



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE FARMACIA**

**EFFECTOS AGUDOS Y CRÓNICOS DE LA EXPOSICIÓN DEL PEZ
GUPPY HEMBRA (POECILIA RETICULATA) DURANTE LA GESTACIÓN
A FORMULACIONES HORMONALES ANTICONCEPTIVAS: UN
MODELO POTENCIAL PARA LA EVALUACIÓN DE XENOBIÓTICOS
EN ESTA ETAPA.**

PRESENTADO POR:

JURADO, LILIANA

4-789-458

LAM, KA LING

4-787-994

ASESORA:

DRA. LISBETH GÓMEZ

COASESORES:

DR. ORLANDO CÁCERES

M.SC. YEOVANY CARREÑO

DAVID, CHIRIQUÍ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE FARMACIA



**EFFECTOS AGUDOS Y CRÓNICOS DE LA EXPOSICIÓN DEL PEZ GUPPY
HEMBRA (POECILIA RETICULATA) DURANTE LA GESTACIÓN A
FORMULACIONES HORMONALES ANTICONCEPTIVAS: UN MODELO
POTENCIAL PARA LA EVALUACIÓN DE XENOBIÓTICOS EN ESTA ETAPA**

Presentado por:

JURADO, LILIANA

4-789-458

LAM, KA LING

4-787-994

**Tesis presentada a la Escuela
de Farmacia de la Facultad de
Ciencias Naturales y Exactas,
como parte de los requisitos
para optar por el Título de
Licenciatura en Farmacia**

ASESORA:

DRA. LISBETH GÓMEZ

COASESORES:

DR. ORLANDO CÁCERES

M.Sc. YEOVANY CARREÑO

DAVID, CHIRIQUÍ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Chiriquí bajo la dirección de la Doctora Lisbeth Gómez Martínez, en el marco del proyecto de Repatriación de talento de la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación, SENACYT-101-4-REP-09-003: "Disrupción endocrina: evaluación del riesgo potencial de disfunciones endocrinas en población humana y animal expuesta a contaminantes de aguas y alimentos en la Provincia de Chiriquí" del cual la Doctora Gómez es responsable.

RJ574826 e.1

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, por darme la fuerza necesaria para poder culminar con otra meta más en mi formación profesional; a mi madre Daira Abrego por apoyarme, impulsarme a ser mejor cada día, brindarme su cariño y amor incondicional, por enseñarme a nunca rendirme ante los obstáculos de la vida.

Liliana Jurado

A mis padres, Koo Chin y Qing Dian, y a mi tía, Huan Juan, por permitirme alcanzar este logro gracias a su inmenso amor, sacrificio y paciencia brindados en el transcurso de mi vida y preparación académica. A mi hermano Iván, por los momentos memorables que compartimos mientras crecíamos juntos; tu recuerdo permanecerá siempre en mi corazón.

Ka Ling Lam

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los profesores de la Escuela de Farmacia de la Universidad Autónoma de Chiriquí, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la carrera.

Nos gustaría reconocer de manera especial, a la Dra. Lisbeth Gómez, nuestra asesora de tesis, quien nos ha guiado pacientemente con sus consejos durante la realización de este trabajo.

Al Lic. Gustavo Hernández, por ayudarnos a obtener las cantidades que necesitábamos de peces guppy en todo momento y por sus recomendaciones en el mantenimiento de los mismos.

También agradecemos al Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma de Chiriquí por proporcionarnos la cristalería y equipos necesarios para el procedimiento de los ensayos.

A nuestras familias: Esta tesis no habría sido posible sin sus constantes palabras de aliento y apoyo incondicional, los que fueron nuestra motivación desde antes de iniciar este trabajo.

Finalmente, agradecemos a todos los que de una u otra manera han colaborado en la realización de esta tesis y nos brindaron su apoyo en nuestra formación profesional.

Liliana Jurado

Ka Ling Lam

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
CAPITULO I. MARCO INTRODUCTORIO	
1.1. Introducción	2
1.1.1. Disruptores endocrinos en peces	2
1.1.2. Pez guppy como biomarcador de disrupción endocrina	4
1.1.3. Los peces guppy como modelo para observar efectos durante la gestación	4
1.1.4. Fármacos como Disruptores Endocrinos en el ambiente acuático ..	5
1.2. Justificación e importancia de la investigación	6
1.3. Objetivo general	9
1.4. Objetivos específicos	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Sistema Endocrino	11
2.2. Disrupción Endocrina	12
2.3. Alteraciones endocrinas en peces por contaminantes ambientales	15
2.4. Reproducción en peces	18
2.5. Fármacos como contaminantes ambientales y Disrupción Endocrina	22

2.6. Sustancias Hormonales. Efectos sobre los ecosistemas	27
2.6.1. Estrógenos en el medio ambiente.....	28
2.6.1.1. Etinilestradiol (EE₂)	29
2.6.2. Progesterona	30
2.6.2.1. Mecanismo de acción de la Progesterona	31
2.6.2.2. Papel de la Progesterona en peces	33
2.6.2.2. Progestinas sintéticas	34
2.6.2.2.1. Mecanismo de acción de las progestinas	
sintéticas	35
2.6.2.2.2. Clasificación de las progestinas.....	36
2.6.2.2.3. Acetato de Medroxiprogesterona (MPA).....	40
2.6.2.2.3.1. Mecanismo de acción del Acetato de	
Medroxiprogesterona	41
2.6.2.2.3.2. Farmacocinética del Acetato de	
Medroxiprogesterona	43
2.7. Peces como biomarcadores de Disrupción Endocrina	44
2.8. Pez guppy (<i>P. reticulata</i>)	46
2.8.1. Características morfológicas del pez guppy	48
2.8.2. Hábitat y distribución del pez guppy	49
2.8.3. Reproducción del pez guppy	50
2.8.3.1. Selección sexual en el pez guppy	53
2.8.4. Los peces guppy como modelo para observar efectos durante la	
gestación	55

CAPITULO III. METODOLOGIA

3.1. Adquisición y acondicionamiento de los peces guppy.....	57
3.2. Preparación de las soluciones de Acetato de Medroxiprogesterona.....	58
3.3. Metodología general del ensayo biológico	59
3.3.1. Determinación de la toxicidad aguda en peces guppy hembras embarazadas	59
3.3.2. Determinación de la toxicidad crónica en los peces guppy después de la exposición	61
3.4. Consideraciones especiales.....	62

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros del medio utilizado en el bioensayo	65
4.2. Efectos agudos de la exposición de peces guppy hembras embarazadas a Acetato de Medroxiprogesterona.....	65
4.3. Efectos crónicos tras la exposición aguda de peces guppy hembras embarazadas a Acetato de Medroxiprogesterona.....	69

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.....	76
5.2. Recomendaciones.....	78
5.3. Referencias bibliográficas	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Probables efectos sobre la salud humana resultantes de la exposición a Disruptores Endocrinos.....	14
Figura 2. Esquema representativo del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada que regula el proceso reproductivo en peces	19
Figura 3. Rutas simplificadas de entrada de productos farmacéuticos en el ambiente	23
Figura 4. Estructura del 17- α -etinilestradiol	29
Figura 5. Acciones de la progesterona a través de las interacciones genómicas (clásicas) y no genómicas (no clásicas).....	32
Figura 6. Estructura del 17-acetato de medroxiprogesterona.....	40
Figura 7. Dimorfismo sexual en el pez guppy.....	48
Figura 8. Morfología externa de los machos y hembras guppy.....	50
Figura 9. Signos visibles de las etapas de la gestación del pez guppy hasta el alumbramiento	51
Figura 10. Lugar habilitado para la realización de los ensayos	58
Figura 11. Esquema de las concentraciones de Acetato de Medroxiprogesterona utilizadas en los ensayos	59
Figura 12. Modelo básico para la realización del bioensayo	60
Figura 13. Signos de embarazo en peces guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	69
Figura 14. Notable reducción del tamaño del vientre y mancha de gravidez observado después de dos semanas de la prueba de toxicidad aguda en peces guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales Características Fisiológicas de Glándulas y Hormonas del Sistema Endocrino.....	11
Tabla 2. Clasificación generacional y estructural de las Progestinas.....	37
Tabla 3. Taxonomía del <i>Poecilia reticulata</i>	47
Tabla 4. Condiciones y parámetros fisicoquímicos del agua recomendados para el adecuado mantenimiento de los peces guppy	57
Tabla 5. Condiciones y criterios de exposición del bioensayo de toxicidad aguda.....	61
Tabla 6. Efectos en peces guppy embarazadas en las pruebas de toxicidad aguda	65

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP_c	Adenosín monofosfato cíclico
BFC	Factor de bioconcentración
CBG	Globulina fijadora de corticosteroides
CL₅₀	Concentración Letal 50
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DE	Disruptor Endocrino
DES	Dietilestilbestrol
DIE	Dienogest
DSP	Drospirenona
E₂	Estradiol
EE₂	Etinilestradiol
ENG	Etonogestrel
FSH	Hormona folículo-estimulante
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GES	Gestodeno
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GTH	Gonadotropina hipofisiaria
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ITIS	Sistema Integrado de Información Taxonómica
K_{ow}	Coefficiente de reparto octanol-agua
LD₅₀	Dosis letal 50
LH	Hormona luteinizante
LLC	Limited Liability Company

LNG	Levonogestrel
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
MEP	Medroxiprogesterona
MGA	Acetato de Megestrol
MINSA	Ministerio de Salud de Panamá
MPA	Acetato de Medroxiprogesterona
mPR	Receptores membranales de Progesterona
NET	Norgestrel
NOMAC	Acetato de Nomegestrol
NTD	Noretisterona
NTDA	Acetato de Noretisterona
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PCBs	Bifenilos policlorados
ppm	Partes por millón
PR	Receptores de Progesterona
PRMC1	Componente 1 de la membrana del receptor de progesterona
PTAR	Plantas de tratamiento de aguas residuales
s.f.	Sin fecha
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
UNEP	United Nations Environment Programme (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente)
USGS	United States Geological Survey
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VTG	Vitelogenina
μS	Micro Siemens

RESUMEN

Por razones éticas, es muy difícil la evaluación de los efectos de cualquier sustancia durante el periodo de embarazo en humanos, por lo que modelos que simulen algunas características de esta etapa son de relevancia en la investigación de efectos a nivel reproductivo. Debido a su permanencia continua en el medio acuático y a su alta susceptibilidad a estresores exógenos, los peces son considerados como uno de los principales biomarcadores de la salud de los ecosistemas acuáticos.

El pez guppy (*Poecilia reticulata*) es una especie ovovivípara que se caracteriza por la procreación de crías vivas. Debido a esta peculiaridad, esta especie puede ser considerada como una alternativa importante para la evaluación de efectos de xenobióticos, muy especialmente aquellos causados por exposición durante la etapa de gestación.

Datos experimentales sugieren que las sustancias capaces de alterar el sistema hormonal conocidas como Disruptores Endocrinos (DEs), son altamente dañinas para la biota acuática. En consecuencia, la salud reproductiva de varias especies de peces puede verse afectada desfavorablemente. Múltiples evidencias también alertan sobre la alta contaminación del medio acuático por sustancias de origen farmacéutico y sus efectos sobre el Sistema Endocrino. Los medicamentos que contienen componentes hormonales merecen especial atención.

Las Progestinas Sintéticas son una gran familia de hormonas derivadas de la progesterona, que son ampliamente utilizadas en la anticoncepción humana y animal, y en terapias de reemplazo hormonal. Algunos estudios han documentado los efectos de disrupción endocrina de estos compuestos. Sin embargo, los efectos de estos fármacos sobre los ecosistemas acuáticos han sido muy poco estudiados.

Se evaluaron los efectos del Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) sobre la gestación del pez guppy. Se ensayó la toxicidad aguda en siete grupos de seis peces guppy embarazadas. Se expusieron a concentraciones de MPA: 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 50mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L y un grupo sin tratar (grupo control). Las concentraciones fueron preparadas a partir de formulaciones inyectables de

150 mg/mL de MPA, disueltas en solución salina normal al 0.9%. Para los ensayos, se siguieron los lineamientos de la OECD para pruebas de toxicidad en peces, y todas las actividades experimentales se realizaron con estricto apego a las normas de bioseguridad establecidas por el Equipo Técnico del Ministerio de Salud de Panamá (MINSA).

Con respecto a la toxicidad aguda en las 96 horas establecidas para el ensayo, no se presentó letalidad en ninguno de los grupos evaluados incluyendo el control. En los grupos de 2.5 y 5 mg/L no se observaron cambios conductuales significativos, en los grupos expuestos a concentraciones mayores, se presentó nado errático a las pocas horas de la exposición y luego, una disminución casi total de la actividad motora. Estos cambios fueron dependientes de la concentración.

Con respecto a los efectos sobre la gestación, todos los peces del grupo control procrearon sus crías, observándose el parto de dos peces después de las 48 horas (24 crías). En los siguientes 3 y 5 días, los cuatros peces restantes del grupo control, procrearon 41 crías. En este grupo nacieron 65 crías en total. Por el contrario, ninguno de los peces de los grupos expuestos al MPA parieron ninguna cría. Se observó reducción de la mancha de gravidez y del tamaño del vientre aproximadamente a los 7-10 días después de la exposición. Esto indica que la toxicidad a nivel reproductivo del MPA es alta, ya que se interrumpió totalmente la gestación a todas las concentraciones evaluadas, lo cual sugiere muerte de los productos y resorción fetal.

Aunque el mecanismo de la toxicidad reproductiva no puede deducirse en este estudio, si se consideran conjuntamente los cambios en la conducta motora observados, probablemente los efectos estén asociados con alguna manifestación de estrés oxidativo a nivel de diversos órganos en la homeostasis del pez guppy en la etapa de gestación.

Palabras claves: Disruptores endocrinos, progestinas sintéticas, Acetato de Medroxiprogesterona, pez guppy, gestación.

SUMMARY

For ethical reasons, the evaluation of the effects of any substance during pregnancy in humans is not permitted. Thus, the models that simulate some characteristics of this stage, are relevant in the investigation of reproductive effects, in special, those that alter the endocrine system in some way. Due to their continuous permanence in the aquatic system, and also due to their high susceptibility to exogenous stressors, fish are considered to be one of the main biomarkers of the health of aquatic ecosystems.

The guppies (*Poecilia reticulata*), are an ovoviviparous species characterized by the procreation of live offspring. For this reason, this species may be an important alternative in the evaluation of effects of xenobiotic compounds, particularly those considered to be caused by exposure during pregnancy.

“Endocrine Disruptors” are substances that have the ability to alter the hormonal system, and consequently, could be hazardous to the reproductive health of various fish species. Multiple lines of evidence call attention to the high contamination of the aquatic environment with substances of pharmaceutical origin and their deleterious effects on the Endocrine System. Drugs that contain hormonal components should be given particular attention.

Synthetic progestins are a large family of hormones derived from progesterone, which are widely used in human and animal contraception, and in hormone replacement therapies. Some studies have documented the endocrine disrupting effects of these compounds, however, there is still scarce knowledge about the effects of progestins on the aquatic biota.

The effects of Medroxyprogesterone Acetate (MPA) on gestation in guppy fish were evaluated. An acute toxicity test was conducted in seven groups of six pregnant female guppy fish, which were exposed to MPA concentrations of 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L and an untreated group (control group). Dilutions in 0.9% normal saline solution were prepared from 150 mg/mL injectable formulations of MPA. The tests were performed following the OECD guidelines for

toxicity tests in fish. Additionally, all experimental activities were carried out in strict adherence to the biosafety standards established by the MINSA Technical Team of Panama.

No individual in the control water group, nor in the different concentrations of MPA tested groups, died during the 96 hours after exposure in the acute toxicity test. Important behavioral changes dependent of the concentrations of MPA were also observed. There were no changes in the 2.5 and 5 mg/L treated groups, however, erratic swimming was observed in the groups exposed to median concentrations of MPA, and a significant reduction in the motor activity was observed at the higher concentrations.

With respect to the effects on the gestation, none of the fish in the MPA-exposed groups, gave birth to any offspring. In contrast, all the fish in the control group gave birth to live offspring. In this group, two fish deliver its offspring after 48 hours (24 offspring) and in the other 4 fishes of the control group, the delivery occurred 3 and 5 days after exposure (41 offspring). A total of 65 offspring were born in the control group. Reduction in abdomen size and disappearance of the dark gravid spot occurred between 7 to 10 days in all the fishes treated with MPA.

Our data indicates a high chronic toxicity of MPA on fish reproduction, since gestation was totally interrupted at all concentrations tested. These results suggest death and resorption of the products. The mechanism of the reproductive toxicity cannot be deduced in this study. Nevertheless, if the changes on the motor behavior are also considered in combination, there is likely an association with oxidative stress at some level in the homeostasis of pregnant guppy.

Keywords: Endocrine disruptors, synthetic progestins, Medroxyprogesterone Acetate, guppy fish, gestation.

CAPITULO I
MARCO INTRODUCTORIO

1.1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud define "Disruptor Endocrino" (DE) como una sustancia exógena contaminante del medio ambiente que incorporado al organismo causa efectos adversos, capaces de alterar el equilibrio hormonal de diversas especies, entre estas el ser humano (WHO/IPCS, 2002).

Los DEs producen efectos indeseables en especies expuestas a concentraciones en el orden de ng/L. Aunque son concentraciones relativamente bajas, la persistencia de estas sustancias en el ambiente, especialmente el acuático, puede dar lugar a una exposición crónica ya que son liberadas generalmente en forma continua, lo que puede alterar de múltiples formas la homeostasis de las especies. Debido a que los efectos de los DEs pueden a veces hacerse visibles en generaciones posteriores y no en los progenitores inicialmente expuestos, el establecimiento de relaciones causa-efecto es en algunos casos difícil de evaluar (Repetto & Repetto, 2009).

Los DEs incluyen no sólo a xenoestrógenos sino también a muchas sustancias que actúan sobre otros sistemas hormonales como el sistema tiroideo, sistema androgénico, hormonas pancreáticas, hormonas de la corteza suprarrenal, hormonas hipotalámicas e hipofisarias entre otras (Pombo *et al.*, 2020).

1.1.1. Disruptores endocrinos en peces

La reproducción en los peces está sujeta a múltiples estímulos del ambiente y de los propios organismos. La regulación de estos estímulos se lleva a cabo por el

sistema endocrino, el cual modula e integra todos los procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción. Estas especies son extremadamente sensibles a cambios en el ambiente hormonal por lo que aún bajas concentraciones de contaminantes que alteren principalmente la homeostasis de las hormonas estrogénicas o progestágenas, pueden afectar en forma importante su crecimiento y funciones reproductivas (Iannacone *et al.*, 1999).

Debido a su grado de exposición en las diferentes etapas del ciclo de vida, de la capacidad de acumular sustancias tóxicas, su papel dentro de la cadena trófica y la alta vulnerabilidad que presentan ante diversos xenobióticos, los peces son considerados como biomarcadores de la salud de los ecosistemas acuáticos. Generalmente son utilizados en el biomonitoreo mediante pruebas ecotoxicológicas que son de mucho valor en la evaluación de la contaminación de algunos ecosistemas (Iannacone & Alvaríño, 1998).

Hay que destacar que los peces suelen tener un ciclo de vida corto y producen huevos en grandes cantidades, proporcionando material que puede ser fertilizado externamente y fácilmente manipulable para obtener nuevas subespecies y mutaciones. Debido a que algunos huevos son transparentes, es relativamente fácil el seguimiento del desarrollo embrionario. Los bajos costos de cría y mantenimiento, con respecto a otras especies animales, añaden una ventaja económica. Por ello, constituyen valiosas herramientas biológicas en los estudios de toxicidad sobre los ecosistemas acuáticos.

1.1.2. Pez guppy como biomarcador de disrupción endocrina

El pez guppy (*Poecilia reticulata*) presenta un marcado dimorfismo sexual, es ovovivíparo, el intervalo de tiempo entre generaciones es corto, la determinación del sexo es bastante sencilla, la identificación de puntos finales de su desarrollo y su mantenimiento es relativamente fácil (Petrescu-Mag *et al.*, 2009). Son razones que hacen de ésta, una especie con alta potencialidad para la realización de estudios a nivel endocrino y reproductivo.

1.1.3. Los peces guppy como modelo para observar efectos durante la gestación

Las hembras guppy llevan los huevos en su vientre hasta el nacimiento de las larvas vivas. Ovulan cada tres días y el período de gestación dura aproximadamente 28 a 31 días. Los alevines alcanzan madurez sexual a los tres meses de nacidos. Las hembras durante la gestación engordan visiblemente y en su parte posterior externa al sitio donde se desarrollan los alevines, se forma gradualmente una mancha negra que puede servir como un marcador externo del progreso del embarazo. La viabilidad del embarazo en esta especie es dependiente en alta proporción de condiciones ambientales, tales como el clima, temperatura, calidad de las aguas, presencia de contaminantes entre otros. Cualquier alteración de algunas de estas condiciones puede causar efectos significativos en los parámetros reproductivos y por consiguiente también en la viabilidad de la especie.

1.1.4. Fármacos como Disruptores Endocrinos en el ambiente acuático

El problema de la contaminación de los ecosistemas por fármacos de alto consumo empezó a documentarse desde 1976 (Garrison *et al.*, 1976). Sin embargo, es a partir de la década de los 1990s cuando se empieza a reconocer ampliamente el grave impacto ecotoxicológico de esta contaminación (Daughton & Turner, 1999). Los esteroides hormonales empleados principalmente en la medicación anticonceptiva y en la terapia de reemplazo hormonal han sido especialmente asociados con múltiples alteraciones en peces (UNEP, 2013).

En las últimas décadas se ha incrementado, sobre todo en los países más industrializados, la incidencia de enfermedades del sistema reproductivo (infertilidad, malformaciones, pubertad precoz, entre otros), de cánceres (ovarios, mama, testículos, tiroides), y de enfermedades neurológicas, inmunológicas y metabólicas (síndrome metabólico, obesidad, diabetes). También se ha observado el declive de la capacidad reproductiva de las poblaciones de numerosas especies de animales silvestres, incluyendo invertebrados, anfibios, aves, peces, y mamíferos. Muchos de estos efectos se han asociado parcialmente con la alta contaminación ambiental con sustancias con propiedades hormonales las cuales tienen la propiedad de alterar el sistema endocrino (Jackson & Sutton, 2008).

Las principales sustancias hormonales sintéticas y hemisintéticas encontradas en el ambiente son estrógenos y progestinas. Son usadas comúnmente como componentes de las formulaciones anticonceptivas y en las de terapia de reemplazo hormonal. La mayoría de estas sustancias han mostrado afectar negativamente el

sistema endocrino de las especies expuestas, entre ellas los peces (Waring & Harris, 2005).

Entre las progestinas más usadas para estos fines se encuentran la Medroxiprogesterona y la Noretisterona (Kuhl, 2005).

1.2. Justificación e importancia de la investigación

Estudios previos realizados por el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma de Chiriquí, han documentado la presencia de fármacos de alto consumo en diferentes fuentes de agua superficiales en las zonas urbanas y rurales de la Provincia de Chiriquí (Arrieta, 2012; Rodríguez, 2015). Las concentraciones de estos fármacos encontradas en nuestro medio pueden compararse con las observadas en Estados Unidos y en países europeos, donde este tipo de contaminación es objeto de especial preocupación, debido a las importantes implicaciones que representan para la salud de la población humana y animal expuesta.

Los resultados de los monitoreos del uso de fármacos a nivel mundial, también es coincidente con los patrones de prescripción encontrados en la Provincia de Chiriquí, Panamá (Arrieta, 2012). Se ha observado que fármacos esteroideos de tipo hormonal, analgésicos y antibióticos se encuentran entre los principios activos más frecuentemente usados por la población de Chiriquí, lo que se refleja también por su presencia en las fuentes de agua de esta Provincia (Rodríguez, 2015; Arrieta, 2012; Gómez, datos no publicados).

El Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) es una progestina sintética que se usa ampliamente como anticonceptivo inyectable, como terapia para el cáncer de mama y en reemplazo hormonal (Hapgood, 2013). Se ha detectado Medroxiprogesterona en efluentes de aguas residuales en concentraciones de hasta 18 ng/L (Chang *et al.*, 2009) y en aguas superficiales de hasta 1 ng/L (Kolodziej *et al.*, 2004). En un estudio realizado en el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Universidad del Norte de Texas (Peterson *et al.*, 2008), se observó que el MPA puede inhibir el crecimiento de larvas de *Pimephales promelas* en concentraciones menores de 500 µg/L durante un período de exposición de 7 días.

El pez guppy (*Poecilia reticulata*) es un pez ovovivíparo en el cual se han estudiado algunos aspectos de la exposición a sustancias xenobióticas, pero muy especialmente por sus efectos en peces machos (Georgescu & Georgescu, 2012). Sin embargo, por ser un pez ovovivíparo el pez guppy puede ser también un modelo de gran relevancia en la observación de efectos tanto agudos como crónicos de DEs durante la etapa crítica del desarrollo embrionario y en diferentes fases del proceso reproductivo. Esto representaría un gran valor predictivo, ya que, por restricciones obvias, la evaluación de efectos de contaminantes durante la etapa de gestación es muy difícil de evaluar en humanos. Modelos animales que puedan documentar algunos efectos de la exposición tanto aguda como crónica de sustancias durante esta etapa constituyen una temática de investigación de alta relevancia en la actualidad.

En base a estas consideraciones el objetivo principal de este estudio fue proponer un modelo con peces guppy gestantes en el cual sea posible evaluar con adecuada

sensibilidad los efectos de contaminantes ambientales, principalmente fármacos hormonales de alta prescripción en nuestro país sobre la salud reproductiva en peces.

Existen pocos estudios en el que se evalúen efectos de la exposición a fármacos hormonales en peces hembras durante la gestación, por lo que considerar la posibilidad del pez guppy como modelo reproductivo es de gran interés e importancia farmacológica y ecotoxicológica.

Objetivos

1.3. *Objetivo General*

Utilizar una especie de peces ovovivíparos locales, peces guppy (*Poecilia reticulata*) hembras en estado de gestación, como posible modelo para evaluar los efectos de contaminantes ambientales sobre parámetros ecotoxicológicos principalmente endocrinos y reproductivos.

1.4. *Objetivos Específicos.*

- 1.4.1. Proponer peces guppy en estado de gestación, para evaluar algunos patrones farmacológicos y toxicológicos de fármacos presentes en los ecosistemas acuáticos, sobre parámetros agudos y crónicos durante la etapa de gestación.
- 1.4.2. Determinar patrones de toxicidad agudos y crónicos de la exposición de peces *Poecilia reticulata* (pez guppy) a sustancias de tipo progestinas durante la gestación.

CAPITULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. Sistema endocrino

El Sistema Endocrino es un conjunto de órganos y tejidos que liberan al flujo sanguíneo mensajeros químicos denominados hormonas. Las hormonas son las encargadas de la transmisión de información entre los diferentes órganos y tejidos que integran el sistema endocrino y son moduladores de la homeostasis general del organismo.

Tabla 1. Principales Características Fisiológicas de Glándulas y Hormonas del Sistema Endocrino

Glándula	Hormona	Acción-regulación
Hipotálamo	Factores liberadores	Estimulación y/o inhibición de la actividad hipofisiaria
Hipófisis	Tiotropina	Estimula el Tiroides
	Adrenocorticotropa	Estimula la corteza de las cápsulas suprarrenales
	Folículo estimulante	Maduración del folículo ovárico, formación de espermatozoides
	Prolactina	Secreción de leche en las mamas
	Antidiurética	Regulación de la producción de orina
	Oxitocina	Contracciones uterinas, producción de leche en las mamas
Tiroides	Tiroxina	Metabolismo celular, desarrollo del sistema nervioso
	Calcitonina	Niveles de calcio en sangre
Paratiroides	Parathormona	Niveles de calcio en sangre y orina
Corteza suprarrenal	Cortisol	Metabolismo de las grasas
Médula suprarrenal	Adrenalina	Prepara el organismo frente a situaciones de estrés
Páncreas	Insulina	Niveles de azúcar en sangre (reduce concentración)
	Glucagón	Niveles de azúcar en sangre (eleva concentración)
Ovarios	Estrógenos	Ciclo menstrual, caracteres sexuales secundarios femeninos
	Progesterona	Desarrollo del endometrio
Testículos	Testosterona	Desarrollo caracteres sexuales secundarios masculinos, formación de espermatozoides

Fuente: Proyecto Biosfera, s. f. (Modificado por Jurado & Lam, 2023).

2.2. Disrupción Endocrina

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), un Disruptor Endocrino (DE) es una sustancia exógena contaminante del medio ambiente que al incorporarse al organismo causa efectos adversos, capaces de alterar el equilibrio hormonal de diversas especies, entre estas el ser humano (WHO/IPCS, 2002).

Las acciones biológicas de las hormonas endógenas, tales como los estrógenos, progesterona, testosterona y tiroxina, son mediadas por proteínas receptoras de alta afinidad localizadas en el interior de las células diana. La interacción de una hormona con su receptor inicia procesos que llevan a una gran cantidad de efectos asociados con cada hormona en particular. El efecto de los DEs puede dar lugar a un bloqueo, una activación o una inhibición de la acción hormonal (Repetto & Repetto, 2009), efectos que pueden relacionarse principalmente con los siguientes mecanismos de acción:

- Mimetizar la acción de la hormona al unirse a su receptor específico, desencadenando la activación de la transcripción de los genes de respuesta a esta hormona lo que puede dar lugar a:
 - Activación o bloqueo de la hormona.
 - Modificar la síntesis y el metabolismo, por lo que pueden alterarse los niveles fisiológicos de estas.
- Alterar los niveles de los receptores hormonales.

Los DEs producen efectos indeseables en especies expuestas a concentraciones en el orden de ng/L. Aunque son concentraciones relativamente bajas, la

persistencia de estas sustancias en el ambiente puede dar lugar a una exposición crónica, puesto que la gran mayoría tiene una vida media relativamente larga y son liberados continuamente en el ambiente. La exposición a DEs no ocurre de manera aislada, por el contrario, en el medio ambiente se presentan mezclas de múltiples sustancias químicas y cabe la posibilidad de que puedan interactuar entre sí, ya sea inhibiendo, sumando o potenciando sus efectos. De esta manera la homeostasis de las especies expuestas puede alterarse de múltiples formas.

El momento de la exposición en el organismo determina el carácter, la gravedad y la evolución de los efectos, además muchos de los DEs son bioacumulativos lo cual dificulta la determinación del periodo de exposición. También hay que tener en cuenta que los efectos de los DEs pueden no hacerse visibles de forma inmediata, y muchas veces se manifiestan en la descendencia y no en los progenitores. Esto contribuye a la complicación en el establecimiento de relaciones causa-efecto de los DEs.

Actualmente, se conocen muchas sustancias químicas que tienen el potencial de perturbar el sistema endocrino de los organismos cuando son vertidas al medio ambiente. Entre ellas se incluyen bifenilos policlorados (PCBs) y dioxinas utilizados en la industria pesada; pesticidas organoclorados como clorpiritos, metoxicloro, DDT (2,2-bis-(p-clorofenil) -1,1,1-tricloroetano); fungicidas (vinclozolina), plásticos y plastificantes (bisfenol-A y ftalatos); metales (cadmio, plomo, mercurio, uranio, arsénico) y productos farmacéuticos como el dietilestilbestrol (DES) e incluido más recientemente, el paracetamol (Pombo *et al.*, 2020).

Existen múltiples evidencias sobre la posible relación entre disrupción endocrina y determinados cambios en el metabolismo, desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos expuestos a los mismos (Jackson & Sutton, 2008). En humanos, a partir de estudios epidemiológicos se han asociado los DEs a diferentes alteraciones y enfermedades. Varios de estos efectos han sido observados experimentalmente en modelos animales. Algunas de las más importantes se encuentran mencionadas en la Figura 1.

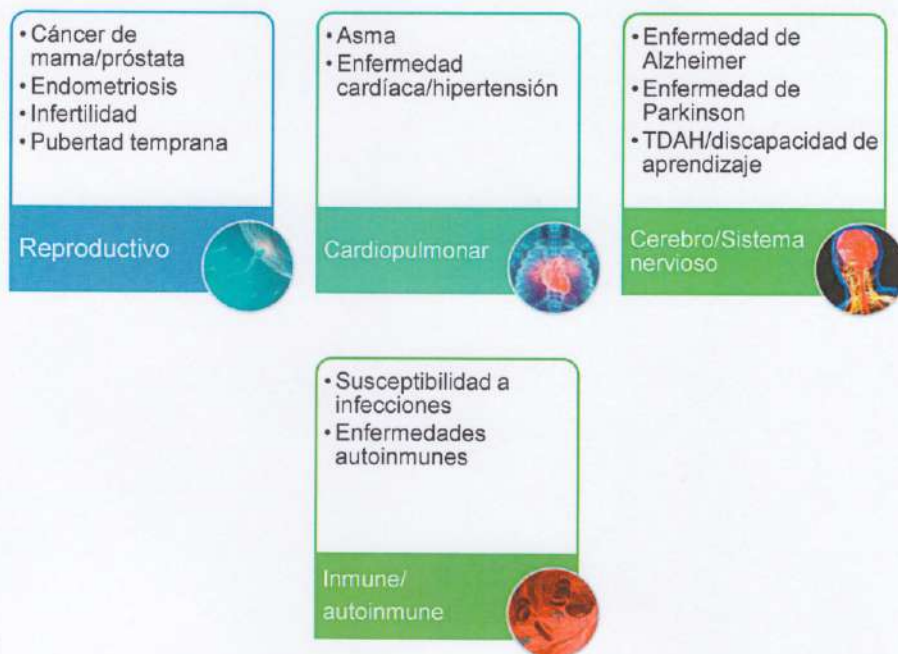


Figura 1. Probables efectos sobre la salud humana resultantes de la exposición a Disruptores Endocrinos. Fuente: World Health Organization *et al.*, 2013 (Modificado por Jurado & Lam, 2023).

Debido principalmente a la complejidad tanto de la exposición como de las manifestaciones de estas enfermedades existe aún mucha controversia sobre la relación que existe entre los DEs y la etiología de las mismas.

Al igual que en el ser humano, la exposición a estos químicos también ha sido asociada con alteraciones del estado endocrino de numerosas especies y poblaciones animales. Estas respuestas son influidas por las particularidades que presentan cada filo y/o clase, así como por el hábitat, tipo de alimentación, posición en la cadena trófica y complejidad del sistema endocrino, todo lo cual explica las diferencias en los efectos observados entre distintas especies. Un grupo de animales vertebrados que se ven especialmente afectados por DEs son los peces (Pait & Nelson, 2002; Waring & Harris, 2005).

2.3. Alteraciones endocrinas en peces por contaminantes ambientales

Los ecosistemas acuáticos son muy vulnerables. No solo reciben gran cantidad de contaminantes directamente, sino también aquellos depositados en el suelo que son arrastrados por las precipitaciones hasta los cauces hídricos y son llevados posteriormente hasta el mar, ya sea desde fuentes puntuales, como las plantas de tratamiento de aguas residuales, o de fuentes no puntuales, como la escorrentía agrícola y urbana. Consecuentemente, los ecosistemas acuáticos reciben una amplia variedad de compuestos de diferente naturaleza que pueden dar lugar a un gran número de efectos negativos sobre la vida acuática, lo que constituye una amenaza para la vida de muchas especies, y directa o indirectamente puede impactarse también la salud humana (UNESCO, 2006).

Los compuestos DEs tienen el potencial de perturbar las vías hormonales sensibles que regulan las funciones reproductivas en los peces. Esto puede resultar en una disminución de la fertilidad, la producción de huevos en las hembras, reducción del

tamaño de las gónadas, feminización de los machos y hermafroditismo (Jobling *et al.*, 1996).

En 1993, se publicó por primera vez un estudio sobre los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces debidas a DEs. Los peces machos encontrados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentaban alteraciones en las características sexuales masculinas, como la feminización en algunos de ellos y la producción de vitelogenina (VTG) en el hígado, una proteína sintetizada por las hembras como respuesta a una señal estrogénica. Varias sustancias químicas, en especial los alquilfenoles, encontrados en detergentes y plásticos se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes (Jobling *et al.*, 1996).

Numerosos estudios de laboratorio (Purdom *et al.*, 1994; Kime *et al.*, 1999; Mills & Chichester, 2005) han permitido evaluar el impacto de la exposición a contaminantes ambientales en peces y sus efectos en el desarrollo ovárico. Se han descrito efectos como la inhibición en el desarrollo y la maduración de oocitos, el aumento de atresia folicular, maduración y producción anormal de huevos, machos con ovotestis, intersexualidad, tamaño gonadal reducido, reducción del índice gonadosomal e histología gonadal. Se han presentado, además, alteraciones de la función tiroidea, disminución de la fertilidad, disminución del éxito en la incubación, alteraciones morfológicas, anormalidades metabólicas y feminización.

Según Vajda *et al.* (2008), se observaron alteraciones endocrinas en peces expuestos a aguas residuales que contenían una mezcla compleja de

contaminantes con actividad endocrina, lo que sugiere posibles efectos aditivos de estas mezclas.

Otro estudio documentó (Schoenfuss *et al.*, 2008), los efectos complejos de la exposición de los peces al nonilfenol, un producto de degradación de los tensioactivos utilizados en grandes cantidades en los detergentes comerciales y domésticos. Los científicos informaron que el comportamiento reproductivo de los machos expuestos al nonilfenol variaba significativamente con el nivel de exposición. Las dosis bajas estimularon a los machos para la competencia reproductiva, mientras que las exposiciones más altas inhibieron su comportamiento.

Datos experimentales de diversos estudios apoyan la hipótesis de que los DEs en el medio ambiente acuático, impactan la salud reproductiva de varias especies de peces. Sin embargo, se necesitan más estudios que determinen si las poblaciones de peces están expresando cambios en la conformación de la población a consecuencia de la exposición a DEs (Mills & Chichester, 2005). La relación entre la disrupción endocrina y su el impacto ecológico sobre la sostenibilidad de peces, consecuente al deterioro reproductivo, permanece, con pocas excepciones, como un desafío de investigación (Bridges & Bridges, 2004).

2.4. Reproducción en peces

La fisiología reproductiva de los vertebrados es similar en estructura y función. De igual manera, los procesos de biosíntesis de las hormonas esteroideas también están bien conservadas en vertebrados, tanto mamíferos como no mamíferos (Mills & Chichester, 2005). Sin embargo, particularidades en aspectos de la fisiología reproductiva de los peces podrían explicar algunas diferencias en las respuestas de estas especies a los DEs.

La reproducción en peces es un proceso regulado por factores ambientales cíclicos como el fotoperiodo y la temperatura. Sin embargo, el éxito de la misma no sólo depende de la sincronización de las especies con las variaciones de los factores ambientales, sino que es preciso que se produzca también una sincronización de los diferentes órganos entre sí, de forma que maduren simultáneamente. Los sistemas nervioso y endocrino actúan conjuntamente en el desarrollo adecuado de todos estos procesos, los cuales requieren múltiples y complejas interacciones que tienen lugar a lo largo del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada (Carrillo *et al.*, 2009).

El órgano pineal es una estructura neuroendocrina, que en peces desempeña una importante función en la percepción de la información del fotoperiodo y de la temperatura, y en la codificación de ésta en señales nerviosas (neurotransmisores) y neuroendocrinas (melatonina) (Falcón *et al.*, 2007). Esta información es suministrada al hipotálamo y la hipófisis para estimular o inhibir la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias, que regulan a su vez la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal, así como otros procesos implicados en la reproducción como se muestra en la Figura 2.

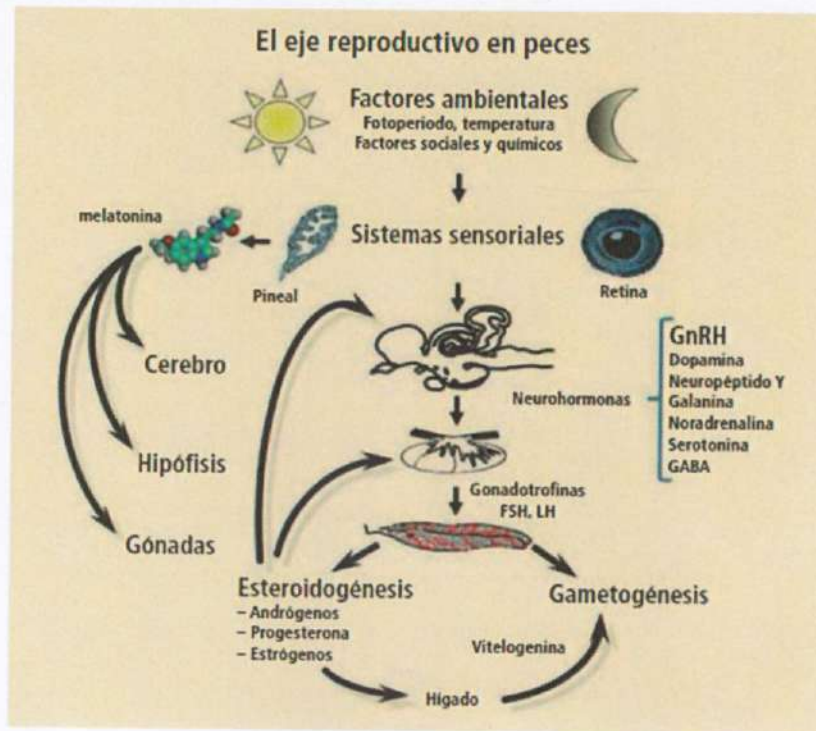


Figura 2. Esquema representativo del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada que regula el proceso reproductivo en peces (Fuente: Carrillo *et al.*, 2009).

La expresión génica y los niveles de las gonadotropinas en la hipófisis y en el plasma varían a lo largo del ciclo reproductor e incluso entre los géneros (Swanson *et al.*, 2003). Los estudios muestran que la hormona foliculo-estimulante está presente a lo largo de todo el ciclo y se incrementan los niveles durante la oogénesis y la postovulación en hembras, y durante la espermatogénesis temprana y postespermioagénesis, en machos. Por el contrario, los niveles de la hormona luteinizante en plasma son casi indetectables durante las primeras fases de desarrollo gonadal y presentan un pico durante la fase de maduración final de oocitos y la ovulación en hembras, y durante la espermiogénesis y espermiación en machos (Swanson, 1991; Prat *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1999).

La toxicidad para el desarrollo y la reproducción puede ocurrir durante el desarrollo larval o la etapa juvenil o adulta. La exposición a un agente disruptor, en una etapa temprana puede provocar alteraciones en los procesos claves del desarrollo, como la diferenciación sexual, así como una mayor susceptibilidad a las agresiones químicas en la edad adulta. La mayoría de los estudios se han centrado en las respuestas mediadas por receptores de estrógenos, y se ha prestado menos atención a los cambios resultantes de la interferencia de la función hipotálamo-pituitaria (Jobling *et al.*, 2006). A este nivel las hormonas tiroideas que están también bajo un control hipotalámico-pituitaria desempeñan un papel importante en los procesos reproductivos.

En los peces, las hormonas tiroideas suelen estar elevadas durante el desarrollo gonadal y los procesos reproductivos de última etapa, como en la gametogénesis, ovulación y espermiación. Existe un sistema de comunicación entre el sistema endocrino e inmunológico produciendo una inmunosupresión o alteración de la función celular inmunitaria, lo que a su vez puede provocar efectos reproductivos adversos (Carrillo *et al.*, 2009). Las hormonas esteroideas que regulan los procesos reproductivos incluyen andrógenos y progestágenos, estas hormonas son esenciales para los procesos reproductivos en peces machos y hembras.

El 17- α -etinil-estradiol (EE₂), uno de los estrógenos sintéticos más utilizados en el tratamiento anticonceptivo, origina una disminución de la eficacia reproductora en los organismos acuáticos al inducir la expresión de genes dependientes de estrógenos por interacción y activación del receptor de estrógenos (Oropesa, 2008). En los peces, uno de estos genes es el de la vitelogenina.

La VTG es una fosfolipoproteína sérica precursora de la formación de la yema de huevo. Se sintetiza mediante la estimulación de los receptores estrogénicos del hígado, por acción de la hormona 17- β -estradiol (E_2), o por compuestos xenoestrógenos (caso del EE_2). En hembras maduras, la VTG es un componente principal de las proteínas sanguíneas. Sin embargo, en machos no está presente en cantidades perceptibles, a excepción de que estos hayan estado expuestos a DEs de tipo estrogénico. Por lo tanto, la inducción de la síntesis de VTG en machos es considerada un biomarcador de exposición a compuestos estrogénicos (Kime *et al.*, 1999).

La reproducción es una función clave para la supervivencia de cualquier especie. Alteraciones en la reproducción puede ser el resultado de amenazas directas o indirectas sobre cualquier proceso fisiológico, como podría ser la alteración de la homeostasis de las hormonas relacionadas con la reproducción, tal es el caso de los compuestos DEs (León-Olea *et al.*, 2014).

Históricamente, se ha dado mayor énfasis a los efectos de disrupción sobre las funciones estrogénicas. Sin embargo, diversos estudios (Pombo *et al.*, 2020) han demostrado que todos los sistemas hormonales, y consecuentemente el organismo y la homeostasis general pueden ser afectados por los DEs. Disfunciones a nivel de las funciones de la progesterona, andrógenos, hormonas tiroideas, insulina, y sistema inmune, han sido adecuadamente documentadas (UNEP, 2013).

2.5. Fármacos como contaminantes ambientales y Disrupción Endocrina

Los medicamentos tienen un papel importante en el tratamiento y la prevención de enfermedades tanto en humanos como en animales. Sin embargo, debido a la propia naturaleza de estos, también pueden tener efectos no deseados en animales, plantas y diversos organismos que resulten expuestos dentro de los ecosistemas. Aunque los efectos secundarios en la salud humana y animal se han investigado en forma exhaustiva, el posible impacto sobre la salud de la biota de los ecosistemas, derivados de la fabricación, el uso de medicamentos y su liberación al medio ambiente, no han sido considerados de forma similar, por lo que en la actualidad este es un tema de creciente interés a nivel mundial por las agencias regulatorias de salud (Fent *et al.*, 2006).

El alcance de este problema no debe subestimarse. Una amplia gama de medicamentos incluidos antibióticos, estatinas, fármacos utilizados contra el cáncer, agentes hormonales y muchos otros medicamentos de uso humano y veterinario, tales como antibacterianos, antifúngicos y parasiticidas, se producen y utilizan en el rango de miles de toneladas por año y pueden estar contribuyendo al estrés sobre el medio ambiente, sobre todo porque a menudo llegan directamente a los suelos y las aguas superficiales y en muchos casos no son procesados primeramente en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Una revisión global reciente informó (Aus der Beek *et al.*, 2016) que, de 713 productos farmacéuticos analizados en el medio ambiente, 631 se encontraron por encima de sus límites de detección. Se detectaron residuos de 16 sustancias

farmacéuticas en las aguas superficiales, potables y subterráneas de todas las regiones de la ONU. El diclofenaco, analgésico ampliamente utilizado tanto para aplicaciones humanas como veterinarias, es el fármaco detectado con mayor frecuencia en muestras ambientales a nivel mundial. Otras 4 sustancias farmacéuticas se han encontrado en el medio ambiente casi con tanta frecuencia como el diclofenaco. Estas son la carbamazepina (antiepiléptico), el sulfametoxazol (antibiótico), el ibuprofeno y el naproxeno (ambos analgésicos). Otros grupos terapéuticos que se han detectado en el medio ambiente incluyen los estrógenos,

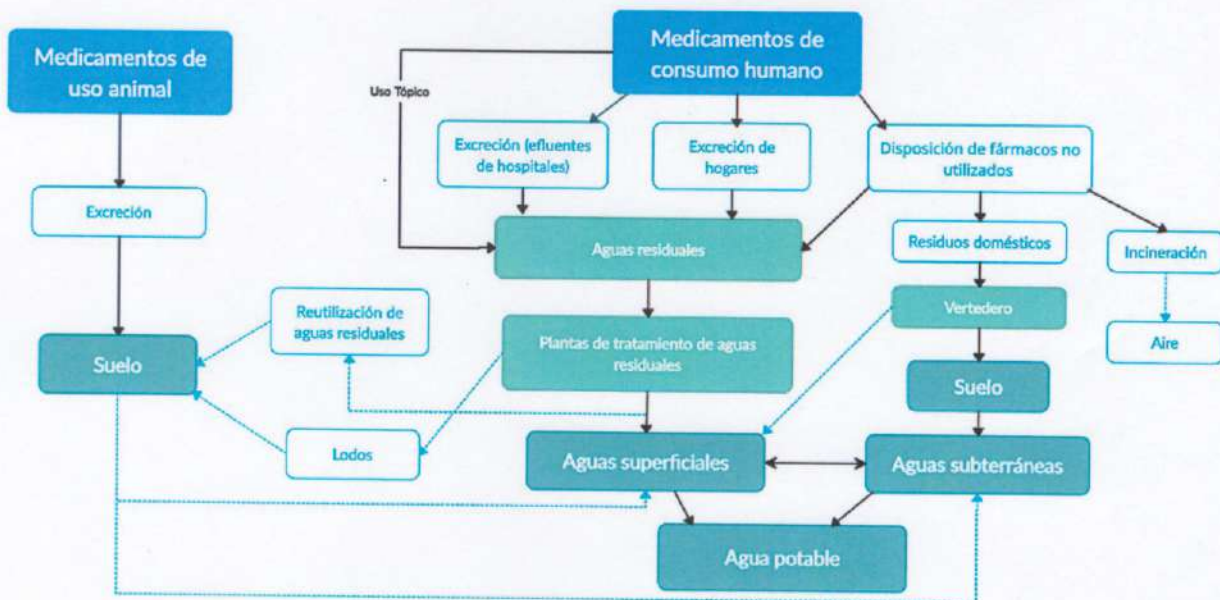


Figura 3. Rutas simplificadas de entrada de productos farmacéuticos en el ambiente (Fuente: Correia & Marcano, 2005).

En un estudio realizado en Alemania (Scheytt *et al.*, 2005), se encontró que hasta 16 mil toneladas de productos farmacéuticos se eliminan anualmente como producto de la atención médica humana, y entre el 60% y el 80% de estos

medicamentos son mal eliminados, arrojándose por el inodoro o colocándose en la basura doméstica normal. Además de los costos ambientales, estas acciones tienen importantes impactos económicos adversos. En el Reino Unido, por ejemplo, los costos estimados, relacionados con la mala disposición de los residuos de los medicamentos, documentados por el Servicio Nacional de Salud oscilan entre £100 millones y £300 millones al año (National Audit Office, 2019).

Un estudio de la UNESCO de 2017 titulado “Productos farmacéuticos en el medio acuático de la región del mar Báltico” destacó que la vía principal de los productos químicos hacia los ecosistemas acuáticos es a través de las descargas de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.

Este estudio de la UNESCO destaca, además, que solo nueve de 118 productos farmacéuticos evaluados se eliminaron de las aguas residuales durante los procesos de tratamiento con una eficiencia de más del 95%, y casi la mitad de los compuestos se eliminaron solo parcialmente con una eficiencia de menos del 50%. Las descargas de las instalaciones de fabricación de productos farmacéuticos aumentan sustancialmente la carga farmacéutica en las aguas residuales representando una fuente importante de contaminación ambiental (UNESCO & HELCOM, 2017).

Según Qiting & Xiheng (1988), Bisarya & Patil (1993), Holm *et al.* (1995), hubo indicios tempranos dispersos señalando que los residuos de la fabricación son una fuente de principios activos farmacéuticos en el medio ambiente, pero en ese momento estos estudios recibieron poca atención. El descubrimiento de estrógenos

en los efluentes de aguas residuales como causa de la feminización de los peces a fines de la década de 1990, despertó el marcado interés actual en el papel de los fármacos de uso humano y veterinario en esta contaminación.

Aunque los vínculos entre causa y efecto son controversiales, y a menudo difíciles de precisar, existe un consenso generalizado de que los compuestos químicos derivados de los desechos medicamentosos tienen impactos dañinos en los invertebrados, vertebrados y en la estructura y función de los ecosistemas (Patel *et al.*, 2019).

Se reconoce además que una multitud de factores dificulta la evaluación completa de este impacto. Es posible que muchos organismos estén experimentando impactos menos obvios por los desechos farmacéuticos, que pueden pasar desapercibidos a menos que la búsqueda se realice en forma específica. Igualmente, es posible que el seguimiento y la evaluación de sustancias individuales puedan inducir a error ya que se subestima la toxicidad agregada de las sustancias que se mezclan en muchos productos farmacéuticos o que se mezclan cuando son arrojados a los diferentes ecosistemas (European Environment Agency, 2010).

La presencia de una gran variedad de productos farmacéuticos en el medio acuático se ha vuelto cada vez más evidente a medida que han mejorado las técnicas analíticas. Aunque las concentraciones de algunos de estos compuestos, detectadas individualmente son aparentemente bajas para causar efectos adversos agudos, la exposición continua y la presencia simultánea de un gran número de las mismas, hace necesario evaluar el riesgo, no sólo de sustancias individuales sino

también de las múltiples combinaciones de sustancias con diferentes mecanismos de acción, que pueden inducir o potenciar efectos indeseables en poblaciones expuestas (UNESCO & HELCOM, 2017).

Además, teniendo en cuenta que muchos organismos acuáticos se encuentran expuestos de manera crónica a efluentes de aguas residuales, es probable que los datos de las pruebas de toxicidad aguda sean inadecuados para predecir todos los riesgos ecotoxicológicos a los que están expuestos (Huggett *et al.*, 2004, Ankley *et al.*, 2007).

Se carece de datos de toxicidad crónica de productos farmacéuticos en especies acuáticas, especialmente con respecto a posibles alteraciones en la función endocrina (Fent *et al.*, 2006; Sanderson & Thomsen, 2009; Christen *et al.*, 2010). Los datos de toxicidad crónica para posibles compuestos DEs es de particular importancia, debido a que estos pueden provocar efectos adversos durante un periodo prolongado de tiempo aún en concentraciones muy bajas (Brian *et al.*, 2005, Durhan *et al.*, 2006). Además, es de considerar que la exposición de múltiples generaciones de organismos acuáticos a algunos DEs puede causar cambios genéticos y epigenéticos en el desarrollo y la reproducción lo cual también ha sido documentado (Cripe *et al.*, 2010).

Existen evidencias sobre efectos de disrupción endocrina de productos farmacéuticos muy especialmente de los componentes de los agentes anticonceptivos, relacionado al efecto estrogénico que poseen. Estas sustancias pueden afectar a los organismos acuáticos alterando el funcionamiento normal de

las hormonas, como ocurre con los peces que han sido expuestos a niveles extremadamente bajos de estradiol y etinilestradiol (0,1 a 10 ng/l) (Céspedes *et al.*, 2004).

2.6. Sustancias Hormonales. Efectos sobre los ecosistemas

Como mensajeros químicos las hormonas juegan un papel fundamental en la regulación de todas las funciones de los organismos vivos. Debido a que los receptores hormonales son sistemas altamente preservados en la mayoría de los organismos, las sustancias que actúan a nivel de estos receptores pueden afectar no sólo a los humanos, sino también a una gran variedad de especies, muy especialmente a los peces considerando la persistencia de la exposición (UNEP, 2013).

Se ha postulado que las hormonas naturales son más fácilmente degradables en el ambiente que las de origen sintético o semisintético. Estas últimas, tienen una vida media más prolongada en el ambiente y pueden presentar por consiguiente mayores efectos indeseables en los humanos y en los diferentes ecosistemas (UNEP, 2013).

En las últimas décadas se ha incrementado la incidencia de enfermedades del sistema reproductivo (infertilidad, pubertad precoz, entre otros), de cánceres (ovarios, mama, testículos, tiroides), y de enfermedades neurológicas, inmunológicas y metabólicas (síndrome metabólico, obesidad y diabetes). Además, se ha observado el declive de la capacidad reproductiva de numerosas poblaciones

de especies de la fauna silvestre. Muchos de estos efectos se han asociado parcialmente con la alta contaminación ambiental con sustancias hormonales las cuales tienen la propiedad de alterar el sistema endocrino (Jackson & Sutton, 2008).

Las principales sustancias hormonales sintéticas y semisintéticas encontradas en el ambiente son estrógenos y progestinas. Son usadas comúnmente como componentes de las formulaciones anticonceptivas y en las de terapia de reemplazo hormonal. La mayoría de estas sustancias han mostrado afectar negativamente el sistema endocrino de las especies expuestas, entre ellas los peces.

2.6.1. Estrógenos ambientales

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas femeninas cuya molécula está basada en la estructura del fenantreno. Son sintetizadas principalmente en los ovarios, en la placenta durante el embarazo, y también en menores cantidades en células adiposas y en la corteza adrenal (Kuhl, 2005).

La mayoría de los estrógenos están presentes de forma natural en los vertebrados e invertebrados. Cuando los seres humanos y la vida silvestre se exponen a concentraciones mayores de las que se producen de manera normal en el organismo, se generan efectos adversos en su sistema endocrino. Los tratamientos usados como reemplazo hormonal, para la regulación del ciclo menstrual, o los métodos anticonceptivos son una fuente posible de exposición de los seres humanos a altas concentraciones de estrógeno (Racz & Goel, 2010).

En humanos, las concentraciones no fisiológicas de estrógenos pueden incrementar el riesgo de cáncer de mama, uterino y testicular (Cavalieri, *et al.*, 2000; Dimogerontas & Liapi, 2014). Los efectos biológicos se producen por interacción de los DEs con receptores de estrógenos o por efectos a nivel del metabolismo de los mismos (Hileman, 1994).

En la mayoría de las fuentes de agua del mundo, tres derivados estrogénicos son los principales contaminantes. El 17-β estradiol y la Estrona son los productos naturales más encontrados ya que son producto del metabolismo de los estrógenos tanto en animales como en humanos. Sin embargo, el estrógeno sintético 17-α etinilestradiol es responsable del 90% de la contaminación por estrógenos en las fuentes de agua a nivel mundial (Racz & Goel, 2010).

2.6.1.1. Etinilestradiol (EE₂)

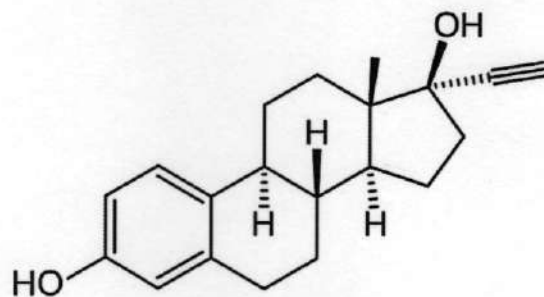


Figura 4. Estructura del 17-α-etinilestradiol (Fuente: Dominio público).

Se han implementado una variedad de modificaciones en la estructura química de los estrógenos naturales con el fin de aumentar la biodisponibilidad y la eficacia cuando son administrados por vía oral. El EE₂ es el estrógeno sintético más usado en el tratamiento anticonceptivo y también en la terapia de reemplazo hormonal. En

consecuencia, constituye aproximadamente el 90% de la actividad estrogénica encontrada en la mayoría de las fuentes de agua del mundo (Oropesa, 2008). Por su hábitat, los peces están expuestos al ambiente acuoso en forma continua, y consecuentemente tienen alta probabilidad de exposición al EE₂.

Se ha demostrado que los peces tienen aún más receptores para estrógenos que los humanos, lo que puede estar relacionado con los resultados de varios estudios que han mostrado que el EE₂ puede alterar la vida reproductiva de diferentes especies de peces aún a muy bajas concentraciones, afectar el material genético y la fertilidad, y ser causa de la disminución significativa de individuos en poblaciones expuestas (Kidd *et al.*, 2007).

2.6.2. Progesterona

La progesterona, conjuntamente con el estradiol, es una de las principales hormonas femeninas. Es una hormona esteroidal derivada del colesterol, sintetizada primariamente en el cuerpo lúteo en el ovario, pero también en la placenta durante el embarazo y en forma secundaria en la corteza adrenal, tejido adiposo y en las células de Leydig en los testículos humanos (Taraborrelli, 2015).

La progesterona juega un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento del embarazo en humanos y otras especies (Spencer & Bazer, 2002). Participa en la preparación del endometrio para el embarazo, la regulación de funciones uterinas específicas durante el ciclo menstrual y la implantación del embrión. Además de las funciones que lleva a cabo durante el embarazo, la progesterona desempeña

funciones importantes en la maduración meiótica de los ovocitos, la plasticidad del desarrollo posnatal de la glándula mamaria y la motilidad de los espermatozoides (Conneely *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2009).

2.6.2.1. Mecanismo de Acción de la Progesterona

La progesterona y las progestinas sintéticas ejercen sus diversas acciones a través de interacciones genómicas con los receptores de progesterona intracelular (PR), los cuales existen en las dos isoformas, receptor de progesterona A (PAR) y receptor de progesterona B (PRB); e interacciones no genómicas rápidas con receptores de progesterona en la membrana celular (mPR) (Kuhl, 2005).

La unión de un progestágeno al receptor da como resultado la dimerización y la interacción con un elemento sensible a hormonas dentro de los genes diana regulados por hormonas. En general, PRA puede actuar como represor transcripcional y PRB como activador. El PRA puede reprimir no solo la actividad transcripcional del PRB, sino también la del receptor de estrógeno, el receptor de andrógenos y los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides (Giangrande & McDonnell, 1998).

En la mayoría de los tejidos, la acción biológica de los progestágenos depende de la presencia de estrógenos, ya que los estrógenos desempeñan un papel clave en la inducción del receptor de progesterona, mientras que los progestágenos regulan la disminución en la expresión del receptor de estrógeno (Kuhl, 2005).

Además del efecto en los PR, la progesterona es un agonista de los receptores de progesterona de membrana (mPR). También es antagonista del receptor de

mineralocorticoide (potente efecto antimineralocorticoide) y agonista del receptor de glucocorticoide (débil glucocorticoide) (Rupprecht *et al.*, 1993).

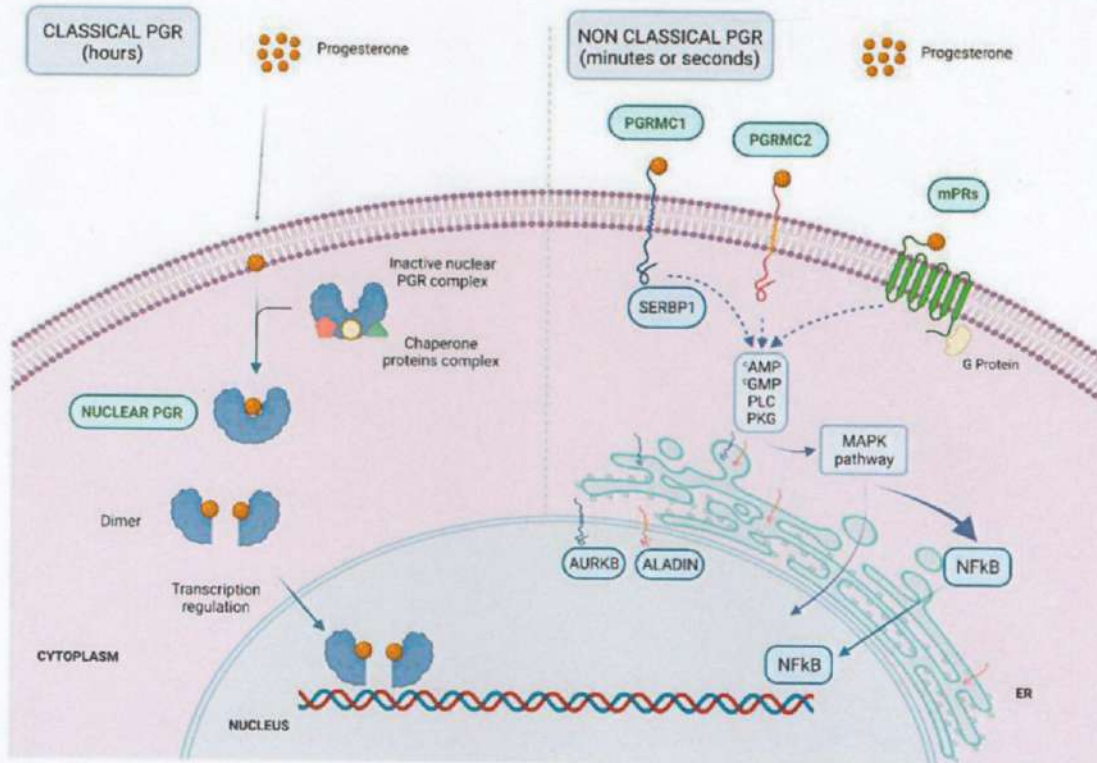


Figura 5. Acciones de la progesterona a través de las interacciones genómicas (clásica) y no genómicas (no clásica). ALADIN: adracalin; cAMP: adenosín monofosfato cíclico; AURKB: aurora quinasa B; cGMP: guanosín monofosfato cíclico; MAPK: vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos; mPRs: receptores de progesterona membranales, NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; PGRMC1: componente 1 de membrana del receptor de progesterona; PGRMC2: componente 2 de membrana del receptor de progesterona; PKG: proteína quinasa G; PLC: fosfolipasa C; SERBP1: proteína de unión al ARN del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (Fuente: Medina-Laver *et al.*, 2021).

Según Medina-Laver *et al.* (2021), la señalización clásica inducida por el progestágeno a los receptores de progesterona (PR) conduce a la unión al ligando de la progesterona y posterior disociación de la proteína chaperona, formando un dímero que se transloca al núcleo para unirse a secuencias de elementos de

respuesta dentro de regiones promotoras de genes para alterar su actividad transcripcional. Las vías no genómicas inducen efectos rápidos, donde la progesterona a través de receptores de membrana (mPR), componente 1 de membrana del receptor de progesterona (PRMC1), activan cascadas de mensajeros secundarios y regulan la transcripción de genes. El PR puede ser transportado a la membrana plasmática, por medio de la quinasa Src para activar la vía de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los mPR alteran la transcripción de genes regulada por segundos mensajeros (AMP_c y Ca^{2+}) a través de la cascada de transducción de señales MAPK, para dar lugar a la fosforilación de factores de transcripción nuclear (Figura 5).

Aparte de su actividad como hormona esteroide, la progesterona es un neuroesteroide. Específicamente, es un antagonista del receptor sigma-1, un modulador alostérico negativo de los receptores nicotínicos de acetilcolina, y, a través de sus metabolitos activos alopregnanolona y pregnanolona, es un potente modulador alostérico positivo del receptor $GABA_A$, el principal receptor de señalización del neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA) (Paul & Purdy, 1992).

2.6.2.2. Papel de la Progesterona en peces

En peces hembra, la progesterona desempeña un papel fundamental en la ovogénesis (Miura *et al.*, 2007), la regulación de la maduración de los ovocitos (Nagahama & Yamashita, 2008) y, en algunas especies está relacionada con la ovulación (Pinter & Thomas, 1999). Además, está asociada con la motilidad de los espermatozoides (Tubbs & Thomas, 2008) y con el inicio de la espermiación (Ueda

et al., 1985) en peces macho. La gonadotropina (GTH) inicia la maduración meiótica de los ovocitos de peces al actuar sobre las células foliculares ováricas. Esta acción hace que las células foliculares produzcan la hormona inductora de la maduración, una sustancia que interactúa directamente con el ovocito para desencadenar la maduración del ovocito. Se han identificado dos de estas hormonas, 17,20 β -dihidroxipregn-4-en-3-ona (17,20 β -P) (Berg *et al.*, 2005) y 17,20 β ,21 -trihidroxipregn-4-en-3-ona (17,20 β ,21-P) (Thomas & Das, 1997).

2.6.2.3. Progestinas sintéticas

Las progestinas sintéticas imitan de cerca a la progesterona natural, y son usadas en forma destacada como agentes antifertilidad y en el reemplazo hormonal. En términos generales, las progestinas sintéticas son más potentes que la progesterona natural en humanos (Besse & Garric, 2009) y pueden actuar no solo por interacción con el receptor de progesterona, sino también a nivel de otros receptores nucleares como el de estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides, por lo que muchos de los efectos colaterales indeseables que puedan presentar se deben a la afinidad particular por alguno de estos receptores (Kumar *et al.*, 2015).

Como muchos otros fármacos, las progestinas tienen mecanismos de acción que se conservan entre los sistemas de mamíferos y teleósteos (Huggett *et al.*, 2004). Debido a que los progestágenos sintéticos tienen la capacidad de imitar los progestágenos naturales en los peces y, por lo tanto, interrumpir los procesos reproductivos y de desarrollo, estos compuestos, cuando están presentes en el ambiente, pueden representar un riesgo para la fauna acuática.

Estudios indican que las progestinas sintéticas son capaces de inhibir la reproducción en *Pimephales promelas* en concentraciones tan pequeñas de hasta 0,8 ng/L (Zeilinger *et al.*, 2009) e inhibir por completo la reproducción en concentraciones que oscilan entre 85 y 100 ng/L (Runnalls *et al.*, 2013). El levonorgestrel, una progestina de uso común, indujo efectos androgénicos en el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) en concentraciones ≥ 40 ng/L (Svensson *et al.*, 2013).

Aunque la mayoría de los estudios toxicológicos han centrado su atención en efectos estrogénicos, la mayoría de las fórmulas anticonceptivas usan la combinación de estrógeno/progestágeno (Erkkola & Landgren, 2005). Es probable que existan progestágenos sintéticos en el medio ambiente en concentraciones más altas que los estrógenos, debido a que los medicamentos anticonceptivos suelen contener de 3 a 100 veces más progestágeno que estrógenos en sus formulaciones (Zeilinger *et al.*, 2009).

2.6.2.3.1 Mecanismo de acción de las progestinas sintéticas a nivel de la reproducción

Las progestinas sintéticas previenen el embarazo a través de varios mecanismos diferentes dentro de varios tejidos y órganos. Uno de esos mecanismos es través de la inhibición de los picos de la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que estimulan la ovulación (Flores-Herrera *et al.*, 2008).

El estradiol proporciona retroalimentación positiva a la distribución hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), responsable de estimular la

producción de la FSH y la LH en la glándula pituitaria, que a su vez determina la maduración y liberación del óvulo (Richter *et al.*, 2002). Las progestinas sintéticas interrumpen la retroalimentación positiva del estradiol hacia el hipotálamo, lo que disminuye la liberación de FSH y LH por la hipófisis anterior. Los niveles reducidos de FSH inhiben el desarrollo folicular. La inhibición del desarrollo folicular junto a la ausencia de un pico de LH, impiden la ovulación (Letterie, 1998).

Las progestinas sintéticas también pueden prevenir el embarazo a través de cambios en el moco cervical. Estos cambios incluyen la reducción de la cantidad de mucosidad producida a mitad del ciclo, el aumento del espesor de la mucosidad y el contenido celular, y la alteración de la estructura molecular de la mucosidad, contribuyendo a inhibir la motilidad y la penetración de los espermatozoides en el canal cervical (McCann & Potter, 1994).

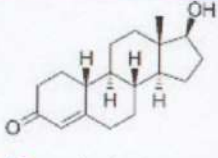
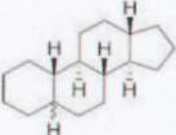
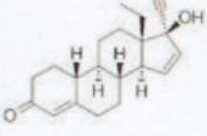
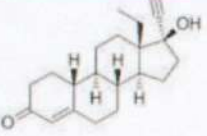
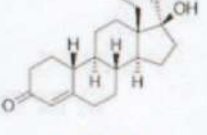
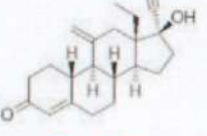
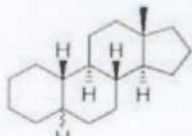
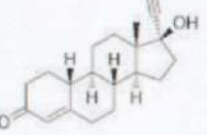
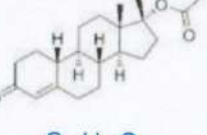
Las progestinas sintéticas también impiden la implantación del óvulo al inhibir el desarrollo y la actividad del endometrio (Erkkola & Landgren, 2005). Finalmente, las progestinas sintéticas pueden reducir el número de cilios y la frecuencia e intensidad de la acción de los cilios sobre el epitelio tubárico, inhibiendo así el transporte del óvulo fertilizado desde el oviducto hasta el útero (McCann & Potter, 1994; Flores-Herrera *et al.*, 2008).

2.6.2.3.2. Clasificación de las progestinas

Las progestinas generalmente se clasifican en base a su derivación estructural o por generaciones de acuerdo a su introducción en el mercado (Tabla 2). Sin embargo, el sistema de clasificación más relevante es en función de la molécula de

esteroide a partir de la cual se crearon; es decir, testosterona, progesterona y espironolactona (Apgar & Greenberg, 2000).

Tabla 2. Clasificación generacional y estructural de las Progestinas.

Hormona	Familia	Nombre común	Estructura y fórmula molecular	Generación y actividad
Derivados de la testosterona  19-nortestosterona	Gonanos (C ₁₇) 	Gestodeno (GES)	 C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Tercera 1986 (+++)
		Levonogestrel (LNG)	 C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Segunda 1966 (+++)
		Norgestrel (NET)	 C ₂₁ H ₂₈ O ₂	Segunda 1966 (+++)
		Etonogestrel (ENG)	 C ₂₂ H ₂₈ O ₂	Tercera 1998 (+)
	Estranos (C ₁₈) 	Noretisterona (NTD)	 C ₂₀ H ₂₆ O ₂	Primera 1951 (++)
		Acetato de Noretisterona (NTDA)	 C ₂₂ H ₂₈ O ₃	Primera 1951 (++)

			Dienogest (DIE)	 <chem>C22H28O2</chem>	Cuarta 1978 (-)
Derivados de la progesterona	 19-norprogesterona	Norpregnanos (C ₂₀)	Acetato de Nomegestrol (NOMAC)	 <chem>C23H30O4</chem>	Cuarta 1986 (-)
	 17α- hidroxiprogesterona	Pregnanos (C ₂₁)	Medroxiprogesterona (MEP)	 <chem>C22H32O3</chem>	Primera 1957 (+)
			Acetato de Medroxiprogesterona (MPA)	 <chem>C24H34O4</chem>	Primera 1957 (+)
			Acetato de Megestrol (MGA)	 <chem>C22H30O4</chem>	Primera 1963 (-)
Derivados de la espirolactona	 Espironolactona		Drospirenona (DSP)	 <chem>C24H30O3</chem>	Cuarta 1976 (-)

Efectos androgénicos en humanas: (+++) alto; (++) medio; (+) bajo; (-) sin efectos androgénicos
(Fuente: Rocha & Rocha, 2022)

La mayoría de las progestinas más antiguas se diseñaron durante las décadas de 1960 y 1970 y tienen efectos antigonadotróficos. De los derivados de testosterona, los gonanos tienen efectos androgénicos elevados (Mathur, 2008). Por el contrario, el etonogestrel (ENG), metabolito biológicamente activo del desogestrel, es un

agonista del PR, mostrando una baja actividad androgénica y efectos glucocorticoides simultáneos (Hohmann & Creinin, 2007).

Los estranos tienen actividad androgénica media, sin embargo, el dienogest (DIE), clasificado como una progestina de cuarta generación, es altamente específico para el PR y no tiene actividad androgénica (Katsuki *et al.*, 1996).

Los derivados de la progesterona estrechamente relacionados con la 19-norprogesterona se denominan moléculas progestacionales "puras" ya que se unen casi exclusivamente al PR y no interfieren con otro receptor de esteroides (Sitruk-Ware, 2004).

Dentro de las progestinas derivadas de la 17-hidroxiprogesterona, el Acetato de medroxiprogesterona (MPA) y su metabolito medroxiprogesterona (MEP) tienen una ligera acción androgénica y ejercen actividad glucocorticoide cuando se administran en dosis altas (Bullock & Bardin, 1977). El acetato de megestrol (MGA) tiene un 50% menos de efectos glucocorticoides que el MPA. Estas progestinas también actúan en áreas específicas del hipotálamo como moléculas antiandrogénicas. Esta acción controla el comportamiento sexual masculino y el marcaje con orina, típico de varios animales (Seksal, 2008).

Por lo general, las progestinas más recientes derivadas de la progesterona, no presentan actividad androgénica, estrogénica o glucocorticoide. Estos se diseñaron para imitar los beneficios de la progesterona sin los efectos indeseables de las progestinas más antiguas, como el acné, la disminución del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la retención de líquidos (Sitruk-Ware, 2004).

La drospirenona (DSP) es un antagonista de la aldosterona derivado de la espironolactona. El efecto principal de este último es su actividad antimineralocorticoide, lo que provoca una disminución de la retención de sal y agua, lo que conduce a una presión arterial más baja y a la ausencia de efectos androgénicos (Murphy *et al.*, 2004).

En la actualidad, las formulaciones más nuevas suelen contener progestágenos más potentes, como DIE, ENG y DSP, debido a su especificidad para los receptores de progesterona y la falta de efectos androgénicos (Allen *et al.*, 2016).

2.6.2.3.3. Acetato de medroxiprogesterona (MPA)

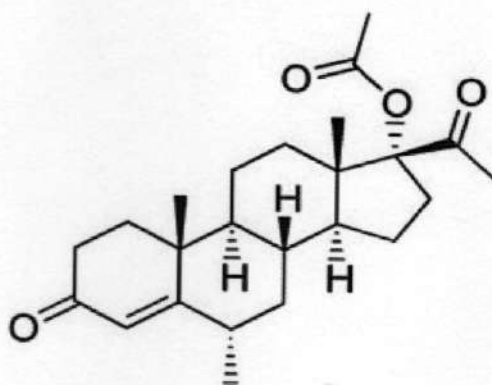


Figura 6. Estructura del 17-acetato de medroxiprogesterona (Fuente: Dominio público).

El Acetato de Medroxiprogesterona es una progestina sintética que se usa ampliamente como anticonceptivo inyectable y como terapia para el cáncer de mama y de reemplazo hormonal (Hapgood, 2013).

El MPA es relativamente hidrófobo, su coeficiente de partición en octanol-agua ($\log K_{ow}$) es de 4,09. Esto permite alta afinidad por la porción lipídica de los

organismos y la consiguiente capacidad de bioacumulación (Lindenmaier *et al.*, 2005).

Se ha detectado MPA en efluentes de aguas residuales en concentraciones de hasta 18 ng/L (Chang *et al.*, 2009) y en aguas superficiales de hasta 1 ng/L (Kolodziej *et al.*, 2004). En los mamíferos, se ha demostrado que esta progestina interactúa con los receptores de progesterona (Winneker *et al.*, 2003), de andrógenos (Bentel *et al.*, 1999) y de estrógenos (Di Carlo *et al.*, 1983).

En un estudio realizado por Peterson *et al.* (2008) se observó que el MPA puede inhibir el crecimiento de larvas de *Pimephales promelas* en concentraciones menores de 500 µg/L durante un período de exposición de 7 días.

2.6.2.3.3.1. Mecanismo de acción del Acetato de Medroxiprogesterona

El MPA es un agonista de los receptores de progesterona, andrógenos y glucocorticoides. Tiene poca afinidad por el receptor de estrógeno y una afinidad relativamente alta por el receptor de mineralocorticoides, pero no tiene actividad mineralocorticoide o antimineralocorticoide (Kuhl, 2005).

El MPA es un potente agonista del receptor de progesterona con afinidad y eficacia similares a la progesterona. El MPA y su análogo desacetilado, la Medroxiprogesterona, son agonistas del PR, pero la afinidad y potencia del MPA es aproximadamente 100 veces mayor. Por ello, a diferencia del MPA, la Medroxiprogesterona no se usa clínicamente (Pullen, 2006).

Al igual que otros anticonceptivos de solo progestágenos, el MPA inhibe el desarrollo folicular y previene la ovulación como mecanismo de acción principal

(Letterie, 1998). Estos anticonceptivos también presentan un mecanismo de acción secundario mediante la inhibición de la penetración de los espermatozoides por cambios en el moco cervical (McCann & Potter, 1994). La inhibición de la función ovárica durante el uso de MPA hace que el endometrio se vuelva delgado y atrófico. Estos cambios en el endometrio podrían, en teoría, impedir la implantación. Sin embargo, debido a que el MPA es altamente efectivo para inhibir la ovulación y la penetración de los espermatozoides, la posibilidad de fertilización es mínima.

El MPA puede suprimir los ejes hipotálamo-pituitario-suprarrenal e hipotalámico-pituitario-gonadal, lo que resulta en niveles reducidos de gonadotropinas, andrógenos, estrógenos, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y cortisol (Genazzani & Petraglia, 1993). Los niveles de andrógenos se ven afectados por el MPA y puede producir fuertes efectos antiandrogénicos, por lo que se usa en el tratamiento de afecciones dependientes de andrógenos, como la pubertad precoz y la hipersexualidad en varones. Además, dado que también suprime los niveles de estrógeno, el MPA puede producir fuertes efectos antiestrogénicos de manera similar y se ha utilizado para tratar afecciones dependientes de estrógeno, como la pubertad precoz en niñas y la endometriosis en mujeres. No obstante, el uso de MPA en formulaciones sin estrógenos, presenta un riesgo de disminución de la densidad mineral ósea y otros síntomas de deficiencia de estrógeno (Stuart *et al.*, 2007).

El MPA es un potente agonista de los receptores de andrógeno y la activación de este desempeña un papel importante en la acción antigonadotrópica y los efectos contra el cáncer de mama del MPA (Poulin *et al.*, 1989). Se ha documentado que el

MPA puede producir efectos secundarios en mujeres relacionados a su actividad androgénica, tales como acné e hirsutismo (Aronson, 2009).

A diferencia de otras progestinas relacionadas, como el MGA y el Acetato de Ciproterona, el MPA no es un antagonista del receptor de andrógenos y no tiene actividad antiandrogénica directa (Kuhl, 2005).

Como agonista del receptor de glucocorticoides, el MPA tiene actividad glucocorticoide y, como resultado, puede causar síntomas relacionadas con el síndrome de Cushing (Merrin & Alexander, 1990), diabetes esteroidea e insuficiencia suprarrenal en dosis suficientemente altas. La actividad glucocorticoide relativa del MPA se encuentra entre las más altas de las progestinas utilizadas clínicamente (Kuhl, 2005).

2.6.2.3.3.2. Farmacocinética del Acetato de Medroxiprogesterona

El MPA se administra por vía oral, intramuscular y subcutánea. Alcanza las concentraciones máximas en el plasma entre las 2-4 horas después de la administración oral, en las 3 primeras semanas después de la inyección intramuscular y aproximadamente una semana después de la inyección subcutánea. La biodisponibilidad del MPA por vía oral es de aproximadamente 100% y se favorece con la administración del fármaco con alimentos.

En el plasma, aproximadamente el 90% de la dosis absorbida están ligadas a proteínas, principalmente albúmina; no se une a la SHBG ni a la globulina fijadora de corticosteroides (CBG) (Kuhl, 2005).

Diversos estudios indican que la vida media de eliminación del MPA por vía oral es de 11,6 a 16,6 horas mientras que las vidas medias de eliminación de la inyección intramuscular son de 50 días y 40 de la vía subcutánea.

El MPA es metabolizado extensamente en el hígado por las enzimas del citocromo P450 (principalmente CYP3A4). Se han identificado al menos 16 metabolitos y la mayoría de estos son excretados en la orina como glucorónidos conjugados con solo pequeñas cantidades excretadas como sulfatos.

Estudios clínicos muestran una reducción significativa en la eliminación de la MPA en pacientes con cirrosis hepática y en insuficiencia renal, por lo que es necesario el ajuste de dosis (ANMAT, 2007).

2.7. Peces como biomarcadores de Disrupción Endocrina

Los peces se han utilizado en la investigación científica durante mucho tiempo. Su uso es menos común que el de otros animales como las ratas, pero a partir de la década de 1960 se ha observado un creciente interés por el conocimiento de estas especies y su papel en la naturaleza. Los peces representan las clases más antiguas y diversas de vertebrados. Comprenden alrededor del 48% de las especies conocidas en el subfilo *Vertebrata* (Altman, 1974). Los peces viven en una amplia variedad de hábitats, de agua dulce a salada, de mares polares fríos a arrecifes tropicales cálidos y de aguas superficiales poco profundas a las intensas presiones de las profundidades del océano.

Esta variedad de especies es una fuente de materia biológica útil en la investigación de diversas áreas científicas. Los peces se utilizan como modelos experimentales en toxicología ambiental, genética, cáncer, biomedicina, neurobiología, endocrinología, ecología, gerontología, acuicultura y en general como herramienta para obtener información básica de su biología. Una ventaja de este modelo animal en la investigación científica se correlaciona con algunas de sus peculiares características, entre estas, hay que destacar que suelen tener un ciclo de vida corto, producen grandes cantidades de huevos, proporcionando material que puede ser fertilizado externamente y fácilmente manipulable para obtener nuevas cepas o mutantes. Debido a que algunos huevos son transparentes, el desarrollo embrionario puede ser monitoreado con relativa facilidad (Bolis *et al.*, 2001).

Además, los bajos costos de cría y mantenimiento, con respecto a sus homólogos mamíferos, aves, reptiles o anfibios, representan una ventaja económica. Históricamente, estas ventajas y la importancia económica de algunos peces los ha convertido en modelos favoritos para tales estudios y se ha documentado la embriología detallada de muchas especies (Bolis *et al.*, 2001).

Debido a la gran diversidad de este grupo de vertebrados es imposible identificar una sola especie como modelo de prueba ideal. Se han utilizado muchas especies de peces diferentes para ensayos de letalidad a corto plazo, pero se ha empleado una gama mucho más pequeña de especies en las pruebas de toxicidad durante su ciclo de vida ya sea parcial o completo. Debido a que los DEs pueden causar efectos subletales a largo plazo y no solo efectos agudos, estudios de toxicidad crónica han sido poco evaluados en peces (Ankley & Johnson, 2004).

Los salmónidos como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que han recibido atención histórica con respecto a la investigación toxicológica en América del Norte y Europa no son propicios para las pruebas de ciclo de vida completo o parcial debido a su ciclo de vida comparativamente largo y su gran tamaño. Debido a este tipo de restricciones logísticas, la mayoría de las pruebas toxicológicas actuales en peces utilizan especies pequeñas (generalmente de agua dulce) como el *Pimephales promelas*, el medaka (*Oryzias latipes*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Ankley & Johnson, 2004).

Aunque el énfasis actual en las pruebas e investigaciones de DEs recae en pequeñas especies de peces de laboratorio, no se debe pasar por alto la importancia de incluir otras especies de peces de agua dulce o marinas en estas investigaciones (Jobling *et al.*, 1998; Folmar *et al.*, 2000; Katsiadaki *et al.*, 2002).

2.8. Pez guppy (*P. reticulata*)

El pez guppy (*Poecilia reticulata*) es un pez tropical originario de América del Sur que actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo. Es una de las especies más populares de los acuarios de agua dulce. Los machos son conocidos por sus aletas caudal y dorsal coloridas y ornamentadas, y son una especie que puede tolerar una amplia gama de cambios de condiciones en el medio acuático.

El pez guppy posee características biológicas y reproductivas que lo hacen una especie con alta potencialidad para realizar estudios sobre efectos a nivel endocrino y reproductivo. Ofrece fácil identificación de puntos finales de desarrollo, su atención

y mantenimiento es relativamente fácil, presenta un marcado dimorfismo sexual, es ovovivíparo y se reproduce con facilidad. Además, el intervalo de tiempo entre generaciones es corto y la determinación del sexo es bastante sencilla (Petrescu-Mag *et al.*, 2009).

Tabla 3. Taxonomía del *Poecilia reticulata*

Filo	Chordata (Animales con notocordia, cordón nervioso dorsal y hueco, y hendiduras branquiales).
Clase	Actinopterygii (Peces modernos u óseos con esqueleto de huesos).
Orden	Cyprinodontiformes (Agrupan peces de pequeño tamaño, mayormente de agua dulce; presentan marcado dimorfismo sexual; son peces distribuidos principalmente en América, África y Asia).
Familia	Poeciliidae (Peces de agua dulce que retienen los huevos dentro del cuerpo).
Género	Poecilia
Especie	<i>P. reticulata</i>

(Fuente: ITIS, s.f.)

En investigaciones a nivel reproductivo, el pez guppy tiene la ventaja que pare vivas sus crías. Este proceso es dependiente en alta proporción de condiciones ambientales tales como el clima, temperatura, calidad de las aguas, presencia de contaminantes entre otros, por lo que desviaciones de algunas de estas condiciones pueden causar efectos significativos en los parámetros reproductivos y por consiguiente en la viabilidad de la especie (Georgescu & Georgescu, 2012).

2.8.1. Características morfológicas del pez guppy

El guppy es un pez pequeño que presenta un evidente dimorfismo sexual. Los machos son significativamente más pequeños que las hembras, miden solo 1,5-3,5 cm de largo. Las hembras son del doble de tamaño, aproximadamente 3-6 cm de longitud.

Las hembras generalmente son de color aceituna o gris y solo presentan color en su aleta dorsal y caudal. Por otro lado, los machos varían sus características sexuales secundarias como el tamaño del cuerpo y cola, manchas de pterina y carotenoides (anaranjados, rojo y amarillo), melanina (negros) y colores estructurales (azul iridiscente, verde y plateado). Los componentes de color de las manchas varían en tamaño, forma y posición.



Figura 7. Dimorfismo sexual en el pez guppy (Fuente: Fabian, 2019).

A través de la cría selectiva de guppies, se producen una variedad de cepas caracterizadas por distintos colores, patrones, formas y tamaños de aletas. En la especie silvestre la aleta caudal es redondeada, pero se han generado diferentes

variedades con colas en forma de abanico, triángulo, lira, espada, aguja, bandera, entre otras. Además, las variedades domésticas suelen tener un tamaño corporal más grande y están mucho más ornamentados que las especies silvestres (*Poecilia reticulata* Peters, 1860, s. f.).

Los machos de *P. reticulata* presentan un órgano reproductor llamado gonopodio, que es una aleta anal delgada modificada, ubicada directamente detrás de la aleta ventral. En las hembras, la aleta anal es redondeada. Es fácil su detección, por lo tanto, la recolección de esperma en esta especie no es difícil.

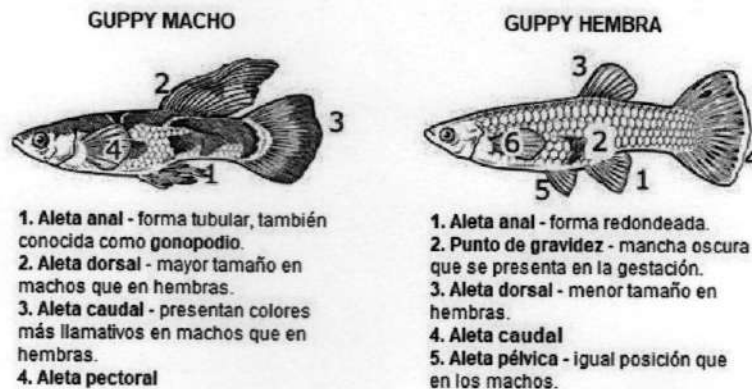


Figura 8. Morfología externa de los machos y hembras guppy (Modificado de *Guppy fish: Characteristics, types, reproduction and more*, 2020).

2.8.2. Hábitat y distribución del pez guppy

Descrita originalmente en Venezuela y Barbados en 1859 y 1861, respectivamente, la especie es nativa de muchos otros países del Caribe y del norte de América del Sur (Farr, 1975; Magurran, 2005). Es una especie tropical, confinada a ambientes cálidos relativamente cerca del Ecuador. Desde su descubrimiento, se ha

introducido en muchas partes del mundo y ahora es común en todos los continentes incluyendo la Antártida.

Los peces guppy han colonizado prácticamente todos los hábitats de agua dulce disponibles para ellos en su área de distribución natural. En particular, abundan en los arroyos de las regiones costeras. Tienden a habitar arroyos y estanques más pequeños dentro de cuerpos de agua más grandes.

P. reticulata puede tolerar una amplia gama de temperaturas (18-28 °C) y salinidades, incluyendo aguas salobres y muy salinas que han logrado colonizar y habitar (Chervinski, 1984). Aunque se recomienda mantenerlos a temperaturas entre los 22 °C y 28 °C, es posible criarlos a temperatura ambiente, si ésta no se desvía mucho de este intervalo.

En áreas no nativas, los guppies se encuentran comúnmente como la única especie en cuerpos de agua altamente contaminadas (Barua *et al.*, 2001).

2.8.3. Reproducción del pez guppy

Las hembras guppy son ovovivíparas. Desarrollan los huevos en su vientre hasta el nacimiento de las larvas vivas. Ovulan cada tres días y el período de gestación dura aproximadamente entre 28 y 31 días, a 25 y 27 °C y dependiendo de otros factores ambientales.

Como en todos los poecílidos, la fertilización es interna. Los guppies machos transfieren a las hembras haces de espermatozoides por medio del gonopodio. La hembra muestra un comportamiento receptivo tras la exhibición de cortejo del

macho y este inserta brevemente el gonopodio en el poro genital de la hembra para la fertilización interna. Una vez inseminadas, las hembras pueden almacenar espermatozoides en un tipo de sacos llamados espermatóforos, de forma que pueden ir fecundando huevos para diferentes alumbramientos con una sola cópula, hasta por 8 meses (Magurran, 2005).

Una vez fertilizados, los huevos se retienen dentro del tracto reproductivo de la hembra, donde los embriones se nutren con el saco vitelino. Las hembras durante la gestación engordan visiblemente y en su parte posterior se agranda una mancha negra exterior a donde se desarrollan en su vientre los alevines. Entre más grande y más oscura es la mancha, más cercano se encuentra el alumbramiento.



Figura 9. Signos visibles de las etapas de la gestación del pez guppy hasta el alumbramiento (Fuente: Susel, 2023).

Después del parto, los alevines pueden alimentarse inmediatamente y no se les brinda más cuidado parental. Se ha observado a los padres depredando a sus propias crías en acuarios (Whitern & Gordon 1980).

Los guppies maduran a las 10-20 semanas. El tamaño del pez al madurar es dependiente del riesgo de depredación de los entornos ocupados. Las hembras producen 2-3 generaciones por año, y pueden continuar reproduciéndose hasta los 20-34 meses de edad sin presentar un período significativo de senescencia reproductiva (Reznick *et al.*, 2001).

El tamaño de una camada varía de una a más de 100 crías y depende en gran medida del tamaño de la hembra (Reznick & Endler, 1982; Travis, 1989). En el área de distribución natural de *P. reticulata*, existen diferencias consistentes en el número de alevines dependientes de los riesgos de depredación. Las hembras de áreas de alta depredación producen más crías y de menor tamaño que las hembras de áreas de baja depredación (Magurran, 2005). Las cepas domesticadas de *P. reticulata*, criadas para tener un mayor tamaño que los peces silvestres, producen crías mucho más numerosas.

La proporción de sexos al nacer es uniforme, aunque la proporción de sexos en adultos puede favorecer a las hembras, lo que indica que la mortalidad de los machos es mayor (Reznick *et al.*, 2001).

Las hembras responden sexualmente cuando son vírgenes y durante tres o cuatro días después del parto, pero en otros momentos evitan los intentos de apareamiento de los machos. El cortejo de los machos guppy es intenso, y las hembras prefieren

a los machos que cortejan a un ritmo mayor, pero pueden estar sujetos a un mayor riesgo de depredación (Endler, 1987).

2.8.3.1. Selección sexual en peces guppy

La selección sexual es predominante en sociedades polígamas. Generalmente, la poligamia se presenta en ambientes con recursos distribuidos desigualmente. Además, predominan cuando un sexo no participa del cuidado parental. Estos pueden gastar más energía en la competencia intrasexual por recursos y parejas (Emlen & Oring, 1977).

En los guppies, el ambiente acuático es muy heterogéneo en cuanto a distribución de los recursos. Esto ha condicionado el emparejamiento polígamo en el que el macho solo cumple la función de proveer el esperma en la reproducción.

Los machos tienen un comportamiento de cortejo característico y junto a la coloración única e intensa que poseen, son rasgos controlados estrictamente por las hormonas andrógenas. La forma de cortejar en los machos es su movimiento encorvado en el cuerpo en forma de "S" con las aletas completamente abiertas o cerradas. La hembra selecciona al macho por su ornamentación y movimiento de cortejo (Harper & Braun, 1993).

Las hembras tienen preferencias visuales por machos más vistosos. Los machos más atractivos para las hembras tienen mayor éxito de apareamiento que los poco atractivos. De acuerdo a las observaciones de Brooks y Endler (2001), el atractivo se correlaciona positiva y significativamente con el área de la cola, el contraste de color, la coloración anaranjada y el número total de manchas.

La presencia de manchas anaranjadas está controlada por diferentes loci que causan diferencias en la síntesis de carotenoides. La baja heredabilidad de la intensidad del color de las manchas anaranjadas puede ser debido a baja varianza genética aditiva o a alta varianza ambiental. Esto quiere decir que la coloración anaranjada es sensible a factores ambientales, principalmente la dieta (Hamilton & Poulin, 1999; Brooks & Endler, 2001).

Además de la ornamentación, existen algunos factores como la edad y la experiencia de las hembras de *P. reticulata* que de igual manera influyen en la selección de pareja. Las hembras vírgenes emplean más tiempo observando machos vistosos que los no vistosos, en relación con hembras experimentadas que han producido descendientes.

Según Kodric-Brown & Nicoletto (2001), existe una disminución de la selectividad por parte de las hembras con la edad y puede deberse a un deterioro en la capacidad sensorial y, por ende, en la habilidad de discriminar; y por una disminución en la motivación. Las hembras más jóvenes son más selectivas a la hora de escoger altas cualidades en sus parejas, a diferencia de las hembras más experimentadas como sucede en otros grupos de vertebrados. Estas observaciones comprueban que la edad, más que la experiencia, determina la selectividad de la hembra.

2.8.4. Los peces guppy como modelo para observar efectos durante la gestación

La ventaja de este pez en investigaciones a nivel reproductivo se debe precisamente a que procrean las crías vivas. Este proceso es dependiente en alta proporción de condiciones ambientales tales como el clima, temperatura, calidad de las aguas, presencia de contaminantes entre otros, por lo que desviaciones de algunas de estas condiciones pueden causar efectos significativos en los parámetros reproductivos y por consiguiente en la viabilidad de la especie.

CAPITULO III
METODOLOGÍA

3.1. Adquisición, ambientación y mantenimiento de los peces guppy

Se utilizaron peces hembra embarazadas de la especie *Poecilia reticulata* que se encontraban entre los días 20 y 25 de gestación y con medidas entre 2 a 3 cm, obtenidas de un proveedor local. Los peces fueron trasladados en el medio que se especifica en la Tabla 4, al lugar donde se realizó el ensayo. Se formaron grupos de seis peces, que fueron colocados en peceras (ver Figura 12), con aireación continúa utilizando bombas de aire Tetra Whisper AP300 (Tetra GmbH; Melle, Alemania). Los especímenes se mantuvieron en las condiciones indicadas una semana previa al bioensayo, alimentándose una vez al día con alimento en hojuelas para peces de agua dulce Tetramin Plus (Tetra GmbH; Melle, Alemania).

Tabla 4. Condiciones y parámetros fisicoquímicos del agua recomendados para el adecuado mantenimiento de los peces guppy

Conductividad	100 - 300 μ S
Fuente hídrica	Agua potable declorada
Iluminación	Iluminación natural
pH	7 \pm 1.0
Temperatura	25 \pm 1°C
Sólidos disueltos	< 250 ppm

μ S= micro Siemens (Fuente: OECD, 2019)

Se utilizó iluminación natural por lo que fueron expuestas a un fotoperiodo promedio de 12 horas (luz – oscuridad), condición óptima recomendada para los peces de agua dulce (Carrillo, M. A. *et al.*, 2009).

Los parámetros fisicoquímicos del agua se monitorearon diariamente utilizando el Multi-parameter Tester PC60 (Apera Instruments, LLC; Col, Ohio).

El recambio de agua se realizó cada 3 días. Esta se obtuvo del proveedor local, y fue dechlorada mediante reposo al aire libre por 24 horas antes de su utilización. El periodo y las condiciones de aclimatación se basaron en las recomendaciones establecidas por la OECD (2019).



Figura 10. Lugar habilitado para la realización de los ensayos (Fuente: Jurado & Lam, 2023).

3.2. Preparación de las soluciones de Acetato de Medroxiprogesterona

Se utilizaron suspensiones inyectables de Acetato de Medroxiprogesterona de 150 mg/mL de la presentación comercial Gyrogen Depot (Laboratorios Aرسال). Para las concentraciones finales, la solución patrón original fue diluida en Solución salina normal (Cloruro de Sodio al 0.9%), añadiendo 10 gotas de alcohol etílico al 95% para facilitar la disolución del MPA.

Las pruebas de toxicidad se realizaron en seis grupos de peces (seis concentraciones de MPA) y un grupo control (Figura 11).

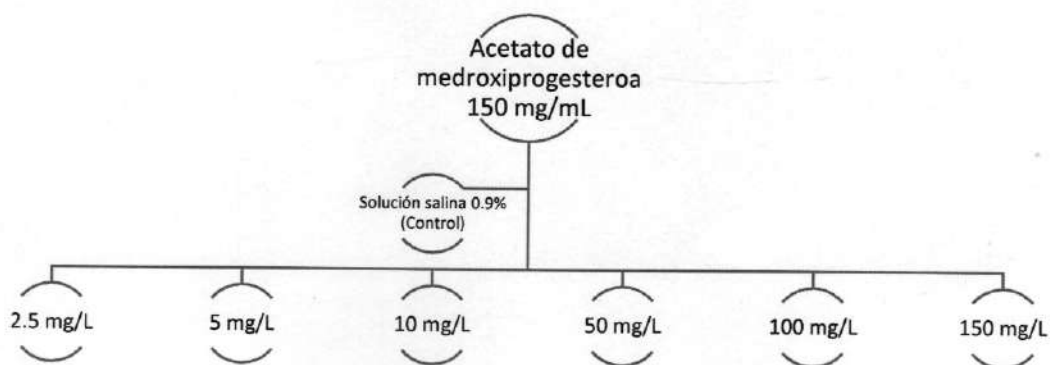


Figura 11. Esquema de las concentraciones de Acetato de Medroxiprogesterona utilizadas en los ensayos (Fuente: Jurado & Lam, 2023).

3.3. Metodología general del ensayo biológico

3.3.1. Determinación de la toxicidad aguda en peces guppy hembras embarazadas

Para la determinación de la toxicidad aguda se siguieron los lineamientos establecidos por la OECD para pruebas de toxicidad aguda en peces mediante el método estático, y consistió en exponer los peces guppy hembras embarazadas a las diferentes concentraciones del fármaco seleccionado por un periodo de 96 horas, sin renovación del medio durante este periodo. Cada grupo de estudio estuvo conformado por seis individuos colocados en envases de vidrio con 1.5 L de agua declarada (ver Figura 12) que se mantuvo en las condiciones fisicoquímicas

presentadas en la Tabla 4. Los peces no fueron alimentados durante la prueba aguda, según lo establecido por la OECD (2019).

Las observaciones de los resultados se hicieron cada 24 horas, monitoreando en cada observación los parámetros fisicoquímicos del agua.

Finalizadas las 96 horas, se determinó la toxicidad aguda mediante la evaluación de los peces muertos y la presencia de cambios en el comportamiento como nado, reacción a estímulos exteriores y cambios macroscópicos en la fisonomía de los peces.



Figura 12. Modelo básico para la realización del bioensayo (Fuente: Jurado & Lam, 2023).

Tabla 5. Condiciones y criterios de exposición del bioensayo de toxicidad aguda.

<i>Tipo de bioensayo</i>	Estático
<i>Tiempo de exposición</i>	96 horas
<i>Temperatura</i>	25 ± 1°C
<i>pH</i>	7 ± 1.0
<i>Tamaño del envase</i>	2 L
<i>Volumen del medio</i>	1.5 L
<i>Tamaño de organismos</i>	2-3 cm
<i>Concentraciones evaluadas de MPA</i>	Control, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L
<i>N° de organismos por grupo</i>	6
<i>Régimen de alimentación</i>	Ausencia
<i>Medio utilizado</i>	Agua potable declorada
<i>Respuesta aguda</i>	Porcentaje de mortalidad
<i>Criterio de evaluación</i>	Supervivencia y viabilidad del producto

3.3.2. Determinación de la toxicidad crónica en los peces guppy después de la exposición

Terminadas las 96 horas del bioensayo de toxicidad aguda, se realizaron posteriormente observaciones periódicas durante 10 días para determinar parámetros cualitativos que pudieren dar indicios de efectos crónicos después de la exposición. Entre estos, se evaluaron la viabilidad del embarazo, liberación y nacimiento de las crías e integridad de la descendencia. Además, se observaron modificaciones conductuales principalmente en la conducta de nado, los patrones

de alimentación, o cualquier otro cambio macroscópico indicativo de algún tipo de estrés o efecto sobre la salud.

3.4. Consideraciones especiales

Debido a las limitaciones suscitadas por la pandemia de Covid-19, todas las fases de este estudio se realizaron en casa de una las autoras de la tesis. Se mantuvieron todas las condiciones establecidas en la metodología (OECD, 2019) para garantizar resultados óptimos y confiables, pero, además, todas las actividades se realizaron con estricto apego a las normas de bioseguridad establecidas por el Equipo Técnico del MINSA (Gaceta Oficial 29021-B mediante Resolución No. 405 del 11 de mayo del 2020 y revisado el 12 de diciembre del 2022), los cuales se resumen a continuación:

- Higiene de manos frecuente: Lavado de manos con agua y jabón y uso de gel alcoholado al entrar y por lo menos cada 30 minutos mientras se encuentre en el área del trabajo experimental.
- No comer ni compartir alimentos en el sitio de trabajo.
- Mantener siempre bien ventilada el área de trabajo.
- Uso obligatorio de mascarillas, lentes de protección o careta protectora.
- Distanciamiento físico de por lo menos 2 metros, en caso de que se encuentre más de una persona en el local donde se realiza el experimento.
- Uso obligatorio de equipo de protección personal: Bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección.

- Limpieza y desinfección frecuente de áreas y superficies de trabajo con hipoclorito de sodio (cloro) al 0.05% o alcohol al 70%.
- Se mantuvieron todos los insumos y equipos limpios y en buen estado.
- Manejo adecuado de desechos. Tanto los desechos experimentales, así como mascarillas, guantes o cualquier otro material, se colocaron en doble bolsa, y fueron rociados con desinfectante previo a ser depositados en recipiente cerrado y colocados en el sitio designado para la recolección de la basura.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros del medio utilizado en el bioensayo

Los parámetros fisicoquímicos del agua fueron monitoreados diariamente y se mantuvieron constantes a lo largo de las 96 horas del bioensayo agudo y en las observaciones posteriores. Los promedios de la temperatura, conductividad y pH fueron de 25 ± 0.5 °C, 193 ± 6.6 μ S y 7.5 ± 1 respectivamente. La uniformidad observada en estos parámetros es indicativo de que los cambios fisiológicos y patológicos sobre la homeostasis de los peces en estudio puedan relacionarse con la presencia del fármaco como lo sugieren Vázquez *et al.* (2005).

4.2. Efectos agudos de la exposición de peces guppy hembras embarazadas a Acetato de Medroxiprogesterona

Los efectos observados de la exposición aguda de peces guppy embarazadas después de administración de MPA se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Efectos en peces guppy embarazadas en las pruebas de toxicidad aguda.

Dosis (mg/L)	Tiempo (h)			
	24	48	72	96
Control	Nado normal y movimiento constante de las aletas. Color de piel brillante.	Nado normal en todas las direcciones de la pecera.	Nado normal, movimiento constante de las aletas. Alumbramiento en dos peces; total de crías: 17	Nado normal. No hubo cambios en la coloración de la piel. Alumbramiento en un pez más; total de crías: 24
2.5	Nado normal en la superficie de la pecera,	Nado normal.	Nado normal.	Nado normal en la parte inferior de la pecera. No se

	movimiento constante de las aletas. Coloración normal brillante.			observaron cambios en la coloración.
5	Nado normal. Piel de color brillante.	Nado normal.	Nado normal en la superficie, no se observaron cambios en la coloración.	Nado constante en la parte superior de la pecera. Nado errático y desordenado (como reflejo de huida).
10	Nado constante en la superficie de la pecera. Coloración brillante normal.	Nado normal.	Agrupamiento en la parte superior de la pecera. No hubo cambios en la coloración de los peces.	Concentración en la superficie de la pecera. Nado errático.
50	Nado errático en todas las direcciones de la pecera. Coloración brillante normal de la piel.	Peces agrupados en la parte superior. Nado errático a ambos extremos como reflejo de huida.	Nado letárgico en la superficie de la pecera.	Agrupamiento en el fondo de la pecera, actividad reducida. No se observó cambios en la coloración.
100	Nado normal, movimiento constante de aletas. Color de la piel brillante.	Nado errático en la superficie de la pecera.	Actividad reducida, agrupamiento en las esquinas superiores de la pecera.	Nado aletargado en la parte inferior de la pecera. No se observó cambios en la coloración.
150	Nado errático en el fondo de la pecera, hacia ambos extremos de la pecera. Coloración brillante.	Nado aletargado en la superficie de la pecera.	Nado letárgico en la parte inferior de la pecera.	Hipoactividad y agrupamiento en las esquinas del fondo de la pecera. Enrojecimiento de las branquias.

Durante el ensayo, se observó dos peces del grupo control que parieron después de las 48 horas y al término del ensayo agudo se contaron un total de 24 crías. No

se registraron otras modificaciones significativas en este grupo a lo largo de la prueba como tampoco una vez finalizadas las 96 horas del ensayo.

En los grupos con concentraciones relativamente bajas (2.5 y 5 mg/L) de MPA, no se observó letalidad ni cambios conductuales significativos. Sin embargo, en los grupos expuestos a concentraciones mayores, se presentaron manifestaciones de nado errático a las pocas horas de la exposición y posteriormente, se observó una disminución significativa en la actividad de los peces. Estos cambios conductuales fueron dependientes de la concentración.

En nuestro conocimiento y de acuerdo a lo revisado en la literatura, no existen datos previos sobre ensayos para evaluar los efectos de sustancias xenobióticas en peces guppy embarazadas, por lo que este estudio puede considerarse como un aporte innovador sobre una herramienta metodológica viable y de importancia significativa en la investigación de efectos tanto farmacológicos como toxicológicos de sustancias durante el embarazo.

En cuanto a los efectos observados, fueron notorios cambios conductuales dependientes de dosis en los patrones de nado, que, aunque en nuestro caso no se realizaron pruebas bioquímicas para corroborar los mecanismos causales de esta conducta, tanto la excitación, nado anormal, disminución en la velocidad del nado y otros cambios en patrones del mismo podrían estar asociados con manifestaciones de estrés oxidativo, lo cual ha sido demostrado a nivel de diversos sistemas en otras especies como el pez cebra (*Danio rerio*) (Sarasamma *et al.*, 2019; Valadas *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). En esos estudios, patrones conductuales anormales se correlacionaron positivamente con alteraciones en los niveles celulares de factores

endógenos indicativos de exceso de especies reactivas de oxígeno. En base a esos informes, podríamos considerar que los peces en nuestro estudio expuestos al MPA podrían estar reflejando estrés oxidativo.

En varias especies de mamíferos y en cultivos celulares se ha documentado también que el MPA induce o potencia efectos de estrés oxidativo. Esto se ha observado en células del sistema nervioso (Irwin *et al.*, 2010), en ovarios de ratas (Ismiyati *et al.*, 2016), en útero de cobayo (Krikun *et al.*, 2010) y en células cardíacas. Se ha documentado además que en mujeres tratadas con MPA se eleva la peroxidación lipídica, con elevación de los niveles de aldehído malónico y disminución en los niveles de glutatión, los cuales son los principales marcadores de estrés oxidativo sistémico (Faddah *et al.*, 2005). Se ha postulado también que este estrés oxidativo en algunos órganos puede estar relacionado con afectaciones a nivel del sistema inmune, lo que puede relacionarse con el aumento en la susceptibilidad a enfermedades bacterianas y virales, incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en mujeres que utilizaron esta progestina como método anticonceptivo (Piccinni *et al.*, 2019).

No se registró letalidad en ningún grupo de prueba ni en el grupo control después de las 96 horas establecidas para el ensayo de toxicidad aguda. Estos resultados son coincidentes con previos hallazgos de nuestro laboratorio en alevines de tilapia (*Ocheocromis niloticus*) en los cuales se observó una Concentración Letal 50 (CL₅₀) muy alta durante las primeras 24 horas (130.29 mg/L), aunque a las 96 horas la CL₅₀ disminuyó a 90 mg/L (Marín & Sánchez, 2019). Las concentraciones que se utilizaron en el presente estudio se seleccionaron en base a los resultados previos

de Marín y Sánchez. Sin embargo, observamos que aun a dosis de 150 mg/L no se presentó letalidad en nuestro modelo lo cual confirma el alto índice terapéutico en cuanto a letalidad aguda del Acetato de Medroxiprogesterona en peces. Estudios en mamíferos también corroboran la poca letalidad y este alto Índice Terapéutico del MPA, ya que la Dosis Letal 50 (LD₅₀) oral en ratas es de 6400 mg/kg y en ratón es de 16 g/kg. La LD₅₀ intraperitoneal en ratas es de 900 mg/kg y en ratones de 1500 mg/kg y por vía subcutánea en ratas es de 900 mg/kg y en ratones de 1500 mg/kg (Medroxyprogesterone acetate: Uses, Interactions, Mechanism of Action, s. f.).

4.3. Efectos crónicos tras la exposición aguda de peces guppy hembras embarazadas a Acetato de Medroxiprogesterona



Figura 13. Signos de embarazo en peces guppy (*Poecilia reticulata*): Vientre abultado y mancha de gravidez pronunciado antes de la prueba de toxicidad aguda con Acetato de Medroxiprogesterona (Fuente: Jurado & Lam, 2023).



Figura 14. Notable reducción del tamaño del vientre y mancha de gravidez observado después de dos semanas de la prueba de toxicidad aguda en peces guppy (*Poecilia reticulata*) (Fuente: Jurado & Lam, 2023).

Después de 10 días de las pruebas de toxicidad aguda, se destacan las siguientes observaciones:

- No se registró mortalidad en el grupo control ni los grupos de prueba.
- Tras la exposición aguda, sólo se observó el alumbramiento de las peces embarazadas a las cuales se administró el tratamiento control. Los cuatro peces guppy embarazadas restantes del grupo control, dieron a luz 41 crías, en los siguientes 3-5 días de haber culminado el ensayo agudo. Las crías liberadas en el grupo control fueron 65 en total.
- Los grupos de peces guppy expuestos al MPA no dieron a luz ninguna cría, ni aun a las dosis más bajas, y en general se observó reducción de la mancha de gravidez y del tamaño del vientre aproximadamente entre los 7-10 días

después de la exposición al fármaco (Figura 14). Considerando que los animales del grupo control, si procrearon bajo las mismas condiciones experimentales, existe una alta posibilidad de que la pérdida de la gestación esté relacionada con la exposición al fármaco.

En cuanto a estos efectos, no existen datos en la literatura sobre efectos del MPA o sus derivados metabólicos durante la gestación de peces guppy. Sin embargo, algunos estudios en otros modelos y especies de peces si han documentado toxicidad reproductiva significativa de este fármaco. Peces cebra (*Danio rerio*) expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de MPA, presentaron alteraciones histológicas en los testículos, disminución del número de células espermatogénicas y alto porcentaje de espermatoцитos maduros en peces macho. En peces hembra de esta especie se observó histología anormal en los ovarios, disminución de ovocitos, y alta presencia de folículos atrésicos (Zhao *et al.*, 2015). En otro estudio, se observó que el MPA afecta la diferenciación sexual y la espermatogénesis en peces cebra (*Danio rerio*), con un marcado efecto androgénico en larvas expuestas (Shi *et al.*, 2019). Se ha observado también este efecto androgénico marcado en peces con otras progestinas sintéticas (Zhao *et al.*, 2015).

En especies de mamíferos, otros autores también han documentado efectos tóxicos relevantes del MPA durante el embarazo. Un estudio en ratones hembra embarazadas, en el cual el fármaco fue administrado antes de la implantación y en el día 6, 15 y 19 de gestación (post implantación), se observó total ausencia de implantación, significativo número de resorciones y severas deformidades óseas en

los productos sobrevivientes de las hembras a las cuales se administró el fármaco después de la implantación (Bakry *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Ohtake *et al.* (2009), para observar los efectos del MPA administrado por vía oral sobre la fertilidad de ratas hembras, mostró una reducción significativa dependiente de dosis, en el número de ratas embarazadas y cambios histopatológicos en los ovarios, con aumento significativo de folículos atrésicos, encontrándose además una correlación positiva entre las alteraciones ováricas y la disminución de la fertilidad.

Está documentado, que al igual que la progesterona natural, las progestinas sintéticas pueden inducir efectos hormonales, no sólo por interacción a nivel de receptores de progesterona, sino también por efectos a nivel de receptores estrogénicos, del receptor de glucocorticoides y muy especialmente a nivel del receptor de andrógenos, destacándose en este sentido efectos tanto androgénicos como antiandrogénicos en determinadas circunstancias (Kumar *et al.*, 2015). Estos últimos son de especial consideración, ya que entre los principales efectos colaterales de las progestinas se ha observado la masculinización de los fetos hembras cuando son expuestos a progestinas en etapas críticas de la diferenciación sexual, efectos que también se han observado en peces (Runnalls *et al.*, 2013, Zeilinger *et al.*, 2009, Paulos *et al.*, 2010).

Estos efectos se han explotado en la acuicultura, precisamente con el propósito de masculinizar en alta proporción a las crías. Esta práctica se realiza debido a que los machos ofrecen mejores características en los aspectos de crecimiento y ganancia de peso, al igual que mayor vistosidad como peces ornamentales. Sin embargo,

debe prestarse especial atención a esta práctica, porque muchas veces se desconoce posibles efectos colaterales, especialmente si no es considerado el potencial de bioacumulación de cada sustancia en particular (Hoga *et al.*, 2018).

Como muchas otras hormonas esteroidales, el MPA es relativamente hidrófobo ($\log K_{ow} = 4,09$), lo que le otorga la capacidad de distribuirse en la porción lipídica de los organismos y bioacumularse en tejido graso y otros tejidos incluyendo los órganos reproductivos, por lo que los embriones y fetos pueden estar expuestos a esta sustancia, aunque ya se haya suspendido la administración del fármaco (Lindenmaier *et al.*, 2005). Recientes estudios han documentado que el MPA posee el Índice de Bioacumulación teórico más alto de todas las progestinas, aunque en tejidos de peces se ha documentado valores entre 4.3 a 37.8 (Rocha & Rocha, 2022). Al igual que otras progestinas sintéticas, el MPA ha mostrado también efectos androgénicos. Debido a la estrecha relación estructural del MPA con la progesterona natural, este efecto se consideraba de poca trascendencia, no obstante, varios estudios han demostrado un significativo potencial androgénico de esta progestina en varias especies expuestas en la etapa de desarrollo, incluyendo la humana, lo cual puede contribuir también a la toxicidad reproductiva de este fármaco (Medroxyprogesterone Use During Pregnancy, s. f.; Winneker *et al.*, 2003).

La evaluación de los efectos de sustancias durante la etapa del embarazo, es uno de los temas de mayor interés en la determinación de la seguridad de una sustancia. Sin embargo, por razones obvias, estos estudios no pueden realizarse en humanos. Por ello generalmente, se realizan en varias especies y mediante estimados estadísticos apropiados, se extrapolan los resultados a posibles efectos en

humanos. Por consiguiente, cualquier efecto indeseable que se manifieste en cualquier especie es de gran importancia en los estudios de seguridad reproductiva de cualquier sustancia.

Debido a que el sistema endocrino de los peces es fundamentalmente similar al de los mamíferos, efectos a nivel de la reproducción en peces puede ser un indicador importante de alteraciones a nivel endocrino, y debe traducirse en una señal de alerta sobre probables efectos de disrupción endocrina en otras especies, incluyendo al ser humano. Efectos deletéreos en alguna etapa de la gestación en un biomodelo de gestación, ofrece una visión integral del posible efecto sobre el éxito reproductivo de esa especie en caso de ser expuesta a una sustancia en particular, pero también es una posible medida sobre el riesgo reproductivo para otras especies habitantes de los ecosistemas, incluyendo la humana.

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Considerando que actualmente, las progestinas se encuentran entre los fármacos de mayor uso a nivel mundial, cada día se encontrarán más ecosistemas contaminados con estas sustancias, especialmente los ecosistemas acuáticos. Es por ello que investigaciones sobre los efectos de estas sustancias en la fertilidad de las especies expuestas, sobre todo en peces, son de especial trascendencia.
- El *Poecilia reticulata*, es un pez ovovivíparo en el cual las crías nacen vivas, por lo que entre las ventajas que ofrece esta especie como biomodelo de gestación, además de emular algunas características de la reproducción en mamíferos, es que puede observarse la viabilidad de la gestación durante todo el proceso y los efectos sobre los productos. Igualmente es posible observar efectos en la etapa embrionaria, dada la fácil obtención y disponibilidad de los embriones. Dentro de las ventajas de este modelo está también la posible realización de estudios transgeneracionales, lo que permitiría observar efectos reproductivos crónicos de una sustancia en la descendencia.
- El MPA no ofrece toxicidad letal aguda importante en hembras guppy embarazadas, sin embargo, la toxicidad a nivel reproductivo puede considerarse alta, ya que interrumpió totalmente la gestación a todas las concentraciones evaluadas, lo cual sugiere muerte de los productos y resorción fetal. Este es un efecto de especial interés, ya que una sustancia

que inhiba la gestación, o que de cualquier manera afecte la viabilidad de los productos pueden poner en riesgo la continuidad y contribuir a la extinción de diversas especies, lo cual es de suma importancia en los ecosistemas acuáticos.

- Aunque el mecanismo de la toxicidad reproductiva no puede deducirse de este estudio, probablemente este asociado con alguna manifestación de estrés oxidativo a nivel de órganos reproductivos o de otros órganos encargados de la homeostasis general durante la gestación, efectos que han sido observados en otras especies incluyendo en el ser humano.

5.2. Recomendaciones

- El modelo propuesto en este trabajo puede representar una valiosa herramienta en el estudio de efectos de diferentes sustancias durante la etapa del embarazo. Es de fácil manejo, económico y ofrece las posibilidades de observar efectos no solo en la etapa de la gestación, sino también efectos a nivel embrionario y transgeneracionales. Es por ello que recomendamos que este tipo de estudios se sigan implementando en nuestro medio para la evaluación de diferentes contaminantes presentes en los ecosistemas locales.
- Los efectos observados en este trabajo nos indican que el MPA induce alteraciones en algún paso de la homeostasis del pez guppy hembra en la etapa de gestación. Estos hallazgos abren múltiples posibilidades para posteriores investigaciones sobre los posibles mecanismos involucrados en este efecto. Considerando que el MPA y muchas otras progestinas son de amplio uso en nuestro medio y que no existen estudios, ni sobre el grado de contaminación de nuestros ecosistemas acuáticos ni sobre los efectos de las mismas en ninguna especie posiblemente expuesta, es recomendable continuar estudiando estos efectos.
- Es necesario trabajar con concentraciones menores del MPA, con el fin de obtener las concentraciones mínimas a las que se producen los efectos a nivel de la gestación del pez guppy, de manera que puedan establecerse adecuados monitoreos y extrapolarse los resultados a otras especies

superiores, incluyendo la humana. Sin embargo, se requiere para tales fines el acondicionamiento adecuado de laboratorios, la adquisición de equipos de medición de alta sensibilidad que permitan cuantificar las concentraciones a las que se producen los efectos indeseables a nivel reproductivo, así como la implementación de técnicas a nivel molecular que permitan dilucidar los posibles mecanismos de toxicidad involucrados.

5.3. Referencias bibliográficas

- Allen, R. H., Kaunitz, A. M. & Hickey, M. (2016). Hormonal Contraception. *Williams Textbook of Endocrinology*, 664-693. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-29738-7.00018-6>
- Altman, P. L. (1974). *Biology Data Book*. Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Ankley, G. & Johnson, R. (2004). Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. *ILAR Journal*, 45(4), 469-483. <https://doi.org/10.1093/ilar.45.4.469>
- Ankley, G., Brooks, B., Huggett, B. & Sumpter, J. (2007). Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol* 41: 8211–8217.
- ANMAT (2007). Monografía del Acetato de Medroxiprogesterona. Equipo de redacción de IQB (Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica - Argentina). Recuperado de: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m010.htm>
- Apgar, B. S. & Greenberg, M. G. (2000). Using progestins in clinical practice. *American Family Physician*, 62(8), 1839-1850.
- Aronson, J. K. (2009). Sex hormones and related drugs. En *Meyler's Side Effects of Endocrine and Metabolic Drugs* (p. 283). Elsevier Science.
- Arrieta, R. (2012). Patrones de prescripción farmacéutica en la Provincia de Chiriquí. Disposición y posible contaminación de aguas con residuos hormonales de alto consumo. Tesis de Grado en Farmacia. UNACHI – 2012.
- Aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A. & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bakry, S., Ali, M., El Dean, U. S., Merhi, Z., Fadiel, A. & Naftolin, F. (2007). Medroxyprogesterone acetate-induced effects on mouse pregnancy. *Fertility and Sterility*, 88, S312. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1048>
- Barua, S., Khan, M., Reza, A. & Balakrishna, P. (2001). The status of alien invasive species in Bangladesh and their impact on the ecosystems. Report of workshop on Alien Invasive Species, Global Biodiversity Forum-South and Southeast Asia Session, Colombo. IUCN Regional Biodiversity Programme, Asia, Colombo, Sri Lanka. October 1999, 1-7. <https://www.cabdirect.org/abstracts/20053158850.html>
- Benbrook, C. (2002). Organochlorine residues pose surprisingly high dietary risks. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 56(11), 822-823. <https://doi.org/10.1136/jech.56.11.822>

- Bentel, J., Birrell, S., Pickering, M., Holds, D., Horsfall, D. & Tilley, W. (1999). Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate, in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 154:11-20.
- Berg, A., Thomas, P. & Olsson, P. (2005). Biochemical characterization of the Arctic char (*Salvelinus alpinus*) ovarian progestin membrane receptor. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:64.
- Besse, J. P. & Garric, J. (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 157(12), 3485-3494. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.012>
- Bisarya, S. & Patil, D. (1993). Determination of salicylic-acid and phenol (ppm level) in effluent from aspirin plant. *Res. Ind.* 38, 170-172.
- Bolis, C., Piccolella, M., Dalla, A., & Rankin, J. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research*, 44(4), 265-280. <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0845>
- Brian, J. V., Harris, C. A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A. & Sumpter, J. P. (2005). Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 113(6), 721-728. <https://doi.org/10.1289/ehp.7598>
- Bridges, J. & Bridges, O. (2004). Integrated risk assessment and endocrine disrupters. *Toxicology*, 205(1-2), 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.033>
- Brooks, R. & Endler, J. (2001). Direct and indirect sexual selection and quantitative genetics of male traits in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, 55(5), 1002. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2001\)055](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2001)055)
- Bullock, L. P. & Bardin, C. W. (1977). Androgenic, synandrogenic, and antiandrogenic actions of progestins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 286(1 Biochemical A), 321-330. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1977.tb29427.x>
- Carrillo, M. A. & Fundación Observatorio Español de Acuicultura. (2009). La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J., Rogan, E., & Roy, D. (2000). Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents-DNA Adducts and Mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27, 75-93.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P. & Barceló, D. (2004). "Integrated procedure for determination of endocrine disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS." *Anal Bioanal Chem* 378(3): 697-708.
- Chang, H., Wan, Y. & Hu, J. (2009). Determination and Source Apportionment of Five Classes of Steroid Hormones in Urban Rivers. *Environ Sci Technol* 43:7691-7698.

- Chervinski, J. (1984). Salinity tolerance of the guppy, *Poecilia reticulata* Peters. *Journal of Fish Biology*, 24(4), 449-452. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04815.x>
- Conneely, O., Mulac-Jericevic, B., DeMayo, F., Lydon, J. & O'Malley, B. (2002). Reproductive Functions of Progesterone Receptors. *Recent Progress in Hormone Research* 57:339-355.
- Correia, A., & Marcano, L. (2015). Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales: Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional. *Boletín De Malariología Y Salud Ambiental*, 55(1), 1-18. <http://ve.scielo.org/pdf/bmsa/v55n1/art01.pdf>
- Cripe, G. M., Hemmer, B. L., Raimondo, S., Goodman, L. R., & Kulaw, D. H. (2010). Exposure of three generations of the estuarine sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) to the androgen, 17 β -trenbolone: Effects on survival, development, and reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.261>
- Daughton C. & Ternes T. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspect* 107: 907-937.
- Di Carlo, F., Gallo, E., Conti, G. & Racca, S. (1983). Changes in the binding of oestradiol to uterine oestrogen receptors induced by some progesterone and 19-nor-testosterone derivatives. *Journal of Endocrinology* 98:385-389.
- Dimogerontas, G. & Liapi, C. (2014). Endocrine Disruptors (Xenoestrogens): An Overview. In T. Eliades y G. Eliades (Eds.). *Plastics in Dentistry and Estrogenicity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Durhan, E. J., Lambright, C. S., Makynen, E. A., Lazorchak, J., Hartig, P. C., Wilson, V. S., Gray, L. E. & Ankley, G. T. (2006). Identification of Metabolites of Trenbolone Acetate in Androgenic Runoff from a Beef Feedlot. *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), 65-68. <https://doi.org/10.1289/ehp.8055>
- Eisler R. & Wapner R. (1975). Second annotated bibliography on biological effects of metals in aquatic environments. U.S. Environmental Protection Agency. Report 6003-75-008. Springfield, USA.
- Emlen, S. T. & Oring, L. W. (1977). Ecology, Sexual Selection, and the Evolution of Mating Systems. *Science*, 197(4300), 215-223. <https://doi.org/10.1126/science.327542>
- Endler, J. (1987). Predation, light intensity and courtship behavior in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behavior*, 35(5), 1376-1385. [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(87\)80010-6](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(87)80010-6)
- Erkkola, R. & Landgren, B. (2005). Role of progestins in contraception. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 84:207-216.
- Escobar, J. (1978). Study concerning mercury pollution in Cartagena. *FAO Doc. Tec. N° 185*. 25 p.

European Environment Agency (2010). Pharmaceuticals in the Environment- Results of an EEA workshop. EEA Technical report, No. 1. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Fabian (2019, 1 octubre). How do Guppies Get Pregnant? AquariumNexus. Recuperado de: <https://www.aquariumnexus.com/guppies-getting-pregnant/>

Faddah, L., Al-Rehany, M., Abdel-Hamid, N. & Bakeet, A. (2005). Oxidative Stress, Lipid Profile and Liver Functions in Average Egyptian Long-Term Depo Medroxy Progesterone Acetate (DMPA) Users. *Molecules*, 10(9), 1145-1152. <https://doi.org/10.3390/10091145>

Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. & Boeuf, B. (2007). Melatonin effects on the hypothalamopituitary axis in fish. *Trends Endocrinol Metabolism* 18, 81-88.

Farr, J. A. (1975). The Role of Predation in the Evolution of Social Behavior of Natural Populations of the Guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Evolution*, 29(1), 151. <https://doi.org/10.2307/2407148>

Fent, K., Weston, A. & Caminada, D., (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159.

Flores-Herrera, H., Díaz-Cervantes, P., De la Mora, G., Zaga-Clavellina, V., Uribe-Salas, F. & Castro, I. (2008). A possible role of progesterone receptor in mouse oocyte in vitro fertilization regulated by norethisterone and its reduced metabolite. *Contraception* 78:507-512.

Folmar, L., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K. & Denslow, N. (2000). Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), 77-88. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(99)00076-4)

Garrison A, Pope J. & Allen F. (1976). GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: CH Keith (ed): Identification and Analysis of organic Pollutants in Water. Ann Arbor Science Publisher, Ann Arbor, Michigan

Genazzani, A. & Petraglia, F. (1993). *Frontiers in Gynecologic and Obstetric Investigation*. (1.a ed.) [Google Books]. CRP Press. p. 320.

Georgescu B. & Georgescu C. E. (2012). *Poecilia reticulata* as a valuable biological indicator of endocrine disruption. *Poec Res* 2(1):15-19

Giangrande, P. H. & McDonnell, D. P. (1998). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Progress in Hormone Research*, 54, 291-294.

Gómez, J, Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P., Breton, B. & Le Gac, F. (1999). Growth Hormone (GH) and Gonadotropin Subunit Gene Expression and Pituitary and Plasma Changes during Spermatogenesis and Oogenesis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 113(3), 413-428. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7222>

- Guppy fish: Characteristics, types, reproduction and more. (2020, enero 1). Discovering All Marine Species. Recuperado de: <https://ourmarinespecies.com/c-fishes/guppy-fish/>
- Hamilton, W. J. & Poulin, R. (1999). Female preference and male nuptial colouration in the freshwater fish *Gobiomorphus breviceps*: geographic variation among populations. *Canadian Journal of Zoology*, 77(3), 463-469. <https://doi.org/10.1139/z98-224>
- Hapgood, J. (2013). Immunosuppressive Biological Mechanisms Support Reassessment of Use of the Injectable Contraceptive Medroxyprogesterone Acetate. *Endocrinology* 154:985-988.
- Harper, G. & Braun, K. (1993). Effects of Predator Size and Female Receptivity on Courtship Behavior of Captive-Bred Male Guppies. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 86(3), 127-132.
- Hileman, B. (1994). Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer. *Chemical & Engineering News*, 72(5), 19-23.
- Hoga, C. A., Almeida, F. L. & Reyes, F. G. (2018). A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 679-691. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1475423>
- Hohmann, H. & Creinin, M. D. (2007). The Contraceptive Implant. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 50(4), 907-917. <https://doi.org/10.1097/grf.0b013e318159c2f6>
- Holm, J., Ruegge, K., Bjerg, P. & Christensen, T. (1995). Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 29, 1415-1420. <https://doi.org/10.1021/es00005a039>.
- Huggett, D., Ericson J., Cook J. & Williams R. (2004). Plasma concentrations of human pharmaceuticals as predictors of pharmacological responses in fish. In: Kümmerer K, editor. *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. 2nd ed. Berlín (DE): Springer-Verlag. p 373-386.
- Iannacone, J. & Alvaríño, L. (1998) Ecotoxicidad aguda del zinc sobre el "guppy" *Poecilia reticulata*. *Wiñay Yachay* 2(3): 67-74.
- Iannacone, J., Alvaríño, L & Gutiérrez, A. (1999). Cinco ensayos ecotoxicológicos para evaluar metales pesados en el agua dulce. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 65: 30-45.
- Irwin, R. W., Yao, J., Ahmed, S. S., Hamilton, R., Cadenas, E. & Brinton, R. (2010). Medroxyprogesterone Acetate Antagonizes Estrogen Up-Regulation of Brain Mitochondrial Function. *Endocrinology*, 152(2), 556-567. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1061>
- Ismiyati, A., Wiyasa, I. & Hidayati, D. (2016). Protective Effect of Vitamins C and E on Depot-Medroxyprogesterone Acetate-Induced Ovarian Oxidative Stress In Vivo. *Journal of Toxicology*, 2016, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2016/3134105>

- Jackson, J. & Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Sci Total Environ* 405(1-3): 153-160.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C., Brighty, G. & Sumpter, J. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32: 2498-2506.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J., Matthiessen, P. & Sumpter, J. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem*; 15:194–202.
- 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.
- Katsiadaki, I., Scott, A. & Mayer, I. (2002). The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research*, 54(3-5), 725-728. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(02\)00110-1](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00110-1)
- Katsuki, Y., Sasagawa, S., Takano, Y., Shibutani, Y., Aoki, D., Udagawa, Y. & Nozawa, S. (1996). Animal studies on the endocrinological profile of dienogest, a novel synthetic steroid. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 23(2), 45-62.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y. & Itoh, S. (1989). The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-6), 29-38. <https://doi.org/10.1007/bf00004687>
- Kidd, K., Blanchfield, P., Mills, K., Palace, V., Evans, R., Lazorchak, J. & Flick, R. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), 8897-8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>
- Kime, D., Nash, J. & Scott, A. (1999): Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics, en: *Aquaculture* 177, 345–352.
- Kodric-Brown, A. & Nicoletto, P. F. (2001). Age and Experience Affect Female Choice in the Guppy (*Poecilia reticulata*). *The American Naturalist*, 157(3), 316-323. <https://doi.org/10.1086/319191>
- Kolodziej, E., Harter, T. & Sedlak, D. (2004). Dairy Wastewater, Aquaculture, and Spawning Fish as Sources of Steroid Hormones in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol* 38:6377- 6384.
- Krikun, G., Buhimschi, I. A., Hickey, M., Schatz, F., Buchwalder, L. & Lockwood, C. J. (2010). Long-term progestin contraceptives (LTPOC) induce aberrant angiogenesis, oxidative stress and apoptosis in the guinea pig uterus: A model for abnormal uterine bleeding in humans. *Journal of Angiogenesis Research*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-8>

- Kuhl, H. (2005). Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*, 8(sup1), 3-63. <https://doi.org/10.1080/13697130500148875>
- Kumar, V., Johnson, A. C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H. & Kroupová, H. K. (2015). The Challenge Presented by Progestins in Ecotoxicological Research: A Critical Review. *Environmental Science & Technology*, 49(5), 2625-2638. <https://doi.org/10.1021/es5051343>
- León-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C. S., Wolstenholme, J. T. & Trudeau, V. L. (2014). Current concepts in neuroendocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 158-173. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.005>
- Letterie, G. (1998). A Regimen of Oral Contraceptives Restricted to the Perioovulatory Period May Permit Folliculogenesis But Inhibit Ovulation. *Contraception* 57:39-44.
- Li, M. & Ford, J. (1998). A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the alpha and beta subunits of glycoprotein hormone gene family. *Journal of Endocrinology*, 156(3), 529-542. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1560529>
- Lindenmaier, H., Becker, M., Haefeli, W. & Weiss, J. (2005). Interaction of progestins with the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). *Drug Metabolism and Disposition* 33:1576-1579.
- Liu, X., Zhang, R., & Jin, Y. (2020). Differential responses of larval zebrafish to the fungicide propamocarb: Endpoints at development, locomotor behavior and oxidative stress. *Science of The Total Environment*, 731, 139136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139136>
- Magurran, A. (2005). *Evolutionary Ecology: The Trinidadian Guppy*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Marín, J. & Sánchez, Z. (2019). Determinación del Perfil Toxicodinámico del Diclofenaco y de su mezcla con Medroxiprogesterona y Ciprofloxacina, en la tilapia híbrida Rocky Mountain (*Oreochromis Niloticus* x *Oreochromis Aureus*). Tesis de Grado en Farmacia. UNACHI – 2019.
- Mathur, R. (2008). Use of ethinylestradiol/drospirenone combination in patients with the polycystic ovary syndrome. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, Volume 4, 487-492. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s6864>
- McCann, M. & Potter, L (1994). Progestin-only oral contraception: A comprehensive review: XII. Taking pops effectively. *Contraception* 50: S151-S158.
- Medina-Laver, Y., Rodríguez-Varela, C., Salsano, S., Labarta, E., & Domínguez, F. (2021). What Do We Know about Classical and Non-Classical Progesterone Receptors in the Human Female Reproductive Tract? A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11278. <https://doi.org/10.3390/ijms222011278>
- Medroxyprogesterone acetate: Uses, Interactions, Mechanism of Action. (s. f.). DrugBank Online. Recuperado de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00603>

- Medroxyprogesterone Use During Pregnancy (s. f.). Drugs.com. Recuperado de: <https://www.drugs.com/pregnancy/medroxyprogesterone.html>
- Mellon, M., Benbrook, C., & Benbrook K. (2001). Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA, USA. www.ucsusa.org/publications
- Merrin, P. K. & Alexander, W. D. (1990). Cushing's syndrome induced by medroxyprogesterone. *BMJ*, 301(6747), 345-345. <https://doi.org/10.1136/bmj.301.6747.345-a>
- Mills, L. & Chichester, C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of The Total Environment*, 343(1-3), 1-34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070>
- Miura, C., Higashino, T. & Miura, T. (2007). A Progestin and an Estrogen Regulate Early Stages of Oogenesis in Fish. *Biol Reprod* 77:822-828.
- Murphy, S. J., Littleton-Kearney, M. T., McCullough, L. D. & Hurn, P. D. (2004). Sex, hormones and the endothelium. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 71-84. [https://doi.org/10.1016/s1569-2558\(03\)34006-8](https://doi.org/10.1016/s1569-2558(03)34006-8)
- Nagahama, Y. & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation* 50: S195-S219.
- National Audit Office. (2019). Prescribing costs in primary care - National Audit Office (NAO) Report. <https://www.nao.org.uk/report/prescribing-costs-in-primary-care/>
- Nawaz, M.S, Erickson, B.D, Khan, A.A, Khan, S.A, Pothuluri, J.V, Rafii, F., Sutherland, J.B, Wagner, D. & Cerniglia, C.E (2001). Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance in the food animal production environment. *Regul Res Perspect* 1: 1-10
- OECD. (2019). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Ohtake, S., Fukui, M. & Hisada, S. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 1) Effects of 2- or 4-week repeated-dose administration and fertility studies with medroxyprogesterone acetate in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(Special), S23-S29. <https://doi.org/10.2131/jts.34.s23>
- Oropesa, A. (2008). Disruptores endocrinos en el medio ambiente: caso del 17- α -etinil-estradiol. *Observatorio Medioambiental*, 11, 63-76. Recuperado de: <https://revistas.ucm.es/index.php/OBMD/article/view/OBMD0808110063A>
- Pait, A. & Nelson, J. (2002) Endocrine disruption in fish: An assessment of recent research and results. Silver Spring, MD, NOAA/National Ocean Service/National Centers for Coastal Ocean Science, (NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS CCMA, 149)

- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Misna, T., Pittman, C. U. & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, 119(6), 3510-3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Paul, S. M. & Purdy, R. H. (1992). Neuroactive steroids. *The FASEB Journal*, 6(6), 2311-2322. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1347506>
- Paulos, P., Runnalls, T. J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A. P., Sumpter, J. P. & Huggett, D. B. (2010). Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.001>
- Peterson, L., Gomez, C. & Huggett, D. (2008). Effects of medroxyprogesterone and progesterone on larval growth and survival in fathead minnows (*Pimephales promelas*)
- Petrescu-Mag V., Păsărin B., Hoha G., Hărșan R. & Odagiu A.M. (2011) New contributions to knowledge of embryonic malformations in guppies. *AAFL Bioflux* 4(2):216-228.
- PEV (2014). *Prontuario de Especialidades Veterinaria 2014*. PLM México. Recuperado de <http://www.diccionarioveterinariopl.com>.
- Piccinni, M. P., Lombardelli, L., Logiodice, F., Kullolli, O., Maggi, E. & Barkley, M. S. (2019). Medroxyprogesterone Acetate Decreases Th1, Th17, and Increases Th22 Responses via AHR Signaling Which Could Affect Susceptibility to Infections and Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00642>
- Pinter, J. & Thomas, P. (1999). Induction of Ovulation of Mature Oocytes by the Maturation-Inducing Steroid 17,20 β ,21-Trihydroxy-4-pregnen-3-one in the Spotted Seatrout. *General and Comparative Endocrinology* 115:200-209.
- Poecilia reticulata* (Peters, 1860). (s. f.). Cyprinodontiformes vivíparos y ovovivíparos. Recuperado de: <http://www.viviparos.com/Fichas/P+reticulata+eng.htm>
- Poecilia reticulata* Peters, 1859 (s.f.) Integrated Taxonomic Information System-online database. Recuperado de: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=165903#null
- Pombo, M., Castro-Feijóo, L., Barreiro, J. & Cabanas, P. (2020). Una revisión sobre los Disruptores Endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos. *Revista Española Endocrinología Pediátrica*, 11(2). <https://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2020.Nov.619>
- Poulin, R., Baker, D., Poirier, D. & Labrie, F. (1989). Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell proliferation by medroxyprogesterone acetate in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 13(2), 161-172. <https://doi.org/10.1007/bf01806528>

Prat, F., Sumpter, J. & Tyler C. (1996). Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 54: 1375-1382.

Proyecto Biosfera. (s. f.).
http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/3ESO/Sistendo/principales_hormonas.htm

Pullen, M. A., Laping, N., Edwards, R. & Bray, J. (2006). Determination of conformational changes in the progesterone receptor using ELISA-like assays. *Steroids*, 71(9), 792-798. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.05.009>

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(4), 275-285. <https://doi.org/10.1080/02757549408038554>

Qiting J. & Xiheng Z. (1988). Combination process of anaerobic digestion and ozonation technology for treating wastewater from antibiotics production. *Water Treat* 3, 285–291.

Quérat, B., Sellouk, A. & Salmon, C. (2000). Phylogenetic Analysis of the Vertebrate Glycoprotein Hormone Family Including New Sequences of Sturgeon (*Acipenser baeri*) β Subunits of the Two Gonadotropins and the Thyroid-Stimulating Hormone. *Biology of Reproduction*, 63(1), 222-228. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.222>

Racz, L. & Goel, R., (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 58e70.

Repetto, M. & Repetto, G. (2009). Mecanismos de toxicidad. En: *Toxicología Fundamental*. Ed: Díaz de Santos, pp. 301-309.

Reznick, D. & Endler, J. (1982). The Impact of Predation on Life History Evolution in Trinidadian Guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, 36(1), 160. <https://doi.org/10.2307/2407978>

Reznick, D., Buckwalter, G., Groff, J., & Elder, D. (2001). The evolution of senescence in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*): a comparative approach. *Experimental Gerontology*, 36(4-6), 791-812. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00241-2](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00241-2)

Richter, T., Robinson, J. & Evans, N. (2002). Progesterone Blocks the Estradiol-Stimulated Luteinizing Hormone Surge by Disrupting Activation in Response to a Stimulatory Estradiol Signal in the Ewe. *Biol Reprod* 67:119-125.

Rocha, M. & Rocha, E. (2022). Synthetic Progestins in Waste and Surface Waters: Concentrations, Impacts and Ecological Risk. *Toxics*, 10(4), 163. <https://doi.org/10.3390/toxics10040163>

Rodríguez, A. (2015). Xenoestrógenos y Progestinas en el Ambiente. Riesgo de disrupción endocrina. Tesis de Grado en Farmacia. UNACHI – 2015.

- Runnalls, T., Beresford, N., Losty, E., Scott, A. & Sumpter, J. (2013). Several Synthetic Progestins with Different Potencies Adversely Affect Reproduction of Fish. *Environ Sci Technol* 47:2077-2084.
- Rupprecht, R., Reul, J. M., van Steensel, B., Spengler, D., Söder, M., Berning, B., Holsboer, F. & Damm, K. (1993). Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 247(2), 145-154. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(93\)90072-h](https://doi.org/10.1016/0922-4106(93)90072-h)
- Sanderson, H. & Thomsen, M. (2009). Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q) SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicology Letters* 187, 84-93.
- Sarasamma, S., Audira, G., Samikannu, P., Juniardi, S., Siregar, P., Hao, E., Chen, J. R. & Hsiao, C. D. (2019). Behavioral Impairments and Oxidative Stress in the Brain, Muscle, and Gill Caused by Chronic Exposure of C70 Nanoparticles on Adult Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5795. <https://doi.org/10.3390/ijms20225795>
- Scheytt T.J, Mersmann, P. & Heberer, T. (2005). Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible-displacement experiments. *J Contam Hydrol*. 2006 Feb 1;83(1-2):53-69. doi: 10.1016/j.jconhyd.2005.11.002.
- Schoenfuss, H., Bartell, S., Bistodeau, T., Cediél, R., Grove, K., Zintek, L., Lee, K. & Barber, L. (2008). Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 86(1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.004>
- Seksel, K. (2008). Behavior-modifying drugs. *Small Animal Clinical Pharmacology*, 126-147. <https://doi.org/10.1016/b978-070202858-8.50009-9>
- Shi, W. J., Ma, D. D., Jiang, Y. X., Xie, L., Zhang, J. N., Huang, G. Y., Chen, H. X., Hou, L. P., Liu, Y. S. & Ying, G. G. (2019). Medroxyprogesterone acetate affects sex differentiation and spermatogenesis in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 212, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.014>
- Sitruk-Ware, R. (2004). Pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, 47(4), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.01.001>
- Spencer, T. & Bazer, F. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 7: d1879-1898.
- Stuart, M., Kouimtzi, M. & Hill, S. R. (2007). WHO model formulary 2008. WHO model formulary 2008.
- Susel, G. (2023, enero 24). Pregnant Guppy 101: Signs, Behavior, Stages, Care & More. Pet Fish Online. Recuperado de: <https://petfishonline.com/pregnant-guppy/>

- Svensson, J., Fick, J., Brandt, I. & Brunström, B. (2013). The Synthetic Progestin Levonorgestrel Is a Potent Androgen in the Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ Sci Technol* 47:2043-2051.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas, pp. 2-7 en *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive physiology of fish*, editado por: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe. *Fish Symp*, 91. Department of animal and plant sciences University of Sheffield, Sheffield. UK.
- Swanson, P., Dickey, J. & Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53-59.
- Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94, 8-16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>
- Thomas, P. & Das, S. (1997). Correlation between binding affinities of C21 steroids for the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries and their agonist and antagonist activities in an oocyte maturation bioassay. *Biol Reprod* 57:999-1007.
- Thomas, P., Tubbs, C. & Garry, V. (2009). Progestin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progestin receptors (mPRs): Identification of mPR α on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids* 74:614-621.
- Travis, J. (1989). The Role of Optimizing Selection in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 279-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.001431>
- Tubbs, C. & Thomas, P. (2008). Functional characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPR α) subtypes: A review with new data showing mPR α expression in seatrout sperm and its association with sperm motility. *Steroids* 73:935-941.
- Ueda, H., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1985). Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 59:24-30.
- UNEP (2013) United Nations Environment Programme: Annual Report 2013. Recuperado de: <https://www.unep.org/resources/annual-report/unep-2013-annual-report>
- UNESCO & HELCOM (2017). Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region-A status report. UNESCO Emerging Pollutants in Water Series – No. 1, UNESCO Publishing, Paris.
- Vajda, A., Barber, L., Gray, J., Lopez, E., Woodling, J. & Norris, D. (2008). Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology*, 42(9), 3407-3414. <https://doi.org/10.1021/es0720661>
- Valadas, J., Mocelin, R., Sachett, A., Marcon, M., Zanette, R. A., Dallegrave, E., Herrmann, A. P. & Piato, A. (2019). Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27), 27808-27815. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05977-3>

Whitern, W. & Gordon, M. (1980). Guppies. T.F.H.

WHO/IPCS (2002): Global assessment of the state-of-the science of endocrine disruptors, en: World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2. Disponible en: www.who.int/pics/emerg_site/edc/global_edc_ch5.pdf

Winneker, R. C., Bitran, D. & Zhang, Z. (2003). The preclinical biology of a new potent and selective progestin: trimegestone. *Steroids*, 68(10-13), 915-920. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(03\)00142-9](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(03)00142-9)

World Health Organization, United Nations Environment Programme, Bergman, Å., Heindel, J. J., World Health Organization, Jobling, S., United Nations Environment Programme, Kidd, K. A., & Zoeller, R. T. (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 UNEP and WHO. United National Environment Programme.

Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R. & Lange, R. (2009). Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ Toxicol Chem* 28:2663-2670.

Zhao, Y., Castiglioni, S. & Fent, K. (2015). Synthetic Progestins Medroxyprogesterone Acetate and Dydrogesterone and Their Binary Mixtures Adversely Affect Reproduction and Lead to Histological and Transcriptional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4636-4645. <https://doi.org/10.1021/es505575v>.



AUTORIZACIÓN PARA LA INCORPORACIÓN DE TRABAJO AL REPOSITORIO JÄ DIMIKE DE LA UNACHI.

Yo, Liliana Jurado Ka Ling Lam, con cédula de identidad personal/ pasaporte 4-789-458 4-787-994, autorizo que mi trabajo (tesis, trabajo de grado, monografía, artículo, video, conferencia, libro, imagen, fotografía, audio, presentación u otro), titulado Efecto Agudo y crónicos de la exposición del pez guppy hembra (*Poecilia reticulata*) durante la gestación a formulaciones hormonales anticonceptivas sea incorporado al Repositorio JÄ DIMIKE de la Universidad Autónoma de Chiriquí, para fines educativos y no lucrativos, por lo que eximo de cualquier tipo de responsabilidad a la UNACHI y al REPOSITORIO JÄ DIMIKE con respecto a violaciones al Derecho de autor y propiedad intelectual, entre otras, y declaro que soy titular de los derechos de la obra arriba descrita, por lo cual asumo personalmente cualquier responsabilidad emanada de la publicación de la misma.

Firmo para constancia, hoy 2 de mayo de 2023

Nombre: Liliana P. Jurado Ka Ling Lam

Firma: Liliana P. Jurado Ka Ling Lam

Cédula/Pasaporte: 4-789-458 4-787-994