticos por otro) se deriva un efecto, como mínimo, parcialmente estrogénico. Conocer el grado de interacción entre los distintos mecanismos de acción de los OC de estas mezclas es complejo, puesto que no hemos detectado en la bibliografía datos para el lindano técnico. Como ya se indicó en el apartado referente a la discusión de los HCH del capítulo V, tres tres isómeros presentan actividad sobre el ER β (cuya función principal es regular a su homólogo α), mientras que dos de ellos lo harían también sobre ER α (con mayor carácter proliferativo) (Kojima *et al.*, 2004; MAGRAMA, 2013). El lindano técnico desencadena un efecto muy similar al del endosulfán, sobre los receptores estrogénicos según aporta Lemaire *et al.* (2006), aludiendo a la capacidad del ciclodiénico para activar al ER α y antagonizar débilmente al ER β . Esta similitud en el mecanismo de acción podría explicar el elevado efecto de la mezcla binaria MB h/c/.

c) La Figura 75, 76 y en la Tabla 38 también permite detectar que no parece tener especial relevancia el porcentaje con el que cada compuesto participa en la mezcla sobre el efecto final de la misma. Esta apreciación podría corresponderse con el hecho de que tan sólo las hormonas/compuestos libres son capaces de iniciar las respuestas funcionales, independientemente de que en el organismo, tejido o sistema exista mayor cantidad unido a proteínas, o no disponible (Colborn, 2004). En el organismo circulan niveles muy bajos de hormonas, del orden de partes por trillón o por billón (Jones, 1996), por lo tanto, incluso los menores porcentajes de participación de los compuestos en las mezclas podrían ser suficientes para que los niveles necesarios de OC libres desencadenen el efecto, dejando sin relevancia la presencia de mayores cantidades de moléculas.

Por lo tanto, el diseño de las mezclas es uno de los aspectos fundamentales a tener en cuenta la hora de cotejar los resultados entre estudios (ATSDR, 2005). En este sentido, no abundan los trabajos, *in vitro* o *in vivo*, en los que el diseño de las mezclas se haya fundamentado en parámetros de exposición real, tales como datos epidemiológicos, concentraciones ambientales o compuestos hallados en tejidos animales o humanos, por ejemplo, como es el caso de este trabajo. El estudio llevado a cabo por Evans *et al.* (2012) se asemeja al nuestro en este aspecto, quienes, además, cotejaron el efecto estrogénico entre los ensayos ERLUX y *E-Screen*. Entre sus conclusiones destacaron la detección de moduladores de efecto negativo y la ausencia de modulación positiva en las mezclas. Dicho de otro modo, detectaron que determinados compuestos disminuían el efecto de las mezclas, pero no detectaron un incremento proliferativo en ningún caso. Aunque las sustancias analizadas por el equipo de Evans no son las mismas que las tratadas en este trabajo, sus resultados están en consonancia con los nuestros al predominar un menor efecto proliferativo de las mezclas, a pesar de que los resultados de los compuestos integrantes de las mezclas por individualizado, desencadenaran efectos estrogénicos significativos.

Por otra parte, en no pocas ocasiones se ha estudiado el efecto de las mezclas, sin tener un conocimiento previo sobre cómo se comportan sus integrantes por separado. Kortenkamp (2007) hace hincapié en su revisión sobre la necesidad de realizar estudios sobre mezclas para evaluar el efecto, pero conociendo previamente la capacidad de cada

componente para desencadenar la respuesta. De esta manera, se podría estudiar las posibles interacciones de sinergia, aditividad o antagonismo, fundamento compartido en esta tesis. El hecho de valorar el efecto de la mezcla “como un todo”, imposibilita la extrapolación de los datos a otras mezclas, puesto que ligeras variaciones en la composición pueden derivar en cambios de efectos. En el citado texto de Konterkamp se apunta, además, que los procesos de aditividad y sinergia son los más complejos de dilucidar.

Así, se debe interpretar adecuadamente la literatura científica, y ser cautelosos tanto a la hora de seleccionar una información, como a la hora de establecer sentencias totalitarias. En este sentido, es de rigor reconocer que, con el paso de los años y el avance de los conocimientos de rutas bioquímicas, nuevos equipos y nuevas tecnologías, descubrimiento de nuevos receptores celulares e interconexiones en las funciones hormonales, se ha ido proporcionando información más detallada. Por ejemplo, estudios realizados por Soto *et al.* (1995) se referían al carácter estrogénico de los compuestos en términos de estrogénico /antiestrogénico o proliferativo/no proliferativo. Sin embargo, dos años más tarde Kuiper *et al.* (1996) clonaron el receptor ER β , lo que permitió profundizar más en los mecanismos de acción, acompañado siempre de los avances en el desarrollo de nuevas técnicas. Gracias a ello, cada vez es más fácil disponer de información más completa, conociendo, por ejemplo, la capacidad que poseen los compuestos de inducir la señal estrogénica por parte de cada isotipo de receptores estrogénicos y androgénicos (Kojima *et al.*, 2004). Quizá este sea también uno de los motivos por los que compuestos evaluados hace treinta años por unas técnicas concretas, al reevaluarlos con diferentes metodologías más actuales, den lugar a resultados no esperados, y de ahí que se citen diferentes efectos para un mismo compuesto. Muestra de ello es que a mediados de los 90, Soto *et al.* (1995, 1994) indicaron que el *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, y *p,p'*-DDT actuaron como totalmente estrogénicos (agonistas) en el ensayo *in vitro* E-Screen. Por aquellos años, aún no se hacía distinción sobre la actividad específica para cada tipo de receptor estrogénico, puesto que por aquél entonces se consiguió clonar el ER β . Años más tarde, se publican estudios en donde se especifica la distinta afinidad de los isómeros de difenilalifáticos hacia cada isotipo de ER (Lemaire *et al.*, 2006), así como la capacidad del DDT de incrementar el metabolismo de determinados compuestos al actuar sobre las oxidasas que intervienen en el catabolismo de los compuestos (ATSDR, 2002).

1. INCONVENIENTES EN LA PREDICCIÓN DEL EFECTO DE MEZCLAS

Desde nuestro punto de vista, la falta de consenso y/o la diversidad de clasificaciones sobre la capacidad de perturbar el sistema endocrino por parte de las mezclas puede resultar desconcertante. Percibimos una tendencia de pensamiento que suele conducir a un pensamiento “polarizado” hacia dos posturas: *con actividad disruptora endocrina vs sin capacidad disruptora endocrina*, con la finalidad de “etiquetar” los compuestos o sus mezclas de forma categórica. No obstante, abogamos sobre la idoneidad de acompañar la información matizando y puntualizando sobre si la actividad se ejerce sobre receptores estrogénicos, androgénicos, receptor arilo hidrocarbano, receptores tiroideos (entre otros reguladores hormonales), e incluso profundizando en la actividad sobre cada uno de ellos, (agonista, antagonista del receptor, mecanismos genómicos o no genómicos, unión a proteínas etc.) (Kojima *et al.*, 2004). Por todo ello, creemos que la obtención de la máxima información posible permitiría consensuar criterios, evitando ambigüedades y confusiones, y así poder garantizar la extrapolación de un efecto concreto, en la medida de lo posible, a todo el sistema endocrino. Además, Silva *et al.* (2007) puntualizaron sobre la necesidad de aplicar tratamientos adecuados para cada situación experimental. Si bien es cierto, que cubrir todos los ámbitos citados es harto complicado para un mismo objetivo experimental.

Además de los condicionantes inherentes al diseño experimental que afectan a la interpretación y predicción de los resultados (sobretudo, en el caso de las mezclas), existen hándicaps debidos a las características intrínsecas de los disruptores endocrinos y de la regulación del sistema hormonal, que aumentan la complejidad de la interpretación de los resultados entre distintos estudios *in vitro*; pero también la extrapolación a otros sistemas de evaluación (tanto *in vitro* como *in vivo*) (Fang *et al.*, 2000; Vandenberg *et al.*, 2012; Zala y Penn, 2004). En este sentido, Kortenkamp (2007), indicó que la dificultad en la extrapolación a los sistemas *in vivo* venía condicionada por la propia idiosincrasia del sistema endocrino (Kortenkamp, 2007). La compleja regulación hormonal permite al individuo adaptarse a las variaciones del ambiente de forma más o menos rápida, dependiendo de las funciones y hormonas implicadas, desencadenando una respuesta concreta en función del estadio de desarrollo del individuo (Kortenkamp, 2007; Vandenberg *et al.*, 2013). Gracias a al complejo funcionamiento del sistema endocrino, el organismo es capaz de adaptarse a cada situación concreta en aspectos puramente biológicos (Kortenkamp, 2007). Sin embargo, ante los

xenobióticos (como puede ser la mezcla de sustancias que actúan por diferentes mecanismos de acción) el organismo es capaz de intentar subsanar los daños y, tan sólo cuando no lo logra, aparecen los efectos adversos (EFSA Scientific Committee, 2013; WHO/IPCS, 2002a). Sin olvidar que las características propias del individuo (edad, sexo, posibles déficits de expresión proteica etc.) juegan un papel fundamental en la respuesta final, dificultando aún más la extrapolación de efectos *in vitro* a *in vivo*, y la predicción de efectos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Futran *et al.*, 2015; Vandenberg *et al.*, 2012).

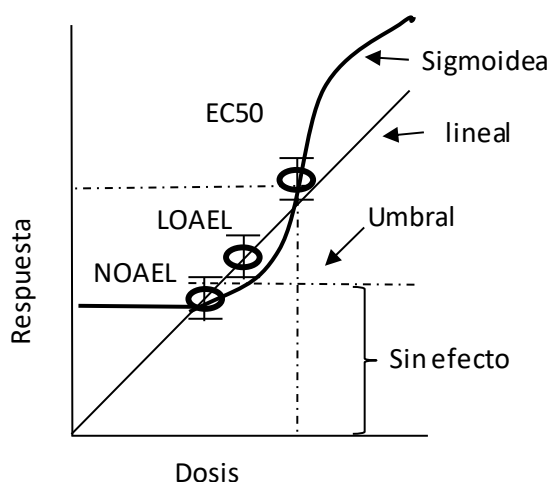
Puesto que se ha hecho mención a las características de los perturbadores endocrinos, conviene recordar las singularidades más destacadas que caracterizan a estos compuestos, mencionadas en la Parte II del Capítulo II:

- a) Los DE actúan por medio de más de un mecanismo de acción, como puede ser la capacidad de algunos de ellos, de interferir sobre receptores estrogénicos o androgénicos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).
- b) Algunos productos de degradación de los DE pueden mostrar características diferentes a las de sus compuestos originarios. Un ejemplo conocido es el agonista estrogénico DDT que se metaboliza a DDE, con capacidad antagonista androgénico (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).
- c) Los efectos detectados en el ambiente no son fácilmente reproducibles a nivel experimental, ni tampoco los datos recopilados *in vivo* experimentalmente son siempre los mismos que se puedan observar en ambientes no controlados (Zala y Penn, 2004).
- d) No siguen un patrón único dosis-respuesta o causa-efecto (Zala y Penn, 2004).
- e) No poseen una concentración basal que les catalogue como “seguros” a partir de la cual se den los efectos adversos. En no pocas ocasiones la curva dosis-respuesta se corresponde con una curva en forma de J, U o incluso una U invertida (Vandenberg *et al.*, 2012; Zala y Penn, 2004).

Precisamente las últimas dos características citadas podrían ser una pieza clave a la hora de entender los resultados obtenidos, tanto en la evaluación de compuestos simples como

de las mezclas. De ellas se extrae que la relación dosis–respuesta no se ajusta a los comportamientos aplicados tradicionalmente en toxicología, basados en los postulados de Paracelso (Repetto y Repetto, 2009). Según Paracelso, la diferencia entre un veneno y una sustancia inocua depende de la dosis. Esta afirmación ha sido un dogma incuestionado hasta hace poco más de una década, y sobre éste se basan los conceptos aplicados en la evaluación del riesgo “nivel sin efecto adverso observable” (por sus siglas en inglés, NOAEL), y el “nivel más bajo de efecto adverso observado” (LOAEL) (Calabrese y Baldwin, 2003; Lagarde *et al.*, 2015). Los modelos dosis-respuesta monotónicos se asientan en base a esta premisa, asumiendo que, a mayor dosis, mayor efecto, e implícitamente se acepta que por debajo de dicho umbral de seguridad, no aparecen efectos nocivos (Figura 77). A partir de estos modelos también se obtienen otros parámetros ampliamente aplicados en toxicología, como la “dosis letal 50” (DL50), “concentración efectiva 50” (EC50), o Concentración inhibitoria 50 (IC50), entre otros (Lagarde *et al.*, 2015). Este tipo de comportamiento de dosis-respuesta, basados en umbrales de seguridad y modelos lineales, se han aplicado para evaluar el riesgo de sustancias no carcinogénicas en el primer caso, y extrapolar los riesgos a dosis baja de carcinógenos en el segundo (Calabrese y Baldwin, 2003). No obstante, hay sustancias que no se ajustan a ninguno de estos dos tipos de respuestas, como los DE (Futran *et al.*, 2015).

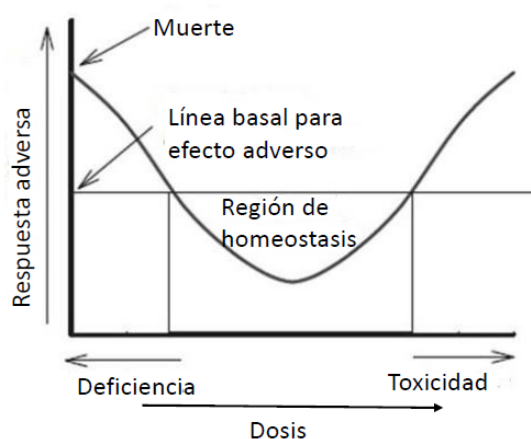
Figura 77. Ejemplos de dos tipos de curva dosis-respuesta monotónicos



Como consecuencia de este tipo de observaciones, en los últimos años se han incrementado el número de estudios que reflejan curvas de dosis-respuesta no monotónicas (NMCDR) para muchos compuestos, entre ellos, los disruptores endocrinos (Vandenberg *et*

al., 2013). Un ejemplo de este tipo de respuestas es la hormesis (Calabrese y Baldwin, 2003; McClellan, 2007) (Figura 78). El concepto de hormesis establece la aparición de efectos beneficiosos a dosis bajas, los cuales van disminuyendo con el aumento de la dosis (Calabrese y Baldwin, 2003; McClellan, 2007). De forma genérica, los procesos no monotónicos implican un cambio de sentido en la tendencia de respuesta, dentro del rango de concentraciones analizado (Lagarde *et al.*, 2015). Con frecuencia, los mayores efectos observados se producen a bajas y a elevadas dosis, siendo los niveles medios los más seguros (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Zala y Penn 2004). Por ello, se debe actuar con mucha cautela a la hora de evaluar el riesgo de exposición de este tipo de sustancias, evitando no abusar ni de los umbrales de seguridad ni de las modelos lineales. De no ser así, la extrapolación del efecto producido a bajas dosis podría exagerar sobremanera los efectos predichos (Zala y Penn, 2004).

Figura 78. Representación de hormesis. Adaptado de Ecobichon, 2005.



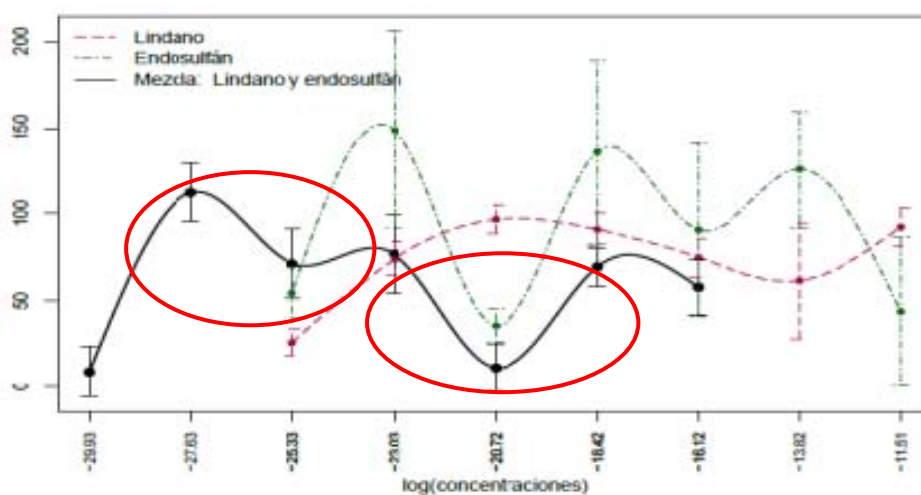
La evidencia del tipo de respuestas que no se ajustan a los modelos dosis respuesta monotónicos, abre la puerta a replanteamientos sobre lo adecuado de la obtención de los parámetros fundamentados a partir de este tipo de modelos clásicos dosis-respuesta (Lagarde *et al.*, 2015).

No obstante, la proliferación en los últimos años de artículos que describen el tipo de relación dosis-respuesta no monotónica (DRNM) basados principalmente en estudios *in vitro* (Lagarde *et al.*, 2015) es el argumento esgrimido por Lamb *et al.* (2014) para sostener que no se debería generalizar los procesos de DRNM en el ámbito de los disruptores endocrinos. Sin

embargo, también en este punto existe controversia, ya que Vandenberg (2012) recoge en su revisión la aparición de este tipo de respuestas en estudios con cultivos celulares, estudios *in vivo* y en estudios epidemiológicos.

Sirva, a modo de ejemplo, la respuesta de la mezcla binaria MB h/c/ en donde, en función de la concentración observada, la tendencia de los datos varía de sentido (tanto en la mezcla, como en su componente ciclodiénico), produciéndose una respuesta similar a distintas concentraciones, mientras se produce el efecto contrario a dosis intermedias Figura 79. Este tipo de curvas origina una respuesta que se suele representar en las gráficas con forma en el caso de la U o bien \cap), según se produzcan los mayores o los menores efectos en las concentraciones distales.

Figura 79. Fluctuaciones del sentido de la respuesta de la MB h/c/



Lagarde *et al.* (2015), recoge en su revisión varias hipótesis que podrían explicar las curvas dosis-respuesta no monotónicas. La hipótesis más apoyada aboga por la inducción de efectos opuestos a lo largo de la horquilla de concentraciones evaluadas (

Figura 80). Estos efectos podrían iniciarse por varios tipos de receptores o moléculas diana, que se activarían de forma diferenciada por la misma sustancia a determinadas concentraciones, pudiendo depender de la afinidad de los receptores diana por una molécula.

Figura 80. Mecanismo de relación NMDR inducido por pluralidad de receptores (Lagarde *et al.* 2015, con permiso del autor)

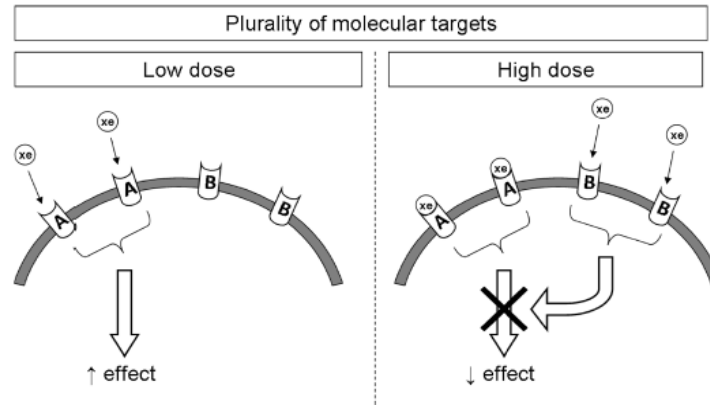


Figure 2 Mechanism of the NMDR relationship phenomenon induced by the "plurality of molecular targets". At low concentrations, EDC binds to the A receptors and induces the observed effect. At high concentrations, the A receptors are still activated and EDC binds to the B receptors, which induces the opposite effect, resulting in an NMDR. Notes: A = Receptor A; B = Receptor B; xe = xenobiotic (eg., EDC); affinity for A > B.

"Mecanismo de la relación de las dosis-respuesta no monotónica (NMDR) inducido por el fenómeno "plurality of molecular targets". A bajas concentraciones, los disruptores endocrinos (DE) se unen a los receptores A e inducen el efecto observado. A concentraciones elevadas el receptor A permanece activado y los DE se unen a los receptores B, induciendo el efecto opuesto, resultando una relación NMDR. Nota: A=receptor A; B= receptor B; xe=xenobiótico (como puede ser un DE); Afinidad por A > B"

Una segunda hipótesis es la regulación de feed-back del propio sistema hormonal, aunque en este proceso podrían intervenir otro tipo de componentes que contribuyeran a la respuesta de control negativa (Berga 2012; Costa-e-Sousa *et al.*, 2012).

Otra propuesta es la desensibilización de los receptores promovida por distintos mecanismos (como fosforilación de proteínas, endocitosis, represión de expresión de genes), que derivan en una menor expresión de la actividad de los receptores y una insensibilización de los tejidos o células diana a dosis elevadas, (Bouvier *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990), representado en la Figura 81 (Lagarde *et al.*, 2015).

Figura 81. Mecanismo de relación NMDR inducido por insensibilización de receptores (Lagarde *et al.* 2015, con permiso del autor)

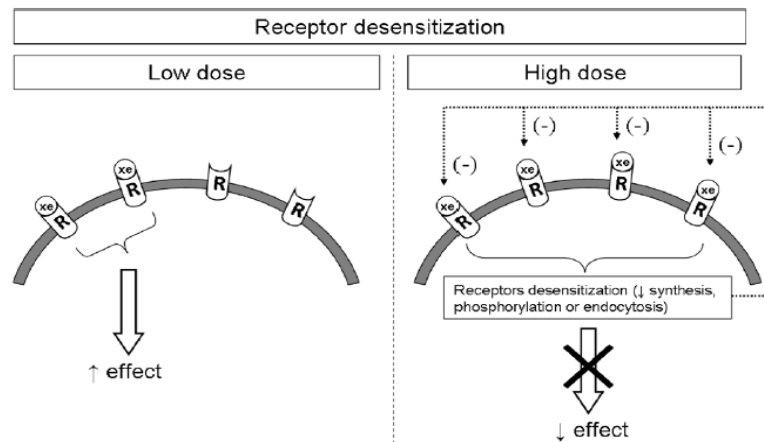


Figure 3 Mechanism of the NMDR phenomenon induced by “receptor desensitization”. At low concentrations, EDC binds to some receptors and induces the observed effect. At high concentrations, numerous receptors are bound, resulting in a down-regulation phenomenon characterized by receptor desensitization. Consequently, the intensity of the effect is decreased, resulting in an NMDR. Note: (-) = negative effect; R = receptor; xe = xenobiotic (e.g., EDC).

“A bajas concentraciones, los DE se unen a poco receptores e inducen el efecto observado. A concentraciones elevadas, muchas moléculas se unen a receptores provocando una regulación del fenómeno caracterizado por la insensibilización del receptor. A consecuencia, disminuye la intensidad del efecto, resultando un NMDR. Nota(-)= efecto negativo, R= receptor; xe= xenobiótico (por ejemplo, DE)”

También se ha propuesto que las relaciones dosis respuesta no monotónicas podrían deberse a modulaciones metabólicas (Andrade *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011) representado por Lagarde *et al.* (2015) en la Figura 82.

Figura 82. Mecanismo de relación NMDR inducido por efecto metabólico (Lagarde *et al.* 2015, con permiso del autor)

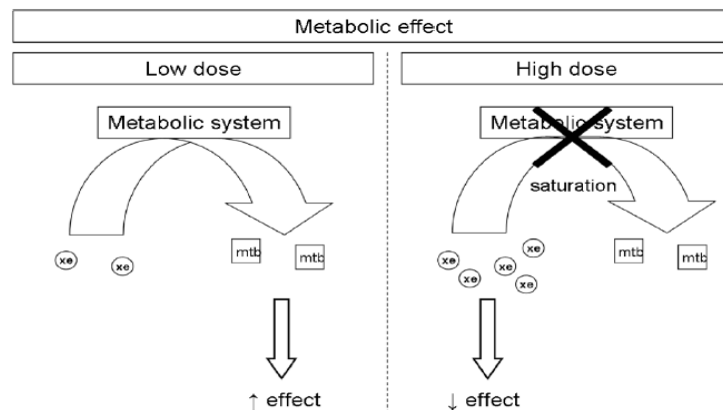


Figure 4 Mechanism of the NMDR relationship phenomenon induced by one of the “metabolic effect” hypotheses. At low concentrations, EDC is catalyzed into active metabolites that induce the observed effect. At high concentrations, the metabolic system is saturated, and the parent substance induces an opposite effect, resulting in an NMDR relationship. Note: Mtb = metabolite; xe = xenobiotic (e.g., EDC).

“A bajas concentraciones, los DE se catabolizan en metabolitos activos que inducen el efecto observado. A concentraciones elevadas, el sistema metabólico se satura, y la sustancia original induce el efecto opuesto, originando una relación de NMDR. Nota. Mtb= metabolito, xe= xenobiótico (por ejemplo, DE)”.

Finalmente, en la revisión de Lagarde también figura que este tipo de curvas podrían deberse a la modulación de la expresión de genes originado por la formación de dímeros entre distintos ligandos de receptores hormonales esteroideos (Maness *et al.*, 1998), esquematizado en la Figura 83 por Lagarde *et al.* (2015).

Figura 83. Mecanismo de relación NMDR inducido por combinación de ligandos (Lagarde *et al.* 2015, con permiso del autor)

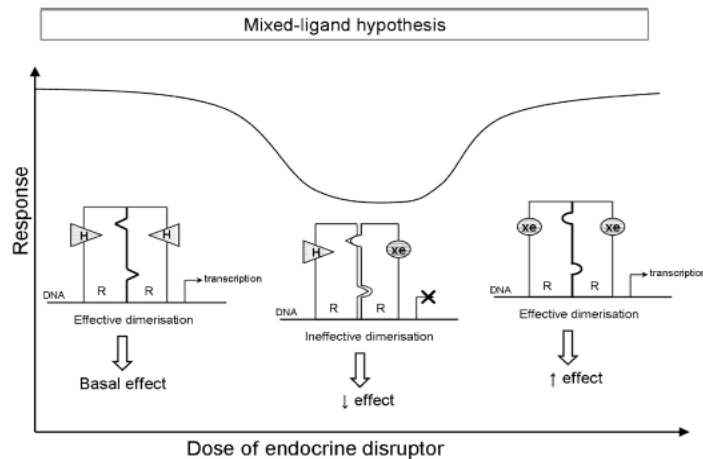


Figure 5 Mechanism of the NMDR relationship phenomenon induced by the “mixed-ligand” hypothesis. At low concentrations, the EDC binds to the hormone receptor and forms mixed-ligand dimers that block endogenous hormone activity. At high concentrations, dimers of EDCs are more likely to form and induce a response. Note: H= endogenous hormone; R= hormone receptor; xe= xenobiotic (e.g., EDC).

“A concentraciones bajas, los DE se unen al receptor hormonal y los ligandos forman dímeros que bloquean la actividad de la hormona endógena. A elevadas concentraciones, los dímeros de DE forman dímeros más efectivos e inducen la respuesta. Nota. H= hormona endógena, R= receptor hormonal, xe= xenobiótico (por ejemplo, DE)”

Las curvas dosis respuestas no monotónica (CDRNM) se presume para aquellos compuestos que requieren de la unión a receptores (Vandenberg *et al.*, 2013), como son las hormonas. Pero se ha de tener en cuenta que la magnitud de la respuesta endocrina varía en función de la ocupación de receptores, ocupación que no sigue un patrón lineal con la concentración hormonal presente. Así, un incremento de la concentración a dosis bajas es capaz de desencadenar una respuesta de mayor intensidad en relación a la que se puede

observar tras el mismo incremento partiendo de concentraciones más elevadas (Welshons *et al.*, 2003). Tampoco parece existir una relación líneal entre la ocupación de receptores y el efecto biológico, puesto que se puede producir cambios biológicos intensos a dosis bajas (May *et al.*, 1967).

Toda esta información recopilada sobre las particularidades de la respuesta del sistema endocrino podría explicar el origen de que en nuestros resultados no se aprecie un patrón único de respuesta, ni tampoco un efecto líneal o exponencial dosis-respuesta. Además, y aludiendo nuevamente a los factores que dificultan la comparación de información entre estudios, y en concreto, los factores relativos a selección de concentraciones (tanto en número, como el concepto no bien determinado de “dosis bajas”), Calabrese y Baldwin (2000) apuntan que *“la mayoría de estudios de toxicología publicados “en abierto” referentes a mamíferos estudian muy pocas dosis, y tan sólo el 2% de éstos evalúan más de 6 dosis, y de éste porcentaje, el 10% estudia tres o más concentraciones por debajo de valores de NOAEL [...]”*. También Vandenberg *et al.* (2013) destacaron la importancia de evaluar un amplio rango de concentraciones. En este artículo, los autores defienden la idea de que se puede detectar NMDRC con, al menos, seis dosis, por lo que se podría subestimar la aparición de este tipo de respuestas en la literatura científica. Cabe recordar en este punto, que en el presente trabajo se estudian siete concentraciones en cada ensayo. Los citados autores continúan reflexionando sobre este suceso, indicando que al no detectarse respuestas NMDRC, con frecuencia se asigna ausencia de relación dosis-respuesta en los estudios publicados (Vandenberg *et al.*, 2013).

2.¿PREDICCIÓN DEL EFECTO DE LAS MEZCLAS?

A raíz de los resultados obtenidos, y a la luz de la información consultada sobre las particularidades tanto del sistema endocrino como de los denominados disruptores endocrinos, junto con la falta de consenso a la hora de aplicar determinados conceptos y metodologías, consideramos adecuado que, para poder extraer conclusiones sólidas sobre las hipótesis planteadas es necesario realizar ensayos específicos, dirigidos a evaluar las afinidades sobre cada tipo de receptor, el nivel de expresión génica de cada uno, y evaluarlo en las mezclas, entre otras posibilidades. En esta tesis se ha comprobado el efecto final de la exposición partiendo del estudio previo de los componentes empleados, pero para poder

extraer conclusiones sobre el porqué de dicho resultado se deberían completar con trabajos a nivel molecular para indagar en otro nivel de conocimiento que permita afianzar la información predicha, y que pueda ser extrapolada con suficiente criterio a otro tipo de situaciones. Los ensayos realizados con la metodología *E-Screen* para valorar el resultado final de un efecto no es irrelevante, más bien al contrario, es fundamental para ir completando “las piezas del puzle” y poder realizar una adecuada evaluación del riesgo ante la exposición a contaminantes.

No abundan los estudios donde se evalúe un rango de concentraciones realmente amplio, no siendo extraño se centren en escasas concentraciones, incluso donde se analice tan sólo una, a diferencia de las siete concentraciones analizadas en nuestro trabajo (Calabrese y Baldwin, 2000). Por ello, no existen datos de respuesta para un espectro realmente amplio para muchos compuestos y/o mezclas que puedan arrojar más luz sobre efectos a concentraciones muy diluidas, y, sobre todo, sus interacciones con otros compuestos. Tras observar en nuestros resultados que en un relativo estrecho rango de molaridades se desarrolla una respuesta tan singular, y tras valorar la información aportada por otros autores respecto a ello, especialmente sobre las curvas dosis respuesta no monotónicas, las cuales son más frecuentes en compuestos cuyo efecto se deriva de la unión a receptores (Calabrese y Baldwin, 2003; Vandenberg *et al.*, 2013), consideramos que no estamos en posición de aseverar que la concentración inmediatamente anterior/posterior se comportará de un modo predecible respecto la seleccionada. Por tanto, nos cuestionamos si resulta apropiado por nuestra parte aventurarnos en la predicción de los efectos de esas mismas combinaciones u otros productos a otras concentraciones si, en condiciones experimentales, donde se controlan todos los parámetros posibles, es harto complejo obtener datos que permitan cuantificar los efectos esperados.

Es necesario incrementar el conocimiento sobre la exposición a compuestos estrogénicos, para profundizar en un mayor conocimiento de los posibles efectos. Se debe conjugar este requerimiento con las limitaciones que este tipo de trabajo conlleva al ser consciente de la falta de información de partida, y mantener la prudencia en las conclusiones (Evans *et al.*, 2012). La cautela se debe extender más allá si se pretende predecir efectos en el ambiente, y valorar la posibilidad de que la presencia de contaminantes (y en nuestro caso, perturbadores del sistema hormonal) no implica

necesariamente una absorción de éstos por parte de los organismos, ni la aparición de efecto (Furio *et al.*, 2015). A pesar de la complejidad del diseño de estudios basados en exposición ambiental real, es necesario profundizar en ello y rediseñar los estudios que permitan obtener resultados sólidos y fiables (Evans *et al.*, 2012)

Por ello, tras analizar profundamente los datos y consultar numerosos artículos sobre mezclas y sobre predicción de las mismas, desestimamos el objetivo número tres planteado en esta tesis “Predecir el efecto de las mezclas en función de los resultados previos del estudio de sus integrantes, respecto a la concordancia de los datos obtenidos”.

Esta línea de pensamiento que aboga por no pretender predecir el efecto cuantitativo de las mezclas, acertada o no, ya ha sido planteada por Kortenkamp (2007) en su revisión. En ella se expone las tendencias en investigación sobre disrupción endocrina, objetando sobre las ideas pre-establecidas, muchas veces, sin una base bien fundada o cercana a la realidad. Como se indica al inicio, en la literatura científica es posible hallar información contradictoria que, en ocasiones, solo aportan datos difíciles de aunar. Cuestiones como la sobreestimación de los efectos de las mezclas, la imposibilidad de detectar modulaciones de efecto mediante las aplicaciones estadísticas usuales, la falta de precisión a la hora de establecer el concepto de “dosis bajas” (y por tanto, imposibilidad de conocer si los resultados son comparables), errores en la aplicación del concepto de aditividad en toxicología (el cuál no es equivalente al concepto matemático, con los consiguientes errores en los modelos predictivos), ambigüedad en la clasificación del potencial disruptor (equiparando erróneamente un compuesto antiproliferativo por unirse al receptor ER β con antiestrogenicidad, por ejemplo), o el diseño de mezclas basados en grupos concretos de compuestos (por ejemplo, con el mismo mecanismo de acción) que no se ajustan a las exposiciones reales, han hecho que nos reafirmemos en nuestra postura. Además, Kortenkamp (2007) aboga por investigar efectos de mezclas, sin discriminar por mecanismos concretos de acción, para valorar cualitativamente el efecto, pero no pretender una predicción cuantitativa. A partir de la información obtenida, se deberían realizar estudios de expresión genómica y proteómica, que sirvan de sustento para ir rediseñando futuros ensayos que permitan acercarse más a la realidad (Kortenkamp, 2007), junto con las nuevas técnicas de imagen, los ensayos automatizados y la bioinformática (Futran *et al.*, 2015).

De forma similar, Colborn (2004) reflejó la necesidad de reconducir los diseños experimentales y replantear la aplicación de algunos conceptos tradicionalmente aceptados, a tenor de las evidencias detectadas sobre disrupción endocrina en los últimos años. Entre sus argumentos, destacó la evidencia de que existen xenobióticos capaces de inducir una respuesta estrogénica o androgénica sin necesidad de unirse a sus receptores específicos, por lo que muchos compuestos podrían pasar inadvertidos como disruptores endocrinos al ser evaluados por este tipo de técnicas concretas.

A la luz de estas y otras evidencias comentadas, en los últimos años existe un debate intenso en la comunidad científica acerca de la idoneidad de aplicar las metodologías y parámetros habituales para realizar las evaluaciones del riesgo de las sustancias químicas, y sobre cómo replantear los diseños experimentales para que sean más acordes con la realidad, y evitar así tanto crear alarmas innecesarias, como falsa sensación de seguridad (Futran *et al.*, 2015). En cualquier caso, desajustes alejados de la realidad (Lagarde *et al.*, 2015; Vandenberg *et al.*, 2013; Zala y Penn, 2004).

Toda esta disertación no implica que el estudio planteado en esta tesis, y sus resultados, no sean adecuados o no tengan utilidad. Más bien al contrario, puesto que comulgan con la idea de la necesidad de seguir indagando en el estudio del efecto de las mezclas fundamentalmente, a tenor de la complejidad del asunto, y de los desajustes con la realidad que se podrían estar produciendo al indicar que se esperan determinados efectos tras la exposición concreta de un producto/mezcla (Colborn, 2004; Kortenkamp, 2007). Del mismo modo, también es importante seguir en la línea de estandarización los ensayos *in vitro* bajo unas mínimas premisas para el abordaje de efectos concretos a estudiar (Evans, 2012; Futran *et al.*, 2015). Ello permitiría obtener unos resultados que puedan ser comparables de manera más fehaciente entre laboratorios diferentes, a pesar de trabajar con productos o ciertas condiciones distintas (Vandenberg *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos pueden ser punto de partida, o punto y seguido, para otros estudios en los que seguir analizando la problemática bajo condiciones *in vitro*, y tras la obtención de nuevos resultados, poder plantear la necesidad de desarrollar estudios *in vivo* que complementen la recolección de resultados a varios niveles si se estimase necesario. Así, se podría evaluar si la predicción de efectos obtenida en un ensayo *in vitro* se corresponde

con la obtenida en otros experimentos y, a partir de dicha información, trasladar la predicción a estudios *in vivo* que permitan evaluar el riesgo a la exposición de determinadas mezclas en el medio ambiente. Es necesario seguir investigando, precisamente por esta falta de información de estudios basados en hallazgos de muestras de campo, como es el caso de datos de proporciones halladas en sangre de rapaces del sur-sudeste español, de donde se fundamenta la presente tesis.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS INDIVIDUALES Y SUS MEZCLAS EN CONJUNTO

En este último apartado se pretende aunar los aspectos más relevantes de los resultados de los análisis de los OC por individualizado y sus mezclas desde una perspectiva global. Con ello se pretende unificar los resultados que han sido presentados en capítulos distintos, con el fin de dar una visión conjunta de los resultados de este trabajo. No se pretende entrar al detalle en los resultados, sino destacar aquellos aspectos que consideramos que pueden tener relevancia valorar conjuntamente.

Para la determinación de la capacidad proliferativa (relacionada con el carácter estrogénico de las sustancias), se evaluaron 18 organoclorados (4 difenilalifáticos, 8 ciclodiénicos, 2 HCH y 4 PCB) en un rango de diluciones seriadas comprendida entre $1,0E^{-5}M$ hasta $1,0E^{-11}M$. Se seleccionaron 6 de ellos para combinarlos entre sí y valorar la proliferación en el mismo número de concentraciones ligeramente más diluidas, abarcando desde $1,0E^{-6}M$ hasta $1,0E^{-13}M$, dependiendo de la mezcla. De este modo, se diseñaron 4 mezclas binarias, 2 ternarias, una cuaternaria y otra senaria, combinando endosulfán $\alpha\beta$, aldrín, dieldrín, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE y lindano técnico en distintas proporciones. En todos los análisis los efectos proliferativos se cotejaron con el control positivos 17β -estradiol $1E^{-9}M$.

Se observó que las molaridades intermedias dieron lugar a un mayor efecto proliferativo ($1,0E^{-10}M$, $1,0E^{-11}M$ y $1,0E^{-8}M$.) Este fenómeno fue más evidente en los análisis individualizados que en las mezclas (Figura 49, Figura 60 y Figura 70). Sin embargo, no se apreció una curva dosis respuesta lineal, ni exponencial en ningún caso. Observamos que un mismo efecto podría resultar muy similar a otro desencadenado a concentraciones no sucesivas, apareciendo un efecto contrario en las molaridades intermedias. Esta tendencia en las respuestas se manifestó más intensamente en los 18 compuestos analizados, puesto

que el efecto de las mezclas resultó ser inferior, diluyéndose el efecto al disminuir la intensidad proliferativa.

La aparición de valores similares a lo largo de la horquilla de concentraciones evaluadas implica que, en función de la concentración observada, el compuesto/mezcla se cataloga como fuerte, parcial o débilmente estrogénico. Por ello, consideramos que es necesario pormenorizar la intensidad proliferativa de todo el rango analizado, y no sólo destacar el máximo efecto detectado, ya que podrían aparecer efectos importantes a otras molaridades, aunque no sean los máximos posibles para ese compuesto/mezcla.

Del mismo modo, consideramos que también se debe prestar atención a los valores que estén por debajo del control negativo y analizar las causas de esa respuesta. Estos valores negativos aparecen en los extremos de la horquilla de concentraciones analizada, siendo menos intensos y frecuentes en el caso de las mezclas. Es frecuente detectar un abanico amplio de respuestas en la batería de concentraciones de un compuesto/mezclas, aunque esta amplitud de efecto es más evidente en los análisis individualizados.

Si se analizan todos los ensayos como un único grupo, detectamos que en el 70% de los casos se observaron resultados fuertemente estrogénicos. Si bien es cierto, que tan sólo se analizaron 8 mezclas, frente a 18 OC individuales. Así, atendiendo únicamente a las mezclas, el efecto mayoritario resultó ser parcialmente estrogénico.

También es patente el mayor efecto proliferativo desencadenado por los compuestos por separado, que por sus mezclas. Estas apreciaciones también han sido manifestadas por otros autores, por lo que nuestra hipótesis inicial sobre el mayor efecto en las mezclas, no se corroboró.

Se han publicado varias hipótesis que podrían explicar el menor efecto observado en las mezclas. Curiosamente, la disminución del efecto final de la mezcla conformada por productos con elevada actividad proliferativa fue la tónica predominante, incluso en aquellas que estaban representadas mayoritariamente por compuestos parcial o fuertemente estrogénicos dieron lugar, en algunas ocasiones, a efectos menores (ver figura 75 y 76). Implícitamente se desprende que el porcentaje que representa cada compuesto en la mezcla

no es determinante sobre la respuesta observada, siendo más importante el mecanismo de acción de los compuestos, al menos, en los porcentajes empleados en nuestros ensayos.

La información de la que disponemos sobre la curva dosis-respuesta no parece asegurar una predicción fiable del efecto, debido a la aparición de efectos iguales o similares a concentraciones no consecutivas alternadas de efectos contrarios. Por ello, se desestimó el objetivo sobre la predicción del efecto de las mezclas.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. El ciclodiénico aldrín resultó ser el compuesto que mayor proliferación indujo de todos los análisis realizados en este trabajo. Asimismo, destaca que el cien por cien de los ciclodiénicos analizados se clasifican como fuertemente estrogénicos, al mismo tiempo que el endrín aldehído y endosulfán sulfato (últimos metabolitos analizados del aldrín y endosulfán respectivamente), fueron los responsables de la menor respuesta estrogénica. Sin embargo, no debe asumirse como los compuestos más seguros, puesto que también provocaron menor crecimiento que el control negativo.
2. Los cuatro compuestos difenilalifáticos analizados (p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD y dicofol) presentaron, al menos, una concentración con efecto proliferativo relativo catalogado como fuertemente estrogénico. Incluso, el p,p'-DDT y el p,p'-DDD desencadenaron mayor proliferación que el estradiol ($1,0E^{-9}M$), por lo que la actividad estrogénica ha de ser siempre considerada en los riesgos potenciales de la exposición a este grupo de pesticidas
3. Los hexaclorociclohexanos deben ser también considerados en la evaluación de efectos estrogénicos. Aunque la respuesta proliferativa máxima del lindano no alcanzó el 50%, el lindano técnico mostró un carácter estrogénico fuerte, cercana al 100%. Este efecto del lindano técnico debe considerarse también en sus mezclas binarias con endosulfán y difenilalifáticos; con los que muestran, al menos, moderado efecto proliferativo.
4. Por su parte, el grupo de los bifenilos policlorados (PCB) desencadenaron las respuestas más opuestas de todos los análisis realizados, a excepción del PCB 153, que presentó valores más constantes. Resultaron fuertemente estrogénicos el congénere PCB 118 y el PCB 153, seguidos del PCB 180; mientras que el PCB 126 originó la menor respuesta estrogénica, caracterizándose también por presentar el mayor número de concentraciones con valores por debajo del control negativo de todo el grupo químico.
5. La evaluación de las mezclas demostró que la exposición a concentraciones muy diluidas es capaz de inducir efectos proliferativos elevados, como sucede en el caso de la mezcla binaria lindano técnico/endosulfán $\alpha\beta$ (MB h/c), evidenciándose así la importancia de estudiar amplios rangos de concentración, que abarquen concentraciones muy diluidas.

6. El rango de concentraciones que con mayor frecuencia derivó en la máxima respuesta proliferativa fue $1,0E^{-10}M$, $1,0E^{-11}M$ y $1,0E^{-8}M$, tanto en el caso del estudio de las mezclas como en el estudio de sus componentes individualizados. Mientras que, en los análisis individualizados, la concentración más elevada, $1,0E^{-5}M$, no indujo la máxima respuesta en ningún caso.
7. El 70% del total de los ensayos se caracterizaron por un fuerte carácter estrogénico, el 20% por ser parcialmente estrogénicos, y el 10% restante al ser débilmente estrogénico. Destacando el resultado de las mezclas, que originaron una proliferación menos intensa que los productos analizados individualmente, ya que en este último grupo no se detectaron efectos débilmente estrogénicos.
8. En el resultado de las mezclas prima la interacción entre los distintos mecanismos de acción por el que cada compuesto interfiere en la función estrogénica, con independencia del porcentaje en el que cada organoclorado esté representado en la mezcla. Por ello, la presencia mayoritaria de un compuesto fuertemente proliferativo no garantiza un efecto de la misma intensidad si se combina con otro compuesto que, aunque esté en menor porcentaje, interfiere en la función estrogénica más eficientemente mediante otros mecanismos que den lugar a un efecto de signo contrario.
9. Se han detectado interacciones entre compuestos que parecen condicionar el efecto final de las mezclas. Así, el *p,p'*-DDE parece modular el efecto de las mezclas hacia una menor proliferación celular, con independencia del porcentaje en el que esté representado en la misma. De forma similar, la combinación de lindano técnico con endosulfán (50:50) y lindano técnico con los difenilalifáticos *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE (75:12,5:12,5) se deriva un efecto estrogénico, como mínimo, parcialmente estrogénico.
10. Los resultados de este trabajo aportan luz sobre el efecto estrogénico inducido por la exposición a organoclorados y diferentes mezclas ambientalmente posibles; sin embargo, es preciso profundizar aún más en los potenciales efectos estrogénicos de las mezclas y los mecanismos que los explican.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2002. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005. Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and Delta-Hexachlorocyclohexane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological profile for Heptachlor and Heptachlor Epoxide. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2015. Toxicological profile for Endosulfan. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
5. Aldridge, W.N., Miles, J.W., Mount, D.L., Verschoyle, R.D. 1979. The toxicological properties of impurities in malathion. *Archives of Toxicology* 42: 95–106.
6. Andersen, H.R., Andersson, A.-M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jørgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., LeVers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkebæk, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M., Grandjean, P. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 107 (1): 89–108.
7. Andersen, R.H., Vinggaard, A.M., Rasmussen, H.T., Gjermandsen, I.M., Bonefeld-Jørgensen, E.C. 2002. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179:1-12.
8. Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP):

- non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227:185–92.
9. Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1276-90.
 10. ATCC (American Type Culture Collection). 2017, recuperado de <http://www.lgcstandards-atcc.org>
 11. Aubé, M., Larochelle, C., Ayotte, P. 2008. 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) disrupts the estrogen-androgen balance regulating the growth of hormone-dependent breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 10 (1) pp. R16
 12. Aubé, M., Larochelle, C., Ayotte, P. 2011. Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environmental Research* 111: 337-347.
 13. Baker Jr., E.L., Warren, M., Zack, M., Dobbin, R.D., Miles, J.W., Miller, S., Alderman, L., Teeters, W.R. 1978. Epidemic malathion poisoning in Pakistan malaria workers. *Lancet* 1: 31–34.
 14. Baraibar-Fentanes, J., Olsson, H., Sokull-Klüttgen, B. 2009. European List of Notified Chemical Substances. EUR-Scientific and Technical Research Series VI, pp 239.
 15. Bayoumi, A.E., García-Fernández, A.J., Ordóñez, C., Pérez-Pertejo, Y., Cubría, J.C., Reguera, R.M., Balaña-Fouce, R., Ordóñez, D. 2001. Cyclodiene organochlorine insecticide-induced alterations in the sulfur-redox cycle in CHO-K1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 130(3): 315-323.
 16. Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G. 1995. Steroid hormone receptor: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857.
 17. Berga, S., Naftolin, F. 2012. Neuroendocrine control of ovulation. *Gynecological Endocrinology* 28 (1): 9–13.

18. Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., 2013. State of the Science: Endocrine Disrupting Chemicals - 2012, Summary for Decision Makers.
19. Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., 2013. State of the Science: Endocrine Disrupting Chemicals - 2012, Summary for Decision Makers. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 2013. <http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/>
20. Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(8): 2496–2500.
21. Bonefeld-Jorgensen, E.C., Autrup, H., Hansen, J.C. 1997. Effect of toxaphene on estrogen receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 18 (8): 1651–1654.
22. Bouvier, M., Collins, S., O'Dowd, B.F., Campbell, P.T., de Blasi, A., Kobilka, B.K., MacGregor, C., Irons, G.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1989. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *Journal of Biological Chemistry* 264 (28):16786–92.
23. Briz, V., Molina-Molina, J.-M.M., Sánchez-Redondo, S., Fernández, M.F., Grimalt, J.O., Olea, N., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C. 2011. Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicological Sciences* 120 (2): 413-27.
24. Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R. 1986. The Decline of the Gastropod *Nucella Lapillus* Around South-West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66 (3): 611.

25. Byrne *et al.*, 2009. Persistent Organic Pollutants in the Arctic: Report for the Delegates of the 4th Conference of the Parties Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Anchorage, AK: Community Action on Toxics.
26. Calabrese, E., Baldwin, L. 2000. The marginalization of hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 19: 32-40.
27. Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421: 691-692.
28. Caza, C., Bailey, T. 2000. Persistent Organic Pollutants (POPs) and Obsolete Pesticide Stocks -A Background Paper: Canadian International Development Agency (CIDA), recuperado de <http://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/2078804.pdf>, visitado el 08.04.18.
29. Cedergreen, N. 2014. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE* 9 (5) (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>).
30. Chakraborty, T., Katsu, Y., Zhou, L.Y., Miyagawa, S., Nagahama, Y., Iguchi, T. 2011. Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: An *in vitro-in vivo* correlation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 123: 115-121.
31. Chan, H.J., Petrossian, K., Chen, S. 2016. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and – resistant breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 161:73-83.
32. Charles, G.D., Gennings, C., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B.B., Carney, E.W. 2002. An approach for assessing estrogen receptor-mediated interactions in mixtures of three chemicals: A pilot study. *Toxicological Sciences* 68: 349-360.

33. Chen, I., Hsieh, T., Thomas, T., Safe, S. 2001. Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization. *Gene* 262: 207-214.
34. Colborn, T. 2004. Commentary: setting aside tradition when dealing with endocrine disruptors. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 45: 394-400.
35. Costa-e-Sousa RH, Hollenberg AN. 2012. Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 153 (9):4128–4135.
36. CREM (Centro Regional Estadístico de Murcia). 2014, recuperado de <http://econet.carm.es> visitado el 10.10.2017.
37. Das, P., Shaik, A., Jamil, K. 2007. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health* 23: 449-458.
38. Decisión 2006/507/CE del Consejo, de 14 de octubre de 2004, relativa a la celebración, en nombre de la Comunidad Europea, del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. *DOUE--L- 209, 31.7.2006, pp. 1-2.*
39. Decisión 2006/730/CE del Consejo, de 25 de septiembre de 2006, relativa a la aprobación, en nombre de la Comunidad Europea, del Convenio de Rotterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional. *DOUE-L 299 de 28.10.2006, pp.23-25.*
40. Decisión 93/98/CEE del Consejo, de 1 de febrero de 1993, relativa a la celebración en nombre de la Comunidad, del Convenio para el control de la eliminación y el transporte transfronterizo de residuos peligrosos (Convenio de Basilea) *DOUE-L-074 de 17.03.1994, pp. 0052 – 0052.*

41. Denizot, F., Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89: 271-277.
42. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A. M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30: 293-342.
43. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas DO-L-327 de 22.12.2000, pp. 0001 – 0073.
44. Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del consejo de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas DO- L-309/71. 24.11.2009, pp. 71- 86.
45. Directiva 2009/31/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa al almacenamiento geológico de dióxido de carbono y por la que se modifican la Directiva 85/337/CEE del Consejo, las Directivas 2000/60/CE, 2001/80/CE, 2004/35/CE, 2006/12/CE, 2008/1/CE y el Reglamento (CE) no 1013/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo DO-L-140 de 5.6.2009, pp. 114-135.
46. Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de noviembre de 2010, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación) DOUE- L- 334 de 17.12.2010, pp, 17 a 119.
47. Directiva 83/131/CEE de la Comisión, de 14 de marzo de 1983, por la que se modifica el Anexo de la Directiva 79/117/CEE del Consejo relativa a la prohibición de la puesta en el mercado y la utilización de los productos fitofarmacéuticos que contienen determinadas sustancias activas DOCE-L- 091 09.04.1983, pp.35-35.
48. Ecobichon, D.J.2005. Efectos tóxicos de los pesticidas (Moreno, E.MJ., Sánchez, C.P Trad). En: Klaassen, C.D., Watkins III, J.B. (autores) Casarett y Doull. Fundamentos de

Toxicología. McGraw-Hill Interamericana, Madrid (obra original publicada en 2003), pp. 339-353.

49. Environmental Protection Agency. 2017. *What is the Endocrine system?*, recuperado de <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-system> el 12.05.2018.
50. Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W. 2016. Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25: 777-801.
51. Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J. 2014a. Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environmental Research* 129: 59-68
52. Espín, S., Martínez-López, E., León-Ortega, M., Martínez, J.E., García-Fernández, A.J. 2014b. Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environmental Research* 131:134-144
53. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. 2013. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal* 11 (3): 3132. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3132
54. Evans, R.M., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Additive mixture effects of estrogenic chemicals in human cell-based assays can be influenced by inclusion of chemicals with differing effect profiles. *PLoS ONE* 7 (8) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043606>
55. Evans, T.J. 2012. Reproductive toxicity and endocrine disruption. En: Gupta R.C (Eds) *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* (2nd). Academic Press, pp. 278-318.

56. Facemire, C.F., Gross, T.S., Guillette, L.J, 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environmental Health Perspectives* 103 (4): 79-86.
57. Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N. V., Sheehan, D.M. 2000. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. *Environmental Health Perspectives* 108: 723-729.
58. Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Valotaire, Y. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 15:143-151
59. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. *Programa Africano de Existencias de Plaguicidas Obsoletos*, recuperado de <http://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/africa-program/es/>, visitado el 15.09.2017
60. Furio, M., Bernardes, F., Pazin, M., Pereira, L.C., Dorta, D.J. 2015. Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. En: Andrezza A Scola G, (Eds), *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*. Intechopen, pp. 195:234. DOI: 10.5772/58714
61. Futran Fuhrman, V., Tal, A., Arnon, S. 2015. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials* 286: 589-611.
62. Gaido, K., Dohme, L., Wang, F., Chen, I., Blankvoort, B., Ramamoorthy, K., Safe, S. 1998. Comparative estrogenic activity of wine extracts and organochlorine pesticide residues in food. *Environmental Health Perspectives* 106 (6): 1347-1351
63. Gale, W. L., Patino, R., and Maule, A. G. (2004). Interaction of xenobiotics with estrogen receptors alpha and beta and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 136: 338-345.

64. García-Fernández A.J, María-Mojica P. 2000. Contaminantes ambientales y su repercusión sobre la fauna silvestre. En: Fernández, F., Pablos, M.V., Tarazona, J.V (Eds), Globalización Medioambiental. Perspectivas Agrosanitarias y Urbanas. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, pp. 215–227.
65. García-Fernández A.J. 2014. Ecotoxicology, Avian. En: Wexler P (Ed.) Encyclopedia of Toxicology, 3rd edition, vol. 2., Academic Press, pp. 289-294.
66. García-Fernández, A., Calvo, J., Martínez-López, E., María-Mojica, P., Martínez, J.E. 2008. Raptor Ecotoxicology in Spain: A Review on Persistent Environmental Contaminants. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. Royal Swedish Academy of Sciences. 37: 432–439.
67. García-Fernández, A.J., Bayoumi, A.E., Pérez-Pertejo, Y., Motas, M., Reguera, R.M., Ordóñez, C., Balaña-Fouce, R., Ordóñez, D. 2002. Alterations of the glutathione-redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 13: 365-373.
68. García-Fernández, A.J., Espín, S., Martínez-López, E, 2013. Feathers as a biomonitoring tool of polyhalogenated compounds: A review. *Environmental Science and Technology* 4: 3028-3043.
69. Ghayee, H.K., Auchus, R.J. 2007. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 8: 289-300.
70. Giesy, J.P., Feyk, L.A., Jones, P.D., Kannan, K., Sanderson, T. 2003. Review of the effects of endocrine-disrupting chemicals in birds. *Pure and Applied Chemistry* 75:11-12.
71. Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., Espín, S., Jiménez, P., María-Mojica, P., Pérez-García, J.M., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J. 2016. Haematocrit and blood biochemical parameters in free-living Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) from Southeastern Spain: study of age and sex differences. *European Journal of Wildlife Research* 62: 557-564.

72. Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., García-Fernández, A.J., Zweers, A.J., van den Brink, N.W. 2012. Organohalogen exposure in a Eurasian Eagle owl (*Bubo bubo*) population from Southeastern Spain: Temporal-spatial trends and risk assessment. *Chemosphere* 88: 903-911.
73. Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., María-Mojica, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J. 2011. Blood lead levels and δ -ALAD inhibition in nestlings of Eurasian Eagle Owl (*Bubo bubo*) to assess lead exposure associated to an abandoned mining area. *Ecotoxicology* 20: 131-138.
74. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139.
75. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J. 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-1154.
76. Grünfeld, H., Bonefeld-Jorgensen, E. 2004. Effect of *in vitro* estrogenic pesticides on human oestrogen receptor α and β mRNA levels. *Toxicology Letters* 151: 467-480.
77. Guillette, E.A. 2000. A broad-based evaluation of pesticide-exposed children, *Central European Journal of Public Health* 8: 58-59.
78. Guillette, L.J. 2000. Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth hormone & IGF research: Official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 10 (B), S45-50.
79. Guillette, L.J. 2006. Endocrine disrupting contaminants-beyond the dogma. *Environmental Health Perspectives* 114: 9-12.
80. Guillette, L.J., Brock, J.W., Rooney, A.A., Woodward, A.R. 1999. Serum concentrations of various environmental contaminants and their relationship to sex steroid concentrations and phallus size in juvenile American alligators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 447-55.

81. Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102: 680-8.
82. Gustafsson, J. A, Warner, M., 2000. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74: 245-8.
83. Heagele, M.A., Hudson, R.H., 1977. Reduction of courtship behavior induced by DDE in male ring turtle doves. *Wilson Bull* 89: 593-601.
84. Helle Raun Andersen, Anne Marie Vinggaard, Thomas Høj Rasmussen, Irene Marianne Gjermansen, and E.C.B.-J. 2007. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity *in vitro* Helle. *Journal of Communicable Diseases* 39: 159-163.
85. Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O. 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology* 307: 136-145.
86. Horiguchi, T., Kojima, M., Hamada, F., Kajikawa, A., Shiraishi, H., Morita, M., Shimizu, M. 2006. Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. *Environmental Health Perspectives*.
87. <http://www.wikipedia.org>
88. Imazaki, P.H., Brose, F., Jauniaux, T., Das, K., Muller, M., Scippo, M.L. 2015. Estrogenic evaluation and organochlorine identification in blubber of northsea harbour porpoise (*phocoena phocoena*) stranded on the northsea coast. *BioMed Research International*, pp. 13.
89. Iris, Plan.Estratégico. 2017. Mesa vertical de complejo agroalimentario Región de Murcia (2014-2020). Comunidad Autónoma de la Región de Murcia

90. Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32: 2498-2506
91. Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., Van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G. 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114, 32-39.
92. Jones, K.A. 1996. Summation of basic endocrine data. In: Gass GH, Kaplan HM, (Eds) *Handbook of endocrinology* 2nd ed. New York, NY: CRC Press, pp. 1–42.
93. Jorgenson, J.L. 2001. Aldrin and Dieldrin: A review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environmental Health Perspectives* 109 (1): 113-139.
94. Josse, R., Sharanek, A., Savary, C.C., Guillouzo, A. 2014. Impact of isomalathion on malathion cytotoxicity and genotoxicity in human HepaRG cells. *Chemico-Biological Interactions* 209: 68-76.
95. Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. 1999. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *The Journal of biological chemistry* 274: 13519-24.
96. Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y. 2015. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environment International* 83: 11-40.
97. Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K. 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 112: 524-531.
98. Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J., Hagenmaier, H. 1999. Development of a sensitive *E-Screen* assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Science of the Total Environment* 225:33-48.

99. Kortenkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 115 (1): 98-105
100. Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5925-30.
101. Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., Rousselle, C. 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*.14 (1), pp. 15.
102. Lamb,, J.C., Boffetta, P., Foster, W.G., Goodman, J.E., Hentz, K.L., Rhomberg, L.R., Staveley, J., Swaen, G., Van Der Kraak, G., Williams, A.L, 2014. Critical comments on the WHO-UNEP State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69: 22-40.
103. Lee, DH, Steffes, MW, Sjodin, A, Jones, RS, Needham, LL, Jacobs Jr DR. 2011. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One* 6:e15977, DOI 10.1371/journal.pone.0015977.
104. Lemaire, G., Mnif, W., Mauvais, P., Balaguer, P., Rahmani, R., 2006. Activation of α - and β -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sciences*. 79 (12): 1160-1169.
105. León, C.J., Gómez, S.M., Morantes, S.J., Cordero, C.P., Ancizar, F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica* 26 (1): pp. 161.
106. León-Ortega, M., Martínez, J.E., Pérez, E., Lacalle, J.A., Calvo, J.F. 2017. The contribution of non-protected areas to the conservation of Eurasian Eagle-owls in Mediterranean Ecosystems. *Ecosphere* 8 (9): e01952. <https://doi.org/10.1002/ecs2.1952>.

107. Li, X., Lin, L., Luan, T., Yang, L., Lan, C. 2008. Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A on glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snail *Bellamya purificata*. *Chemosphere* 70:1903-1909.
108. Lin, C.H., Lin, P.H., 2006. Induction of ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and cell death by PCB126 and PCB153 in human T47D and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 162: 181-194.
109. Lippert, T.H., Seeger, H., Mueck, A.O. 2000. The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. *Steroids* 65: 357-369.
110. Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 265(6):3202-11.
111. López, E.M., María, P., Ramírez, P.G., Martínez-López, E., María, P., Gómez-Ramírez, P. 2012. DDT Residues in Breeding Population of Booted Eagle (*Aquila pennata*) Associated with Agricultural Land Practices. En: Jokanović, M. (Ed.) *The Impact of Pesticides*: 321-338. AcademyPublish.org (Publishing Services LLC). Cheyenne, WY, USA. ISBN: 978-0-9835850-9-1.
112. Lundholm, C.D. 1997. DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 118: 113-128.
113. MAGRAMA, 2013. Actualización del Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y del Reglamento (CE) No 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes 1-131.
114. Maness, S.C., McDonnell, D.P., Gaido, K.W. 1998. Inhibition of Androgen Receptor-Dependent Transcriptional Activity by DDT Isomers and Methoxychlor in HepG2 Human Hepatoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 151: 135-142.

115. Maranghi, F., Rescia, M., Macrì, C., Di Consiglio, E., De Angelis, G., Testai, E., Farini, D., De Felici, M., Lorenzetti, S., Mantovani, A. 2007. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER- β : an *in vivo-in vitro* approach. *Chemico-Biological Interactions* 169: 1-14.
116. Margalef, R. 1974. Mecánica de las envolturas fluidas. En: Margalef R. (Autor) *Ecología*. Omega Ediciones S.A.. Barcelona, pp. 159: 212.
117. María, P., García-Fernández, A.J., Barba, A., Riboni, I., Romero, D., Sánchez-García, J.A. 1996. Organochlorine pesticide accumulation in several species of raptors from Southeastern Spain. *Toxicology Letters* 88: pp. 80.
118. María-Mojica P. 1998. Biomonitoring of Organochlorine Insecticides in Raptors from Murcia Region (SE Spain) (Tesis doctoral). Universidad de Murcia, Murcia, España.
119. María-Mojica, P., Jiménez, P., Barba, A. Navas, I., García Fernández, A.J. 2000. Residuos De Insecticidas Organoclorados en cernícalo. *Anales de Veterinaria*. Universidad de Murcia. 66: 55-66.
120. Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., Fait, A. 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology* 143: 1–118.
121. Martínez-López, E., Maria-Mojica, P., Martínez, J.E., Calvo, J.F., Wright, J., Shore, R.F., Romero, D., Garcia-Fernandez, A.J., 2007. Organochlorine residues in booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) and goshawk (*Accipiter gentilis*) eggs from southeastern Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2373-2378.
122. Martínez-López, E., María-Mojica,P., Gómez-Ramírez, P., Calvo, J.F., Martínez, J.E., García-Fernández, A.J. 2012. DDT residues in breeding population of booted eagle (*Aquila pennata*) associated with agricultural land practices. En: Milan Jokanović (Eds) *The Impact of Pesticides*, AcademyPublish.org, pp. 321- 338.
123. Martínez-López, E., Romero, D., María-Mojica, P., Martínez, J.E., Calvo, J.F., García-Fernández, A.J. 2009. Changes in blood pesticide levels in booted eagle (*Hieraaetus*

- pennatus) associated with agricultural land practices. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1): 45-50.
124. Matolscy, Gy. 1988. Anti-insect agents. En: Matolscy, Gy., Nádasy, M., Andriská, V. (Eds) *Pesticide Chemistry. Studies in Environmental Science 3*. Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, pp. 21:239.
125. Matsumura, F., 1985. *Toxicology of Insecticides*. Springer US, Boston, MA.
126. May, M., Moran, J.F., Kimelberg, H., Triggle, D.J. 1967. Studies on the noradrenaline alpha-receptor. II. Analysis of the «spare-receptor» hypothesis and estimation of the concentration of alpha-receptors in rabbit aorta. *Molecular pharmacology* 3: 28-36.
127. McCarty, J.P., Secord, A.L. 1999a. Reproductive ecology of tree swallows (*Tachycineta bicolor*) with high levels of polychlorinated biphenyl contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1433-1439.
128. McCarty, J.P., Secord, A.L. 1999b. Nest-Building Behavior in PCB-Contaminated Tree Swallows. *The Auk* 116: 55-63.
129. McClellan, R.O., 2007. Concepts in veterinary toxicology. En; Gupta, R.C.(Eds) *Veterinary Toxicology. Basic and clinical principles*. Academic Press , ISBN: 978-0-12-370467-2, pp. 3-24
130. Miller, W.L. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews* 9: 295-318.
131. Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(6):2265-2303
132. Mortensen, A.S., Arukwe, A. 2007. Effects of 17 α -ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 85: 113-123.

133. Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
134. Mrema, E.J., Rubino, F.M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A.M., Colosio, C. 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307: 74-88.
135. Mumtaz, M.M., Tully, D.B., El-Masri, H.A., De Rosa, C.T. 2002. Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures. *Environmental Health Perspectives* 110 (6): 947-956.
136. Nativelle-Serpentini, C., Richard, S., Seralini, G. E., y Sourdain, P. 2003. Aromatase activity modulation by lindane and bisphenol-A in human placental JEG-3 and transfected kidney E293 cells. *Toxicology in vitro* 17: 413-422.
137. Navas Ruiz, Isabel María. 2017. Contaminantes ambientales persistentes (metales pesados y plaguicidas organoclorados) en rapaces del sur de España (Tesis doctoral). Universidad de Murcia, Murcia, España.
138. Navas, J.M., Segner, H. 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquatic Toxicology* 80:1-22.
139. Nebert, D.W., Russell, D.W. 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360: 1155-62.
140. NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). 2002. NIH Publication No: 03-4503 ICCVAM Evaluation of *In vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinrpt.pdf.
141. Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Research* 2: 360-366.

142. NTP (National Toxicology Program). 2004. Recuperado de <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/endocrine/endodocs/submdoc.pdf>, visitado el 08.04.2018
143. Oa, L., Lalosa S. 2015. Implicancias fisiopatológicas del receptor androgénico. Mutaciones, polimorfismos y patologías asociadas Pathophysiological Implications of Androgen Receptor. Mutations, Polymorphisms and Pathologic Associations 52(2):79-107
144. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2012. OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (as revised in 2012). OECD Guidelines for Testing of Chemicals 150: 1-5, recuperado de www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Conceptual%20Framework%20for%20Testing%20and%20Assessment%20of%20Endocrine%20Disrupters%20for%20the%20public%20website.pdf
145. OECD. 2016. OECD Guideline for the testing of chemicals BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guideline for the testing of chemicals: 1-4, doi: 10.1787/9789264264861-en.
146. Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Soya, Y., Kano, I. 2004. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. Archives of environmental contamination and toxicology. Archives of environmental contamination and toxicology, 46: 445–453.
147. Orden de 28 de febrero de 1986 relativa a la prohibición de la comercialización y utilización de productos fitosanitarios que contienen ciertas sustancias activas.
148. Orlando, E.F., Guillette, L.J. 2007. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. Environmental Research 104 (1):163-173.
149. Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R. 2008. Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in

Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81: 485-489.

150. Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F. 2014. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90: 13-29.
151. Payne, J., Jones, C., Lakhani, S., Kortenkamp, A. 2000. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens. *Science of the Total Environment* 248:51-62.
152. Payne, J., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2001. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environmental Health Perspectives* 109: 391-397.
153. Perdew, G.H. 1988. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *The Journal of biological chemistry* 263: 13802-13805.
154. Pérez-Romero, E., León-Ortega, M., Lacalle, J.A., Capel, J., Zamora-Marín, J.M., Zamora-López, A., Gómez, D., García-Castellanos, F.A., Arnaldos, I., Ruíz-Rocamora, A., Gallego-Abenza, M., Salas-Alarcón, Aldeguer-Aldeguer, M.P., Martínez, J.E., Calvo, J.F. 2017. Anillamiento y marcaje de rapaces nocturnas en la Región de Murcia: 10 años de seguimiento poblacional en activo. En: XX Congreso de anillamiento científico de aves (comunicación oral). Murcia.
155. Plíšková, M., Vondráček, J., Canton, R.F., Nera, J., Kočan, A., Petřík, J., Trnovec, T., Sanderson, T., van der Berg, M., Machala, M. 2005. Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum. *Environmental Health Perspectives* 113:1277-1284.
156. Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research* 672: 95-102

157. Ptak, A., Mazur, K., Gregoraszczyk, E.L. 2011. Comparison of combinatory effects of PCBs (118, 138, 153 and 180) with 17 beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and Industrial Health* 27(4):315-321.
158. Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. 1994. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology* 8:275-285.
159. Radice, S., Chiesara, E., Fucile, S., Marabini, L. 2008. Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 46:2561–2567
160. Rasmussen, T.H., Nielsen, J.B. 2002. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (*E-Screen*). *Biomarkers* 7(4): 322-36.
161. Reen, R.K., Cadwallader, A., Perdew, G.H. 2002. The subdomains of the transactivation domain of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) inhibit AhR and estrogen receptor transcriptional activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 408: 93-102.
162. Reglamento (CE) N o 1107/2009 del parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo DOUE-L-2009-82202, pp:1-50
163. Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria y su modificación Reglamento (CE) nº 596/2009 DOUE-L-2002-80201, pp. 1-24
164. Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo) es el Reglamento europeo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) DOUE-L-2006-82750, pp. 1-85.

165. Reglamento (CE) No 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CEE DOUE-L-158, pp.7-49
166. Reglamento (UE) N° 519/2012 de la Comisión de 19 de junio de 2012 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre contaminantes orgánicos persistentes, con respecto al anexo I. DOUE L 159 de 20/06/2012, pp.1-4
167. Reglamento (UE) n° 649/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de julio de 2012, relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos DOUE-L-2012-81341, pp 60-106
168. Reglamento (UE) N° 756/2010 de la Comisión de 24 de agosto de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre contaminantes orgánicos persistentes, en lo que se refiere a los anexos IV y V. DOUE L 223 de 25/08/2010, pp. 20-28.
169. Reglamento (UE) N° 757/2010 de la Comisión de 24 de agosto de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre contaminantes orgánicos persistentes, con respecto a los anexos I y III. DOUE L 223 de 25/08/2010, pp. 29-36.
170. Reglamento (UE) No 944/2013 DE LA COMISIÓN de 2 de octubre de 2013 que modifica, a efectos de su adaptación al progreso científico y técnico, el Reglamento (CE) no 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas DOUE- L-261, pp. 5:22
171. Repetto Jiménez, M., Repetto Kuhn, G. 2009. Toxicología fundamental (4ª Ed). Diaz Santos, Madrid, pp.620
172. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. Science 256: 1193-5.

173. Ritter, L., Solomon, K. R., Forget, J., Stemeroff, M., & O'Leary, C. 1995. A review of selected Heptachlor-Hexachlorobenzene-Mirex-Toxaphene Polychlorinated biphenyls Dioxins and Furans. World Health Organization, pp167, recuperado de cdrwww.who.int/ipcs/assessment/en/pcs_95_39_2004_05_13.pdf
174. Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., Gamet-Payraastre. 2016. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chemico-Biological Interactions* 254: 231-246.
175. Safe, S.H. 1998. Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach. *Environmental Health Perspectives* 106(4): 1051-1058.
176. Sanderson, T., van den Berg, M. 2003. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure and Applied Chemistry* 75: 1957-1971.
177. Savary, C.C., Jossé, R., Bruyère, A., Guillet, F., Robin, M.-A., Guillouzo, A. 2014. Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 42: 1235-1240.
178. Schantz, S.L., Levin, E.D., Bowman, R.E. 1991. Long-term neurobehavioral effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 747-756.
179. Schantz, S.L., Widholm, J.J. 2001. Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environmental Health Perspectives* 109: 1197-206.
180. Scippo, M.L., Argiris, C., Van De Weerd, C., Muller, M., Willemsen, P., Martial, J., Maghuin-Rogister, G. 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 664-669.
181. Scott, M.L., Zimmermann, J.R., Marinsky, S., Mullenhoff, P.A., Rumsey, G.L., Rice, R.W. 1975. Effects of PCBs, DDT, and mercury compounds upon egg production,

- hatchability and shell quality in chickens and Japanese quail. Poultry science 54: 350-68.
182. Shanle, E., Xu, W. 2010. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. Chemical Research in Toxicology 24: 6-19.
183. Sigman, R., Ladeuille, B., Grandy, N. 2001. OECD Environmental Outlook for the Chemicals Industry. <http://www.oecd.org/ehs>.
184. Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2007. Activity of xenoestrogens at nanomolar concentrations in the *E-Screen* assay. Environmental Health Perspectives 115(1):91-97.
185. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of the National Cancer Institute 82:1107-1112.
186. Sohoni, P., Sumpter, J. 1998. Several environmental estrogen are also endrogens. Journal Endocrinology 158: 327-339.
187. Soin, T., Smagghe, G. 2007. Endocrine disruption in aquatic insects: A review. Ecotoxicology 16:83-93.
188. Soto, A.M., Chung, K.L., Sonnenschein, C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. Environmental Health Perspectives 102(4)380-38.
189. Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C. 1991. Para-Nonyl-Phenol - an Estrogenic Xenobiotic Released From «Modified» Polystyrene. Environmental Health Perspectives 92: 167-173.
190. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea ,N., Olea, S.F. 1995. The *E-SCREEN* Assay as a Tool to Identify Estrogens : An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. Environmental Health Perspectives 103(7) :113-122.

191. Sotoca, A.M., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M., Gustafsson, J.-åke. 2012. Human ER α and ER β Splice Variants: Understanding Their Domain Structure in Relation to Their Biological Roles in Breast Cancer Cell Proliferation. En: Ekinci, D. *Biochemistry*. Intechopen, pp. 362-378. DOI: 10.5772/34190
192. Stein, J., Schettler, T., Wallinga, D., Valenti, M. 2002. In harm's way: toxic threats to child development. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 23(1): S13-22.
193. Stockholm Convention. 2008. Recuperado de <http://chm.POP.int/> visitado el 15.09.2017
194. Sumbayev, V.V., Bonefeld-Jorgensen, E.C., Wind, T., Andreasen, P.A. 2005. A novel pesticide-induced conformational state of the oestrogen receptor ligand-binding domain, detected by conformation-specific peptide binding. *FEBS Letters* 579 (2): 541–548.
195. Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A. M., Luizzi, M. F., & Sonnenschein, C. 1997. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138(4):1406- 1412.
196. Tiemann, U., Schneider, F., Tuchscherer, A. 1996. Effects of organochlorine pesticides on DNA synthesis of cultured oviductal and uterine cells and on estrogen receptor of uterine tissue from heifers. *Archives of Toxicology* 70: 490-496.
197. United States Environmental Protection Agency, (USEPA) 2003. Contaminant Candidate List Regulatory Determination Support Document for Document for Aldrin and Dieldrin 6. www.epa.gov/safewater/
198. Valerón, P.F., Pestano, J.J., Luzardo, O.P., Zumbado, M.L., Almeida, M., Boada, L.D. 2009. Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination. *Chemico-biological interactions* 180: 485-91.

199. Van Den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Wærn, F., Zacharewski, T. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106(12):775-792.
200. Van Den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N., Katayama, A. 2003. Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry* 75(11-12):1917-1932.
201. Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.H., Myers, J.P., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W. V., Zoeller, R.T. 2013. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reproductive Toxicology* 38:1-15.
202. Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W. V., Zoeller, R.T., Myers, J.P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 33: 378-455.
203. Vanparrys, C., Maras, M., Lenjou, M., Robbens, J., Van Bockstaele, D., Blust, R., De Coen, W. 2006. Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology in vitro* 20:1238-1248.
204. Vinggaard, A.M., Breinholt, V., Larsen, J.C. 1999. Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation *in vitro*. *Food Additives and Contaminants* 16: 533-542.
205. Vreugdenhil, H.J.I., Slijper, F.M.E., Mulder, P.G.H., Weisglas-Kuperus, N. 2002. Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environmental Health Perspectives* 110(10): A593-8.
206. Wade, M.G., Desaulniers, D., Leingartner, K., Foster, W.G. 1997. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes *in vitro* and *in vivo*. *Reproductive Toxicology* 11(6):791-198.

207. Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S.. Large effects from small exposures. I. 2003. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives* 111:994–1006.
208. WHO, 2003. Health Risks of Persistent Organic Pollutants from Long-Range Transboundary Air Pollution 1-274. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/78660/e78963.pdf
209. WHO, 2006. Concise International Chemical Assessment Document 70 Heptachlor. *In vitro* v. <https://doi.org/10.1002/14356007.a03>
210. WHO. 1993. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (second edition). Environmental Health Criteria 140, World Health Organization, Geneva.
211. WHO/IPCS, 2002. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors, WHO/PCS/EDC/02.2, International Programme on Chemical Safety, World Health Organisation, WHO. World Health Organization. <http://www.who.int/ipcs/publications/en/toc.pdf>
212. WHO/UNEP, 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. ISBN: 978 92 4 150503 1
213. Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikström, A.C., Gustafsson, J.A., Poellinger, L. 1990. The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *The EMBO Journal* 9: 69-76.
214. Zala, S.M., Penn, D.J. 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: A review of the evidence and new challenges. *Animal Behaviour* 68: 649-664.
215. Zhang, Q., Lu, M., Wang, C., Du, J., Zhou, P., Zhao, M. 2014. Characterization of estrogen receptor α activities in polychlorinated biphenyls by *in vitro* dual-luciferase reporter gene assay. *Environmental Pollution* 189: 169-175.

RESUMEN DEL TRABAJO

Los compuestos tóxicos, persistentes y bioacumulables son de gran interés en la evaluación de riesgos para la salud del ser humano y de las especies animales. Entre ellos, destaca el interés por los pesticidas organoclorados y los bifenilos policlorados (PCB). Su presencia ha sido continua durante décadas en todos los niveles de las cadenas tróficas; sin embargo, el interés es creciente en las especies ubicadas en las partes más altas de las cadenas alimentarias (incluido el ser humano), pues son integradores de la exposición en los eslabones inferiores. Las grandes especies de rapaces se ubican en las partes más altas de sus redes tróficas, al mismo nivel que el ser humano, siendo así consideradas muchas de ellas, ideales centinelas de riesgos ambientales.

Estudios previos de biomonitorización de pesticidas organoclorados y PCB realizados en diversas especies de rapaces por el grupo de investigación de Toxicología de la Universidad de Murcia habían detectado de forma continua presencia este tipo de contaminantes (entre otros) en sangre y otras muestras de estas aves. Sin embargo, la presencia de un compuesto en un ser vivo no es suficiente para explicar efectos deletéreos o indeseables en ellos. Por otro lado, estos compuestos han sido ampliamente estudiados por su potencial efecto perturbador endocrino; quedando aún lagunas sobre ciertos efectos y las condiciones de exposición (dosis, mezclas, etc).

El objetivo de este trabajo es el estudio *in vitro* de la alteración de la proliferación celular, parámetro vinculado a la actividad estrogénica y englobada en la función endocrina, sobre la línea celular MCF-7 por la exposición a concentraciones subletales de 14 pesticidas y 4 PCB y 8 de sus mezclas más frecuentemente observadas en estudios de biomonitorización en rapaces. Para ello, se aplicó el ensayo *E-Screen*, ensayo *in vitro* de proliferación celular sobre la línea MCF-7 (Soto *et al.*, 1994, 1995) para la exposición a dichos organoclorados frecuentemente monitorizadas en grandes rapaces. El *E-Screen* es un ensayo de 6 días de duración que emplea la línea celular MCF-7, capaz de expresar endógenamente receptores estrogénicos sobre los que pueden actuar ciertos perturbadores endocrinos. Se estudió representantes de los siguientes grupos: difenilalifáticos (*p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y dicofol), ciclodiénicos (aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endosulfán $\alpha\beta$, endosulfán sulfato, heptacloro y heptacloro epóxido), hexaclorociclohexanos o HCH (γ -HCH y lindano técnico) y PCB (PCB# 118, PCB# 126, PCB# 153, y PCB# 180). En cuanto a las ocho mezclas diseñadas en base a los estudios de campo previos, se agrupan en mezclas binarias[MB h/c/:

lindano técnico+ endosulfán $\alpha\beta$ (50:50); MB d/d/: p,p' -DDT+ p,p' -DDE (50:50); MBc/d/1/: endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDE (75:25); MB c/d/2/:endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT (75:25)] mezclas ternarias [MT c/d/d/: endosulfán $\alpha\beta$ + p,p' -DDT + p,p' -DDE (75:12,5:12,5); MT h/d/d/:lindano técnico + p,p' -DDT + p,p' -DDE (75:12,5:12,5)], una mezcla cuaternaria [MC c/c/d/d/: aldrín + dieldrín + p,p' -DDT + p,p' -DDE (25:25:25:25)] y una senaria [{MS c/c/c/d/d/h/: endosulfán $\alpha\beta$ +aldrín + dieldrín + p,p' -DDT + p,p' -DDE + lindano técnico (50:12,5:12,5:6,25:6,25:12,5)]. Se abarcó un rango de 7 concentraciones (desde $1,0 \cdot 10^{-5}$ M hasta $1,0 \cdot 10^{-11}$ M para los compuestos individuales, variando en las mezclas hasta $3,0 \cdot 10^{-13}$ M en algunos casos), empleando como control positivo el 17β -estradiol y DMSO como solvente. En función del efecto proliferativo relativo (RPE) obtenido, se clasificó cada compuesto y mezcla según la categorización pre-establecida en la bibliografía como débilmente estrogénicos, parcial y fuertemente estrogénicos (RPE < 25%, entre el 25 y el 75 %, y > al 75%, respectivamente).

Los análisis de los compuestos evaluados individualmente, revelaron que todos ellos dieron lugar a una intensa proliferación celular, puesto que no se detectaron efectos débilmente estrogénicos. Las concentraciones $1,0 \cdot 10^{-9}$ M y $1,0 \cdot 10^{-8}$ M fueron las responsables del máximo efecto observado en la mayoría de los análisis. El ciclodiénico aldrín fue el OC que indujo mayor proliferación, tanto de los ensayos individualizados como de las mezclas. Por otro lado, al menos una concentración de cada uno de los difenilalifático se catalogó como fuertemente estrogénico, en contraposición con los HCH, ya que tan sólo el lindano técnico demostró ser fuertemente estrogénico. Los PCB se caracterizaron por la diversidad de respuesta, pudiendo aparecer valores por debajo del control negativo y fuertemente estrogénicos en el mismo producto.

En cuanto a las mezclas, destaca el menor RPE respecto a los análisis individuales. Entre las mezclas binarias se encuentra la mezcla más proliferativa y la de menor efecto. Por su parte, la mezcla más compleja (conformada por 6 compuestos) dio lugar a un RPE máximo del 33%. Asimismo, se comprobó que el efecto de las mezclas, no siempre se igualaba al de sus integrantes a pesar de que pudieran estar compuestos mayoritariamente por OC fuertemente estrogénicos.

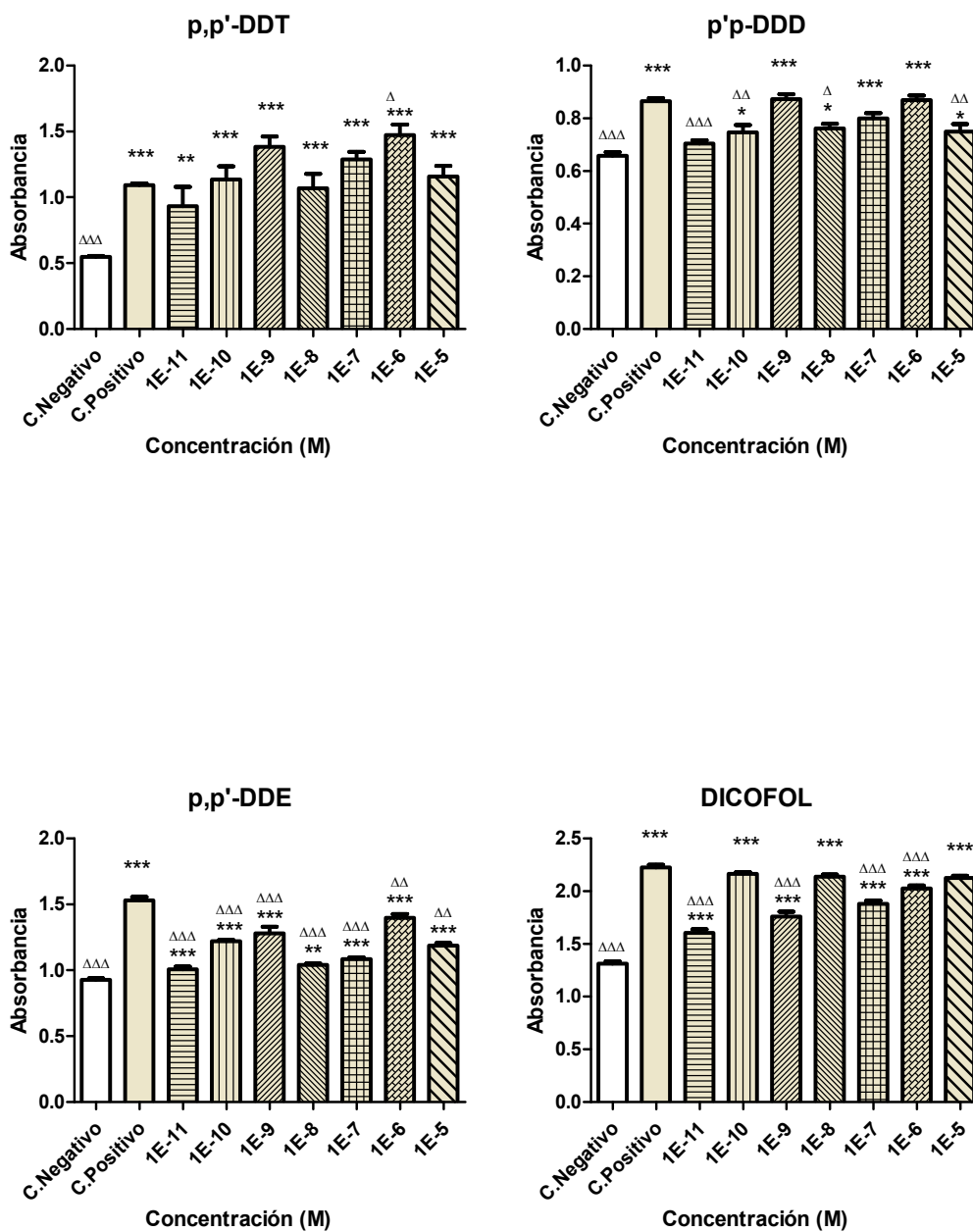
Con carácter general, se observó una variación del efecto sin un patrón definido a lo largo del rango analizado, por lo que un compuesto/mezcla puede ser catalogado de distinta manera en función de la concentración escogida. Este hecho, dificulta la comparación de datos entre estudios, ya que no siempre se dispone de toda la información deseable. Los resultados de este trabajo aportan luz sobre el efecto estrogénico inducido por la exposición a organoclorados y diferentes mezclas ambientalmente posibles; sin embargo, es preciso profundizar aún más en los potenciales efectos estrogénicos de las mezclas y los mecanismos que los explican.

ANEXO

RELACIÓN DE GRÁFICAS Y TABLAS MÁS RELEVANTES

RESULTADOS DEL ENSAYO E-SCREEN DE LOS ANÁLISIS INDIVIDUALIZADOS Y SUS MEZCLAS (DATOS DE ABSORBANCIA)

DIFENIL ALIFÁTICOS

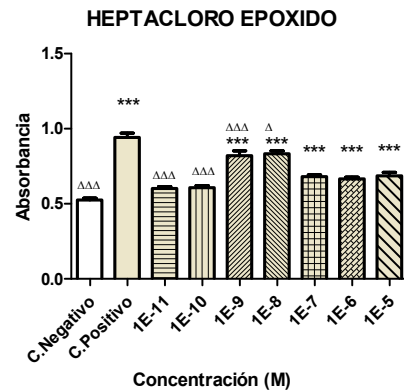
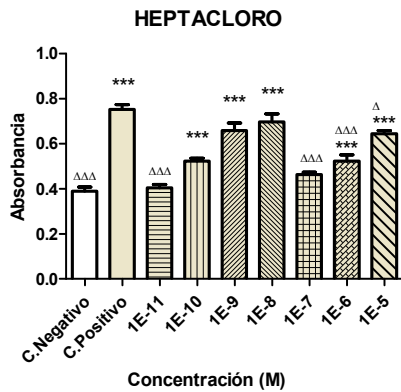
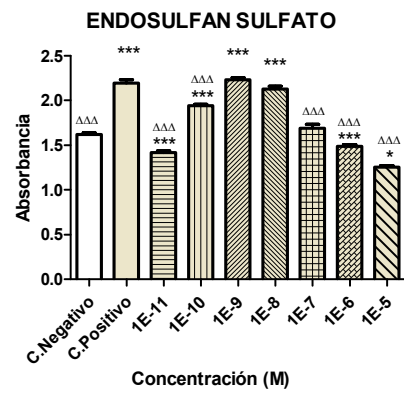
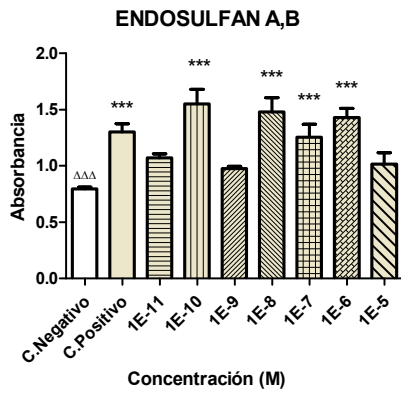
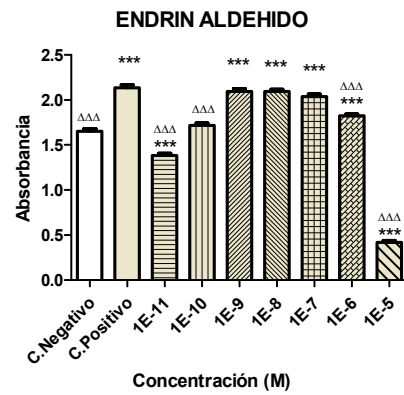
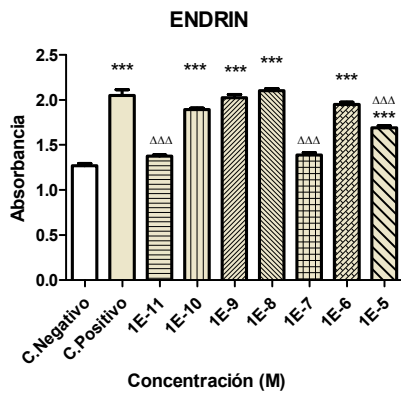
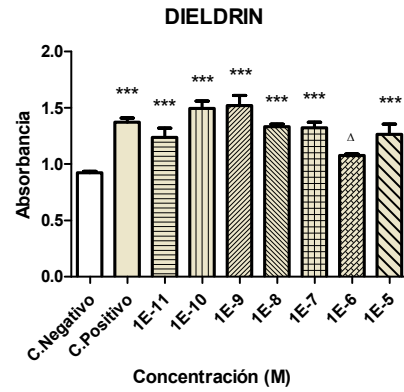
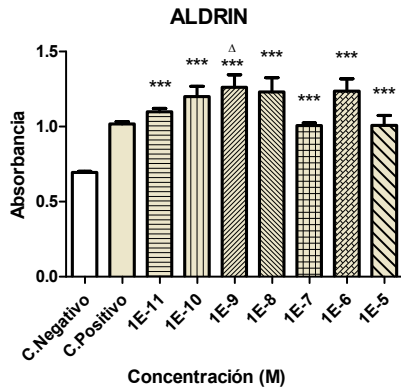


Respecto al control negativo: ***=p<0,001; **= p<0,01; *=p<0,05

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= p< 0,001, Δ Δ=p<0,01; Δ =p<0,05

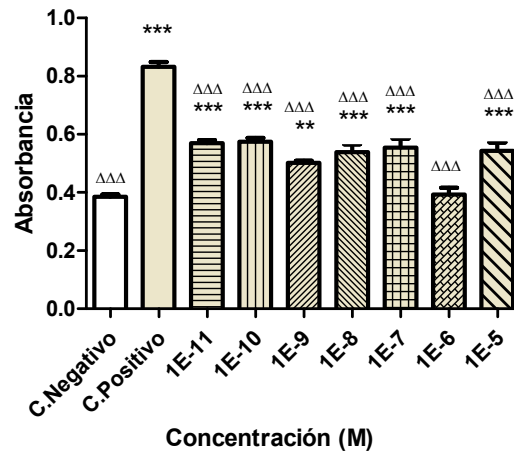
*

CICLODIÉNICOS

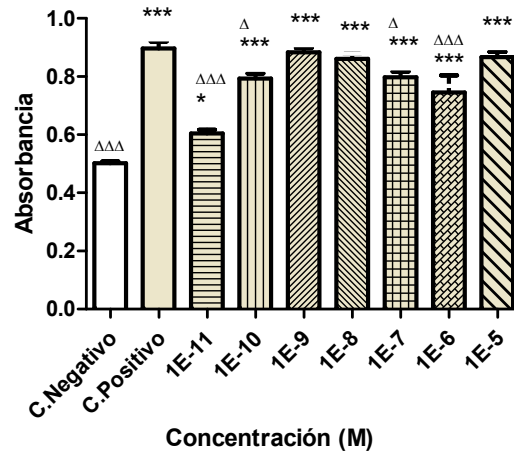


HEXACLOROCICLOHEXANOS

LINDANO



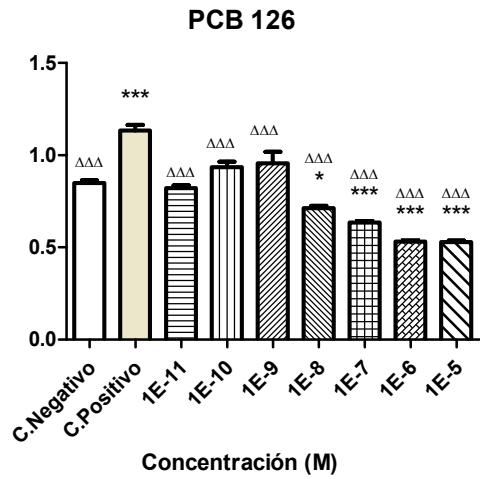
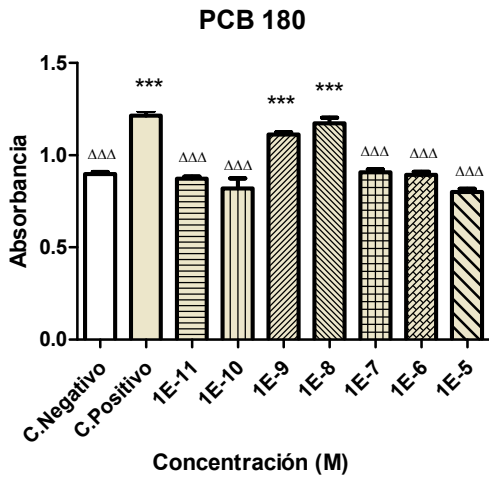
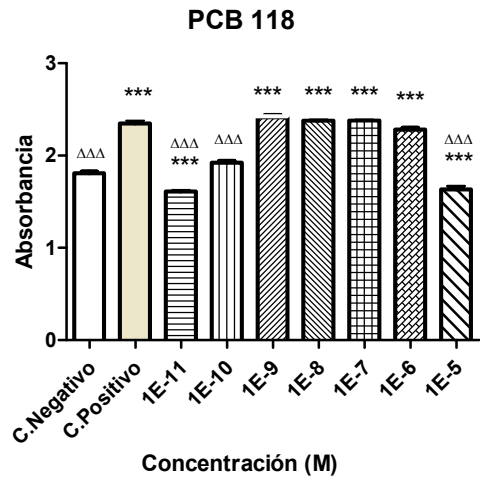
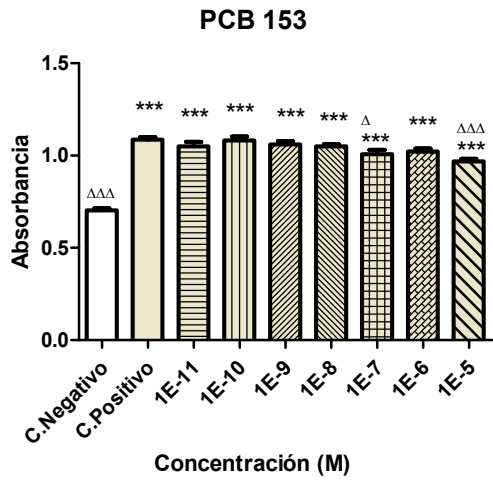
LINDANO TÉCNICO



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ = $p < 0,001$, Δ Δ = $p < 0,01$; Δ = $p < 0,05$

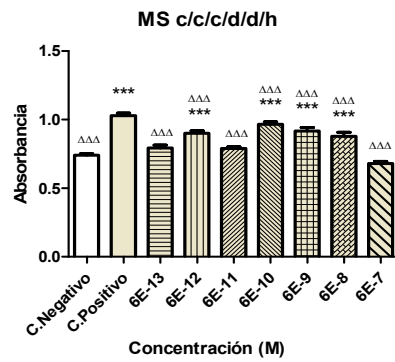
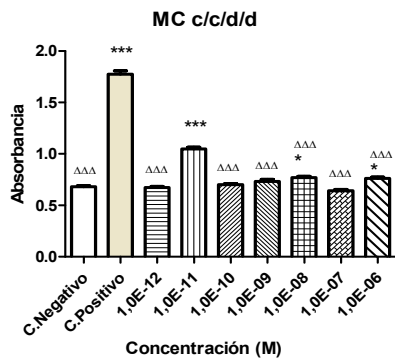
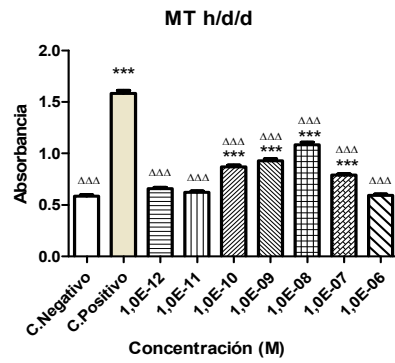
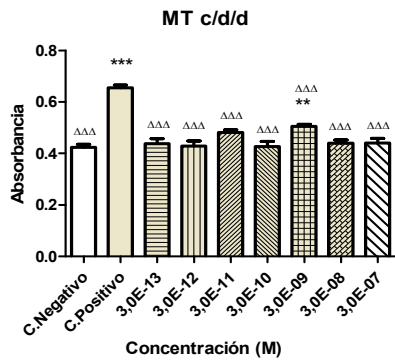
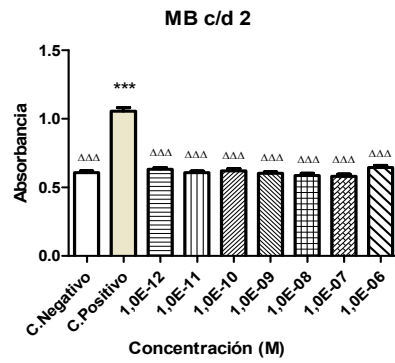
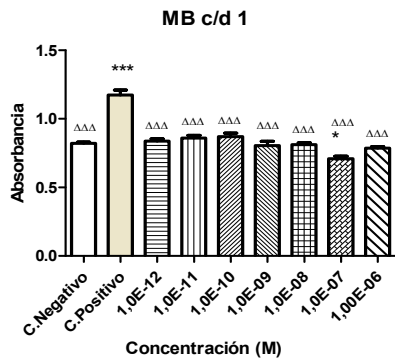
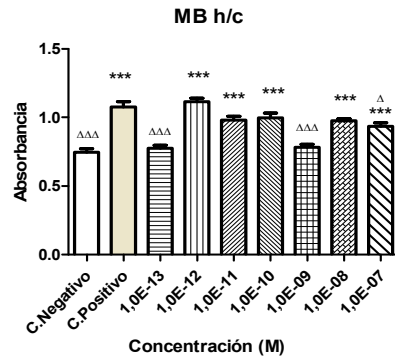
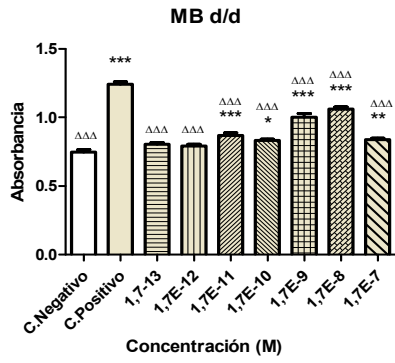
PCB



* Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$

Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$, Δ Δ= $p < 0,01$; Δ= $p < 0,05$

MEZCLAS

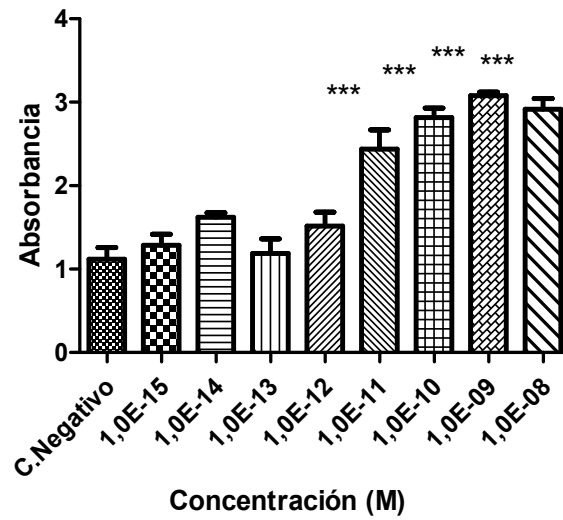


*

Respecto al control negativo: ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$

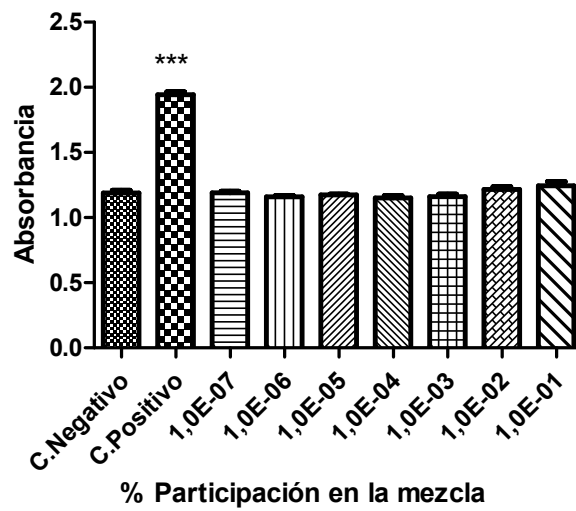
Δ Respecto al control positivo: Δ Δ Δ= $p < 0,001$, Δ Δ= $p < 0,01$; Δ= $p < 0,05$

17-B ESTRADIOL



***=p<0,001 Diferencias estadísticamente significativas respecto al Control negativo

DMSO



***=p<0,001

COMPENDIO DE TABLAS Y FIGURAS DESTACADAS.

Tabla 37. Relación del valor máximo de efecto proliferativo relativo de cada compuesto/mezcla y la concentración asociada a dicho efecto

Compuesto/ Mezcla	RPE max (%)	Máxima Concentración efectiva (M)
<i>p,p'</i> - DDT	169,72	1,0E-6
<i>p,p'</i> -DDE	78,18	1,0E-6
MB c/d /2/	8,57	1,0E-6
Heptacloro epóxido	73,93	1,0E-8
Endrin	106,80	1,0E-8
Endrin aldehido	91,52	1,0E-8
Heptacloro	84,73	1,0E-8
PCB 180	86,88	1,0E-8
MT h/d/d/	50,05	1,0E-8
<i>p,p'</i> - DDD	103,77	1,0E-9
Aldrín	175,49	1,0E-9
Dieldrín	132,86	1,0E-9
Endosulfán sulfato	106,65	1,0E-9
Lindano técnico	96,67	1,0E-9
PCB 118	112,48	1,0E-9
PCB 126	37,22	1,0E-9
Dicofol	93,23	1,0E-10
Y HCH o lindano	42,49	1,0E-10
PCB 153	98,89	1,0E-10
MB c/d/1/	14,19	1,0E-10
MS c/c/c/d/d/h/	78,22	6,0E-10
Endosulfán $\alpha\beta$	148,80	1,0E-10
MC c/c/d/d/	33,51	1,0E-11
MT c/d/d/	24,79	3,0E-11
MB h/c /	112,07	1,0E-12
MB d/d/	63,57	1,7E-8

Tabla 23. Compuestos con efecto contrapuesto en función de la concentración evaluada y concentración a la que aparecieron

Compuesto	(%) RPE máximo	Máxima concentración efectiva (Molar)	Mínimo Efecto Proliferativo (%)	Mínima concentración efectiva (Molar)
Endosulfán sulfato	106,65	1,0E ⁻⁹	-64,13	1,0E ⁻⁵
Endrín aldehído	91,52	1,0E ⁻⁸	-255,72	1,0E ⁻⁵
PCB 118	112,48	1,0E ⁻⁹	-36,71	1,0E ⁻¹¹
PCB 180	86,88	1,0E ⁻⁸	-30,63	1,0E ⁻⁵
PCB 126	37,23	1,0E ⁻⁹	-111,25	1,0E ⁻⁵

Figura 72. Presentación de los OC y sus mezclas en orden creciente según el efecto proliferativo relativo máximo (en valor medio), coloreados según su comportamiento débil, parcial o fuertemente estrogénicos.

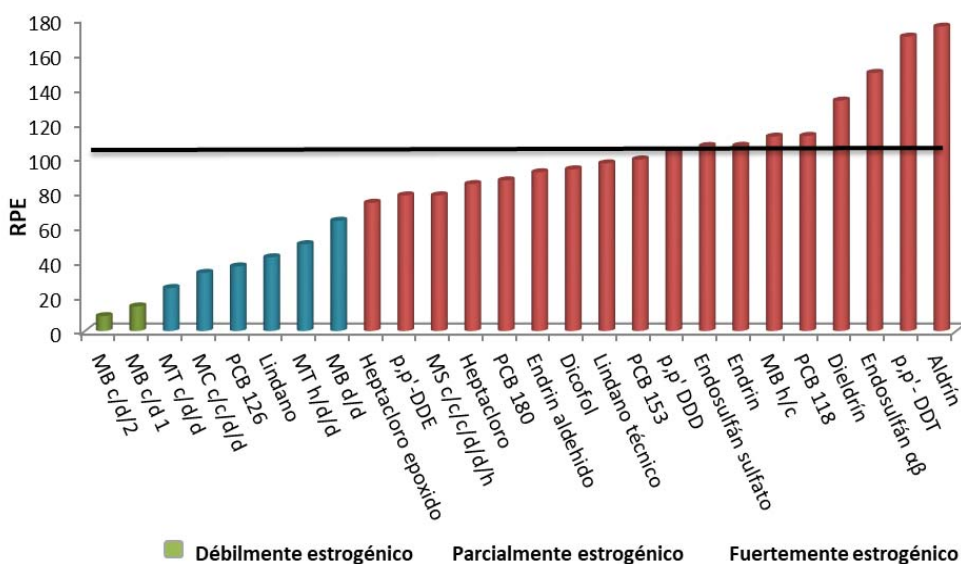


Figura 71 Comportamiento estrogénico de cada grupo químico y sus mezclas con respecto al total de análisis

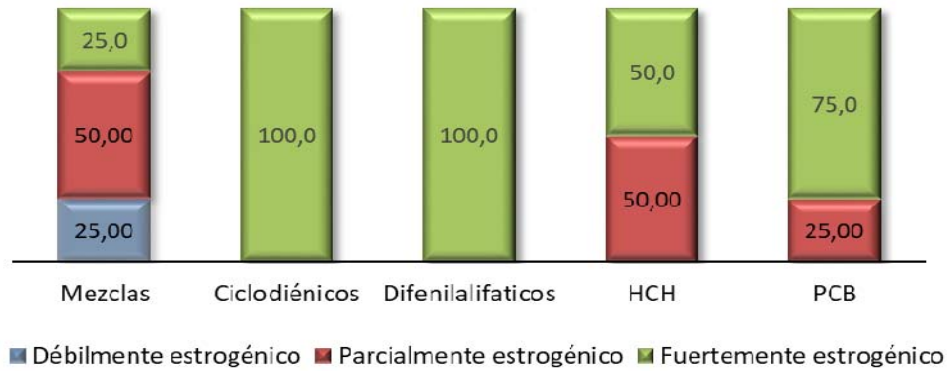


Figura 75. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas débilmente/fuertemente estrogénicas

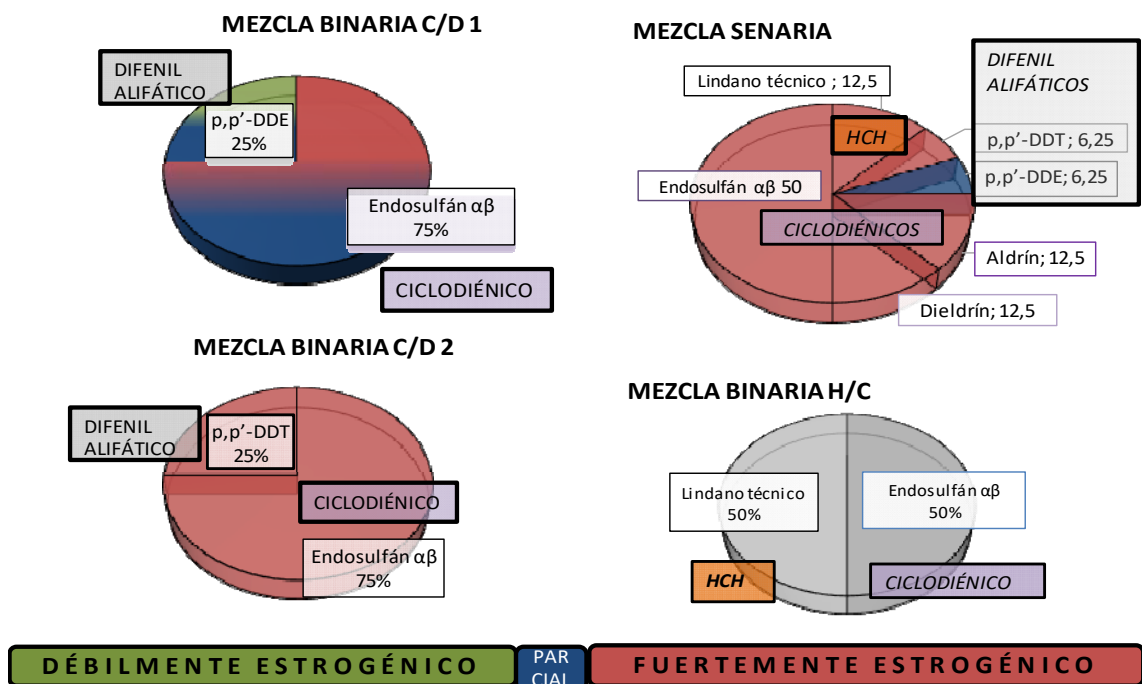


Figura 76. Representación gráfica del carácter estrogénico de los componentes de las mezclas parcialmente estrogénicas.

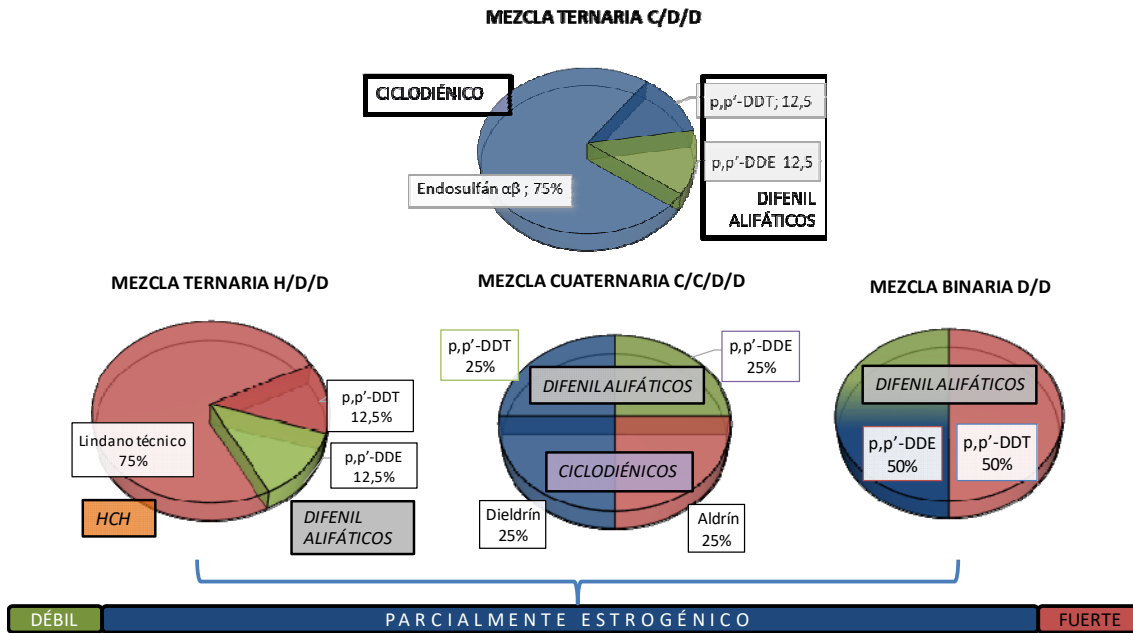


Figura 59. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) de la mezcla binaria MB d/d/ # (# p,p'-DDT+ p,p'-DDE) y de sus integrantes, en base logarítmica.

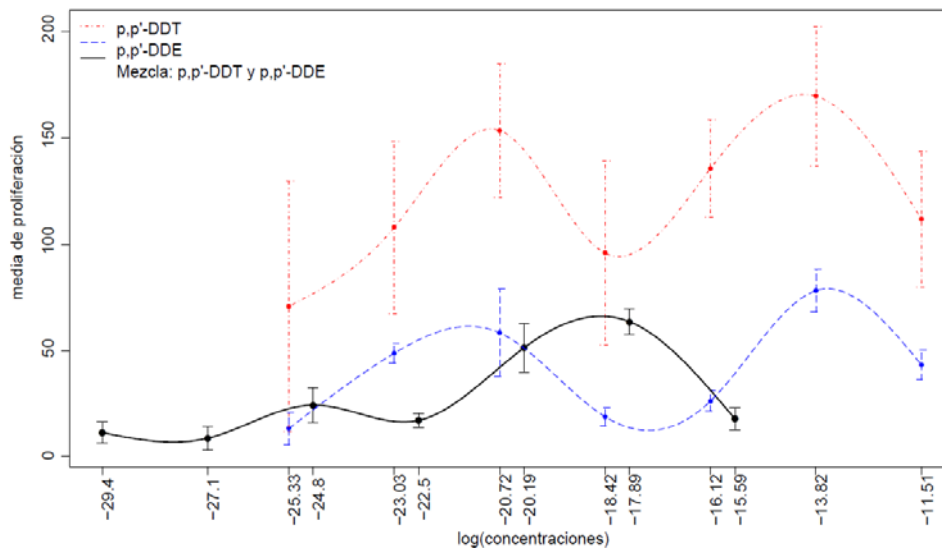


Figura 60 . Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la mezcla binaria MB c/d/1# (# endosulfan $\alpha\beta$ + p,p'-DDE) y en sus integrantes, en base logarítmica

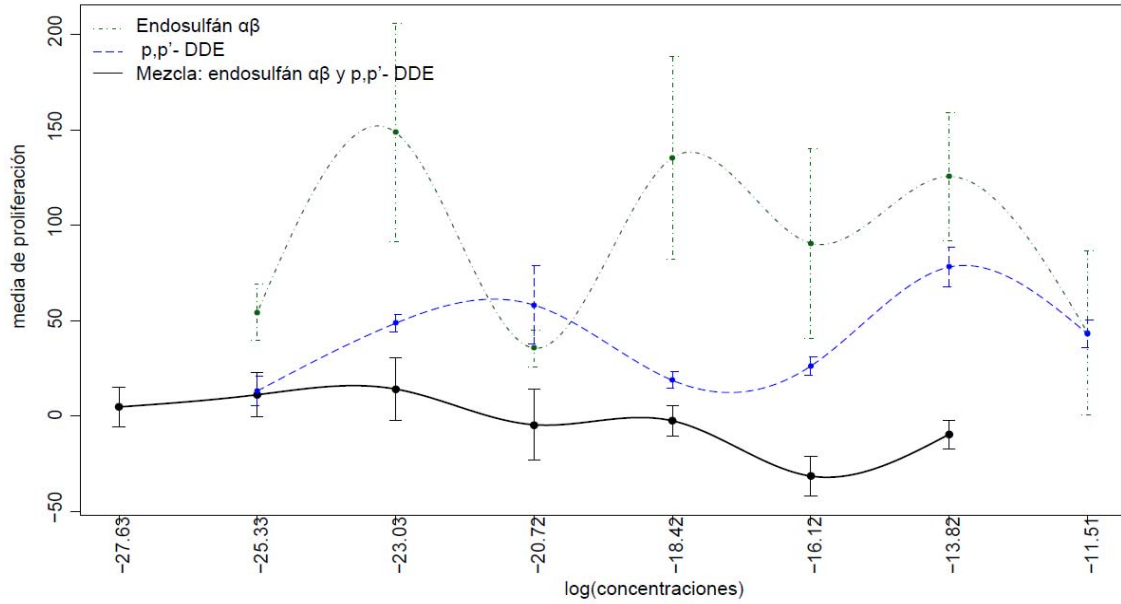


Figura 61. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla binaria MB c/d/2/ # (# Endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT) y de sus integrantes, en base logarítmica

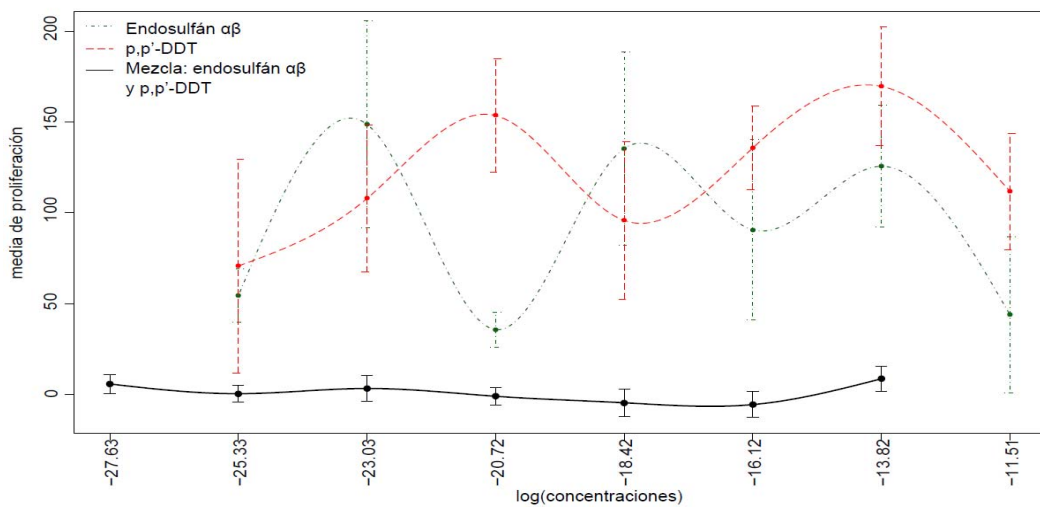


Figura 62. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados en la MB c/d/2/ # (# lindano técnico + endosulfán $\alpha\beta$ y en sus integrantes, en base logarítmica.

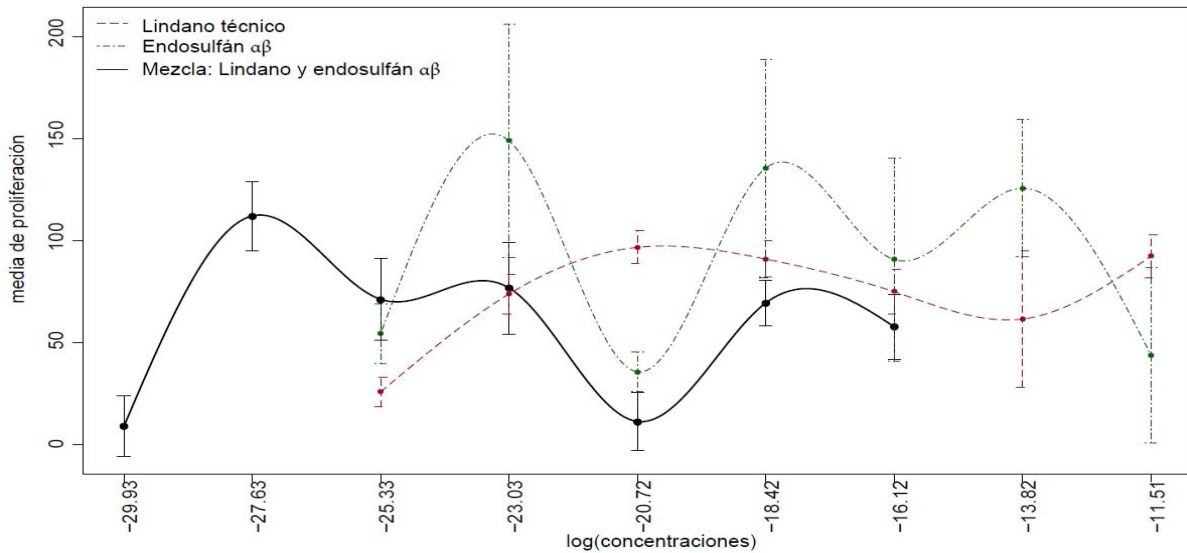


Figura 64. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados de la mezcla ternaria (MT c/d/d/ # (#endosulfán $\alpha\beta$ + p,p'-DDT + p,p'-DDE) y de sus componentes

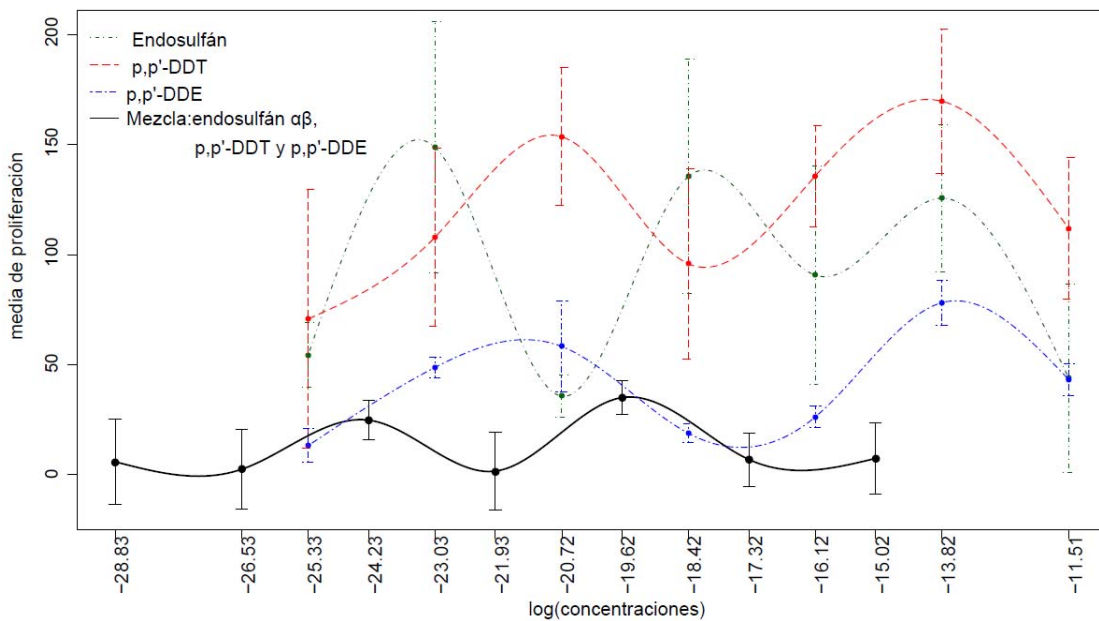
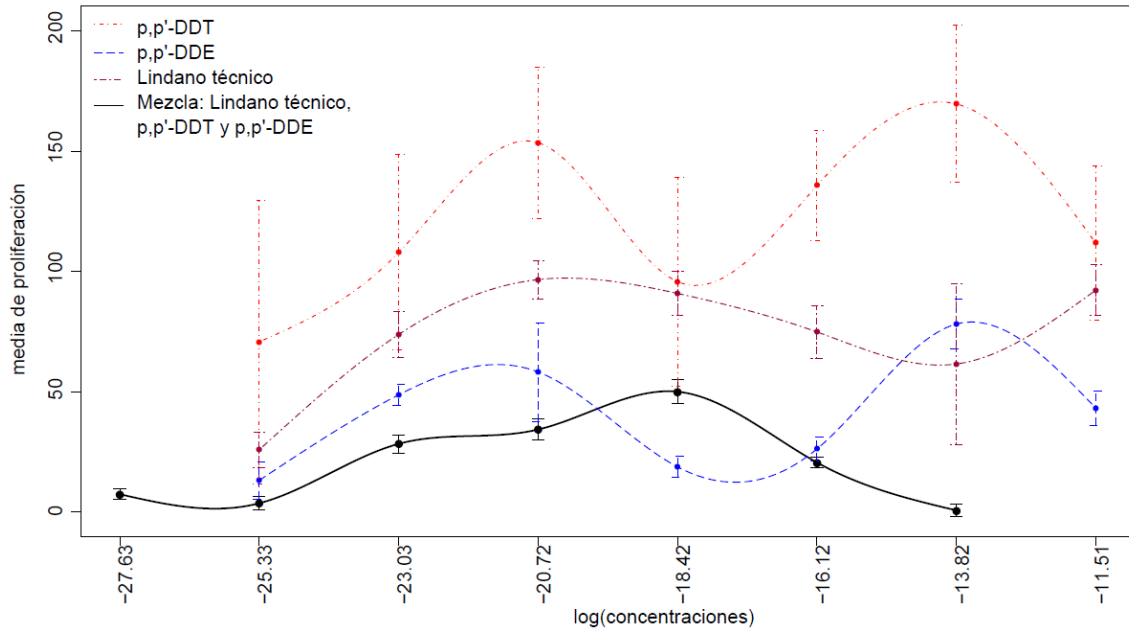


Figura 65. Superposición de los efectos proliferativos (en valor medio) observados para la mezcla ternaria MT h/d/d/ # (# Lindano técnico + p,p'-DDT+ p, p'-DDE) y de sus componentes



AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer el esfuerzo, asesoramiento y el tiempo dedicado desde el inicio de esta tesis de mi director Antonio Juan García Fernández; del mismo modo que agradezco la incorporación posterior de mi codirectora Emma Martínez López, contribuyendo con sus aportaciones a la culminación de esta tesis. Sé que no ha sido fácil compaginar la última etapa de este proyecto con vuestras obligaciones paralelas. Gracias.

A la Universidad de Murcia, por la concesión de la beca de Formación del Personal Docente e Investigador, durante el periodo 2008-2012.

Al proyecto “NOVEDAR. Concepción integral de la EDAR del siglo XXI. Desarrollo de tecnologías para el tratamiento y recuperación de recursos en aguas residuales”, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia-CONSOLIDER.INGENIO 2010, durante el periodo 2007 a 2012, por darme la oportunidad de implicarme en el proyecto de manera indirecta.

A la Fundación Séneca, por la financiación del proyecto “Evaluación in vitro de alteración reproductiva por mezclas de contaminantes ambientales monitorizados en aves silvestres”, desde 2009 hasta 2013.

A los doctores Lagarde y Ankley, por autorizarme a emplear figuras de sus trabajos “*Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment*” y “*Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas)*”, respectivamente, para este fin.

A la sección Apoyo Estadístico, del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia, por sus aportaciones en este trabajo.

Al Grupo de Investigación de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, y en especial al investigador principal Antonio Juan García Fernández, por brindarme la oportunidad investigar con ellos y permitirme participar de todas las actividades que han llevado a cabo desde que comencé como alumna interna en 2007.

Aida Salas Alarcón, gracias. Sin ti no habría podido superar la primera etapa de mi tesis (pero no por ello más sencilla). Sólo tú sabes lo mucho que te debo. Gracias por tu inestimable ayuda en el laboratorio y por el apoyo moral que me has dado hasta el último día de que invertido en este proyecto. Por eso esta tesis es tan mérito tuyo como mío. Has

sido la mejor compañera que podría imaginar. Y durante los años de laboratorio tengo que agradecer también el apoyo de Toñi, Juana y Pepe, de la Sección de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia por facilitarme el trabajo en el laboratorio, no sólo por su incuestionable profesionalidad, sino también por el trato recibido. Ha sido un lujo contar vosotros todo este tiempo.

No me olvido del apoyo incondicional de todos mis compañeros de Departamento, aunque ya hayan tomado otros caminos. Pilar Gómez, Silvia Espín, Pedro J. Jiménez, Laura Ramón, Isabel Navas, Pedro María, Pepe Peñalver, Pablo Virosta, Jose Antonio, Alejandro Hernández, Alejandra Taliansky, Alessandro di Marzio, Irene Valverde, Diego Romero y, por supuesto, Antonio Juan y Emma Martínez, así como el resto de alumnos internos que están y han pasado por el Área de Toxicología del Departamento de Ciencias Sociosanitarias de la Universidad de Murcia. Cada uno habéis contribuido en distintas etapas y de diferente forma a que el día a día fuera más fácil, lo cual siempre es de agradecer.

Gracias al trabajo del Grupo de Investigación de Toxicología tuve la oportunidad de conocer el mundo de la ornitología de la mano de tres sus máximos representantes en la Región de Murcia: Mario León, Eloy Pérez y Jose Alfonso Lacalle. Vosotros me dísteis los motivos y la fuerza necesaria para seguir adelante con esta tesis en los momentos más difíciles. Cada uno a su manera, pero con la misma intención. Lo siento Eloy, yo he tardado demasiados años en *hablar*, y tú te fuiste demasiado pronto. Gracias por darme la motivación para cerrar esta etapa cuanto antes y poder dedicar tiempo a las amistades y a las aficiones.

Agradezco también la comprensión de todos aquellos amigos a los que descuidé *porque tenía que hacer la tesis*, y dejé de dedicarles tiempo. Gracias especialmente a Joaquín Amores, por estar ahí antes y durante la elaboración de mi tesis; pieza clave también para que pudiera finalizar este reto. Amigos como Aida Salas, Vicente Baró, toda la *Familia Trinchera* (Chema y Lucía, Javi y Julia, y Lucía B.) y el resto de mis amistades habéis contribuido a que esta tesis viera la luz, por eso, gracias.

Tras todos estos años de travesía *me llevo* una tesis y el convencimiento de que para alcanzar este tipo de retos (por pequeño que sea) es fundamental el apoyo de amigos y de la

familia, que aportan el equilibrio y estabilidad necesarios para lograrlos. Gracias a Fran Pagán, por tu tiempo, tu paciencia y por aportarme la tranquilidad necesaria para afrontar con calma la última etapa de la tesis, a pesar del estrés que ello lleva asociado. Has logrado que sea el periodo menos estresante de todas, increíble. Y, por supuesto, estaré eternamente agradecida a mis padres y mis hermanas por el apoyo incondicional desde el inicio. Siempre habéis sabido perdonar los *daños colaterales* de esta tesis. Gracias por la comprensión y por la fuerza que siempre me habéis dado.