



Los disruptores endocrinos: un problema para la salud de especies acuícolas. El caso del etinilestradiol

Alfonsa García Ayala¹ agayala@um.es

M^a del Carmen Rodenas¹, Nuria Esther Gómez González¹, Isabel Cabas¹, M^a del Pilar García Hernández¹, Victor Mulero¹, Marta Arizcun², Elena Chaves-Pozo², Alicia García Alcázar²

¹Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

²Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía (IEO), Carretera de la Azohía s/n, Puerto de Mazarrón, 30860 Murcia, España

Resumen

Los estrógenos son esteroides que regulan diferentes aspectos reproductivos aunque tienen también un conocido papel modulador del sistema inmunitario. Estos esteroides actúan a través de los receptores de estrógenos nucleares clásicos y del receptor de membrana asociado a proteína G, GPER. El 17 α -etinilestradiol (EE₂) es un análogo estructural del estrógeno natural, 17 β -estradiol (E₂). El EE₂ es un componente activo de la píldora anticonceptiva, por lo que es excretado en la orina femenina en altas cantidades y al resistir el tratamiento en las plantas depuradoras, fácilmente, llega a los ambientes acuáticos. Diferentes estudios han demostrado que el EE₂ tiene efectos adversos sobre diferentes actividades reproductoras aunque también se ha comprobado en algunas especies que altera la respuesta inmunitaria. Por todo ello, el EE₂ es considerado un alterador o disruptor endocrino ya que altera la homeostasis de los sistemas endocrinos de los organismos y puede ocasionar, por ende, efectos adversos y generar problemas sobre la salud de las especies acuícolas.

Nuestro trabajo está centrado en una especie de teleósteo marino, la dorada (*Sparus aurata* L.), de gran interés económico en las regiones mediterráneas por su valor tanto en la pesca extractiva como en acuicultura. La dorada es una especie hermafrodita protándrica en la que el nivel plasmático de E₂ varía en las diferentes etapas del ciclo reproductor y en la que las células inmunitarias del riñón cefálico, principal órgano hematopoyético en peces, equivalente de la médula ósea, expresan alguno de los receptores de estrógenos. El EE₂ altera el nivel de expresión génica de la vitelogenina, considerado como marcador de disrupción endocrina en peces. También modifica la espermatogénesis y la esteroidogénesis y tiene un efecto principalmente inmunosupresor sobre diferentes actividades inmunitarias y la respuesta inmunitaria adaptativa de dorada por lo que, en definitiva, altera la biología de esta especie.



Introducción

Una gran variedad de compuestos químicos procedentes de la industria y de aguas residuales urbanas están contaminando tanto los medios acuáticos como la cadena alimenticia lo que puede provocar efectos adversos graves en las poblaciones que habitan ellos (Jones *et al.*, 2004), incluso a muy bajas concentraciones (Lange *et al.*, 2001). En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de diferentes contaminantes ambientales en diferentes aspectos reproductivos en peces (Segner *et al.*, 2003; Villeneuve *et al.*, 2007) aunque, también, existen evidencias de que afectan a otros procesos fisiológicos incluyendo crecimiento, desarrollo, osmorregulación, estrés y respuesta inmunitaria (Filby *et al.*, 2007). En general, generan retardo del crecimiento, desarrollo sexual inadecuado o a una disminución de la eficacia reproductora, no sólo por un efecto directo sobre la fisiología del proceso reproductor sino, en ocasiones, también por una alteración del comportamiento reproductivo que provoca, descenso de reclutamiento, entre otras. Estas alteraciones pueden alcanzar importancia a nivel ecológico cuando, afectando a la eficacia reproductora de los individuos, puede poner en riesgo la continuidad de las poblaciones. Diferentes publicaciones e informes reflejan la presencia de diversos contaminantes en estaciones depuradoras y cuencas fluviales de nuestra geografía y, muy recientemente, se ha detectado la presencia de varios alteradores endocrinos, como 17 α -etinilestradiol (EE₂), estrógeno sintético que se encuentra en los anticonceptivos orales. Sin embargo, no se ha prestado mucha atención, hasta ahora, a la resistencia de los contaminantes a la degradación lo que puede suponer su bioacumulación a través de la cadena alimenticia (Lai *et al.*, 2002), pudiendo alcanzar concentraciones nocivas para las poblaciones naturales localizadas en la cúspide de la cadena alimentaria y para el hombre como consumidor final de alimentos acuícolas con el consiguiente riesgo para la salud. Para el análisis de la posible peligrosidad de estos contaminantes, los peces son un modelo experimental de indudable valor, no sólo por sus características intrínsecas que facilitan su manejo y que permiten hacer planteamientos experimentales y extraer conocimientos útiles para otros grupos de vertebrados, sino también porque pueden ser afectados directamente por la presencia de tales compuestos y, en última instancia, afectar al bienestar de las personas a través de la cadena trófica.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que el EE₂ actúa como un alterador endocrino en dorada, especie hermafrodita protándrica y de alto valor en nuestra economía, ya que aumenta la expresión del gen que codifica para la vitelogenina y altera la fisiología testicular acompañada de una modificación de los niveles de esteroides sexuales plasmáticos (Cabas *et al.*, 2011). Estas modificaciones varían dependiendo del estado de desarrollo de los ejemplares (Cabas *et al.*, 2013a). El EE₂ no actúa como una sustancia inmunosupresora por sí misma en dorada pero modifica la capacidad de respuesta de los ejemplares frente a una infección (Cabas *et al.*, 2012) estando los granulocitos acidófilos (GAs) y los macrófagos implicados en dicha respuesta, los primeros porque expresan un receptor de estrógenos de membrana asociado a proteína G (GPER) (Cabas *et al.*, 2013b) y los segundos porque expresan



receptores de estrógenos (REs) nucleares (Liarte *et al.*, 2011). Estos estudios han demostrado, además, por primera vez, que los estrógenos son capaces de modular las funciones de los granulocitos de vertebrados a través de la vía de señalización GPER/cAMP/proteína quinasa A/CREB y permitirían establecer dianas terapéuticas para varios desórdenes inmunitarios en los que los estrógenos tienen un papel primordial (Cabas *et al.*, 2013b).

En nuestro laboratorio continuamos analizando el efecto del EE₂ sobre la respuesta inmunitaria, vía linfocitos y células cebadas, los otros dos tipos celulares inmunitarios (Gómez-González *et al.*, 2014) así como sobre diferentes aspectos reproductivos. También se están llevando a cabo experimentos que tratan de averiguar si los efectos adversos que el EE₂ provoca sobre la respuesta inmunitaria o sobre algunos aspectos reproductivos desaparecen con el cese del tratamiento.

Material y métodos

La experimentación animal realizada ha supuesto el mantenimiento de diferentes lotes de doradas de distinto grado de desarrollo sexual en el Centro Oceanográfico de Murcia perteneciente al Instituto Español de Oceanografía. Las doradas han sido alimentadas con pienso comercial (control) o expuestas a la acción del EE₂ incorporado al pienso a las dosis de 2,5 y 5 µg/g de pienso durante diferentes periodos de tiempo. Posteriormente, fueron alimentadas con pienso comercial (descanso) para comprobar si el posible efecto del EE₂ desaparece tras el cese del tratamiento. Los ejemplares fueron inmunizados con hemocianina con aluminio como adyuvante (vacunados) o PBS (no vacunados) durante el tratamiento con EE₂ y durante el posterior descanso. Se han tomado muestras de sangre e hígado para comprobar el efecto disruptor del EE₂ sobre la dorada, muestras de riñón cefálico y exudado peritoneal para comprobar el efecto del EE₂ sobre la respuesta inmunitaria y muestras de gónada e hipófisis para comprobar el efecto sobre diferentes parámetros reproductivos (Código de identificación, No A13160507, sobre uso de animales de experimentación de la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia).

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias entre tratamientos se aplicara test de ANOVA de uno a dos vías, según corresponda, seguido de un test de Tukey y para determinar diferencias entre dos grupos concretos se aplicará el test t-Student. Se tomará el valor p 0,05 para determinar las diferencias significativas. Para todos los análisis estadísticos se utilizará el programa Statgraphics 5.1.

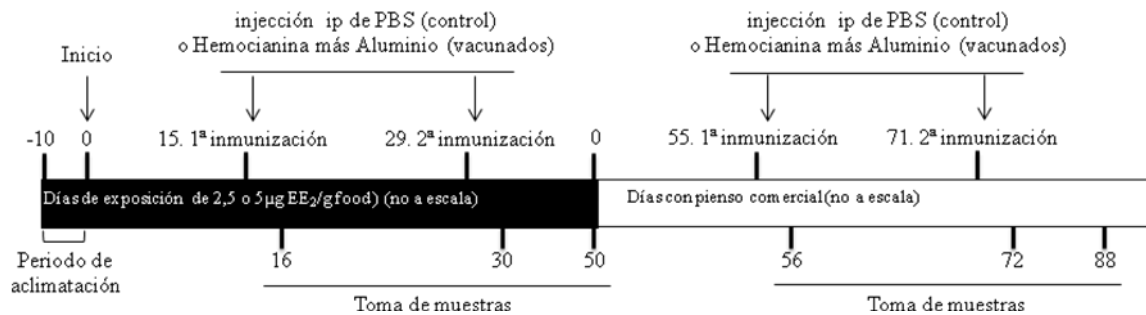


Figura 1. Diseño experimental de tratamiento con EE₂ durante 50 días. Los ejemplares son tratados con 2,5 o 5 µg EE₂/g pienso y son muestreados a los 16, 30 y 50 días del tratamiento y, además, son inmunizados con hemocianina más aluminio como adyuvante a los 15 (1^a inmunización, priming) y a los 29 (2^a inmunización, booster) días del tratamiento. A continuación, los ejemplares son alimentados con dieta comercial durante 88 días (descanso). Durante la etapa de descanso, los ejemplares son muestreados a los 56, 72 y 88 días e inmunizados a los 55 (1^a inmunización, priming) y 71 (2^a inmunización, booster) días.

Resultados y Discusión

Hemos analizado el efecto del EE₂ en la respuesta inmunitaria innata tras el análisis, entre otros, del gen que codifica para la citoquina pro-inflamatoria *il1b* y comprobamos, que tanto en ejemplares adultos como en juveniles, inhibe la inducción en la expresión del gen en respuesta a la vacunación (Figura 2a). Sin embargo, en la fase de recuperación, cuando los ejemplares han sido alimentados con pienso comercial, se comprueba que no hay diferencia en el nivel de expresión de este gen entre el grupo control y los grupos tratados inmunizados ni en adultos ni en juveniles, sugiriendo un efecto transitorio de este disruptor endocrino. Efectos similares se han comprobado tras el análisis de la expresión del gen que codifica para la citoquina anti-inflamatoria *il10* o la producción de radicales libres de oxígeno. El impacto del EE₂ en la respuesta inmunitaria adaptativa de dorada ha sido evaluado analizando la presencia de IgM específica en el suero de los peces vacunados. Como cabía esperar, los animales inmunizados mostraron unos niveles mayores de IgM específica frente al antígeno usado. Al final del tratamiento, el EE₂ incrementa los niveles de IgM específica en peces vacunados. En juveniles, observamos el mismo resultado incluso tras 4 meses de recuperación (Figura 2b). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para poder obtener un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos inmunotóxicos causados por este compuesto, teniendo en cuenta que el E₂ es capaz de incrementar la producción de Ig y el número de células productoras de Ig en la médula ósea y en el bazo (Benardi *et al.*, 2014; Erlandsson *et al.*, 2002).

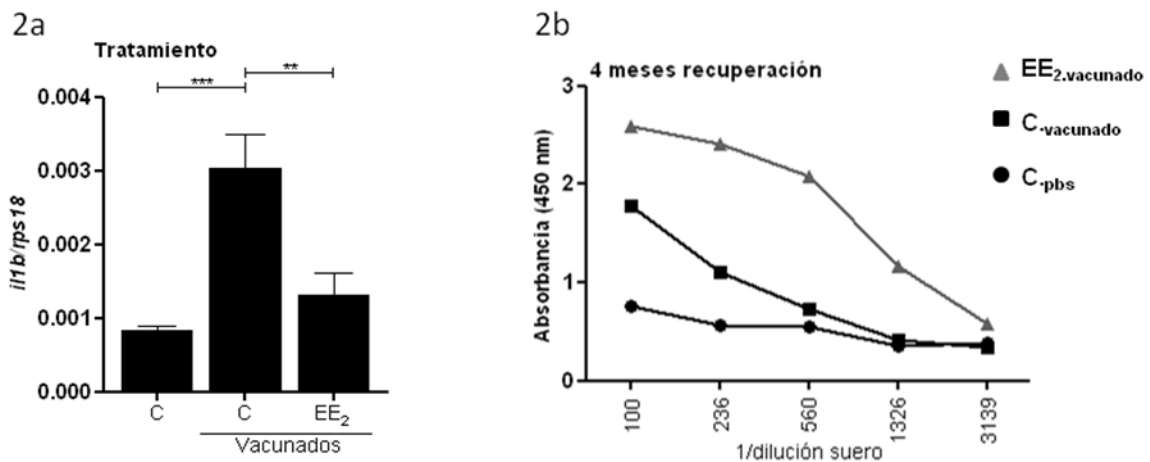


Figura 2. (a) El EE₂ modula la respuesta inmunitaria innata. Los niveles de ARNm de *il1b* fueron analizados 1 día después de la primera vacunación en riñón cefálico de peces no tratados (vacunados o no) y tratados con EE₂ (5 µg/g comida) a 2 días del cese del tratamiento mediante RT-PCR. Los niveles de expresión del gen fueron normalizados con los niveles de ARNm de *rps18* representados mediante la media ± DESVEST de cinco peces independientes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas mediante Student t-test entre: (i) peces no tratados vacunados o no y (ii) peces no tratados con los tratados con EE₂. *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001. (b) El EE₂ altera la respuesta inmunitaria adaptativa. Los niveles de IgM específica frente al antígeno hemocianina fueron determinados mediante ELISA tras 4 meses de recuperación en peces no tratados (vacunados o no) y en los tratados con EE₂ (5 mg/g comida). El tamaño de la muestra fue 5 peces/grupo.

Poco se sabe hasta ahora de la composición y la participación del exudado peritoneal de peces en la respuesta inmunitaria. El exudado peritoneal de dorada está compuesto, principalmente, por granulocitos acidófilos, células cebadas, macrófagos y linfocitos. Mediante RT-qPCR se ha comprobado que los genes que codifican para los receptores ERα y GPER se expresan en células del exudado peritoneal y, particularmente, que los del receptor GPER se expresan en células cebadas purificadas. La expresión de receptores de estrógenos en células cebadas indica que su función en el sistema inmunitario está, de alguna manera, regulada por estrógenos y que, por tanto, la presencia en el medio marino de disruptores endocrinos de carácter estrogénico, podría modular dicha función, mermando la capacidad de la dorada frente a posibles situaciones adversas. La obtención de un anticuerpo monoclonal contra células cebadas de dorada nos permitirá avanzar en el conocimiento del papel de las células cebadas en la respuesta inmunitaria y su posible implicación en la respuesta a contaminantes ambientales de carácter estrogénico.

El EE₂ altera la espermatogénesis, acelerando el proceso en las células que han iniciado la meiosis e impidiendo que nuevas espermatogonias la inicien. Además, impide la liberación de los espermatozoides. En los lóbulos del testículo, el epitelio germinal queda formado únicamente por células pre-meióticas, sin quistes de células germinales



en distintos estadios de diferenciación y la luz aparece llena de espermatozoides (Figura 3a), como se había observado en estudios previos (Cabas *et al.*, 2013a; García Hernández *et al.*, 2016).

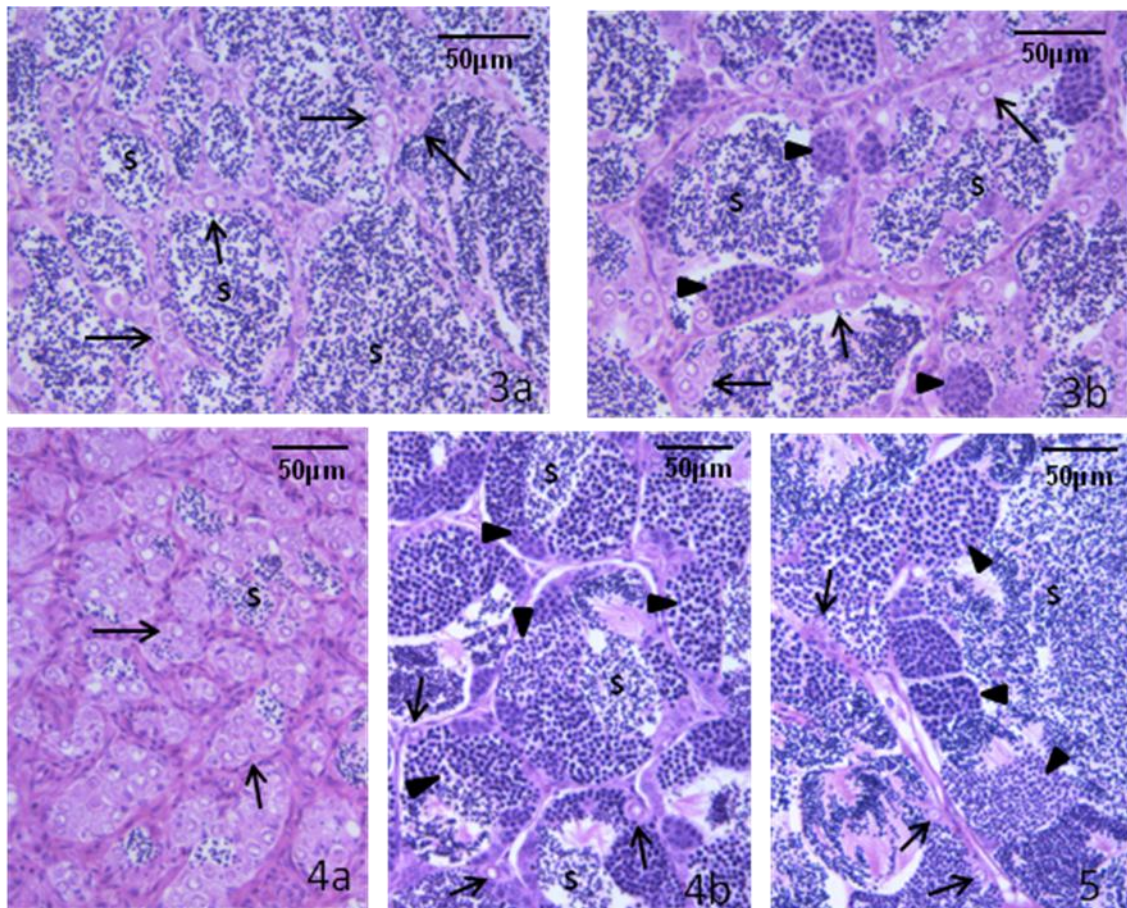


Figura 3. Testículo de dorada tratada con 5 µg (a) o 2,5 (b) EE₂/g pienso durante 28 días. **Figura 4.** Testículos de dorada tratada con 5 µg (a) o 2,5 (b) EE₂/g pienso durante 28 días y vuelta a alimentar con pienso comercial durante 14 días. **Figura 5.** Testículo de dorada en espermatogénesis (control). Las flechas indican células premeióticas y las puntas de flecha, quistes de células germinales en distintas etapas de diferenciación; S, espermatozoides.

Estos efectos dependen de la dosis de EE₂ suministrada, siendo menos acusados en los peces tratados con 2,5 µg/g pienso, en cuyos testículos quedan quistes de células meióticas (Figura 3b). El cese del tratamiento durante 15 días permite, a los peces tratados con 5 µg EE₂/g pienso, la liberación de los espermatozoides, quedando los testículos con un aspecto similar al estado de post-puesta funcional/de peces sin tratar (Figura 4a), como se observó, en estudios previos, después de un periodo de 25 días de recuperación con alimentación estándar tras el tratamiento con 5 µg EE₂/g pienso (García Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo, en los peces tratados con 2,5 µg EE₂/g pienso, el cese del tratamiento durante 15 días permite la recuperación del proceso (Figura 4b),



ofreciendo los testículos de estos peces el aspecto típico de espermatogénesis, con un epitelio germinal formado por células pre-meióticas y quistes de células germinales en distintos estadios de diferenciación, y abundantes espermatozoides en la luz de los lóbulos (Figura 5). Por otra parte, aunque el EE₂ afecta a la expresión de algunos genes implicados en la esteroidogénesis, los niveles de esteroides sexuales en suero sanguíneo pueden no verse afectados, observándose una gran variabilidad que depende del estado de cada individuo.

Agradecimientos

Al Servicio de Apoyo a la Investigación” de la Universidad de Murcia por el apoyo técnico en los ensayos de cultivo de células, microscopía y PCR. Esta investigación ha sido financiada por la *Fundación Séneca* (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, 19883/GERM/15) y el *Ministerio de Economía y Competitividad* (AGL2014-53167-C3-1-R, AGL2014-53167-C3-2-R).

Referencias bibliográficas

- Bernardi AI, Andersson A, Grahne L, Nurkkala-Karlsson M, Ohlsson C, Carlsten H, Islander U 2014. *Immun Inflamm Dis* 2: 214-225.
- Cabas I, Chaves-Pozo E, Alcázar AG, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A 2011. *Mol Immunol* 48: 2079-2086.
- Cabas I, Liarte S, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A 2012. *Dev Comp Immunol* 36: 547-456.
- Cabas I, Chaves-Pozo E, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A 2013a. *Mar Drugs* 11:4973-4992.
- Cabas I, Rodenas MC, Abellán E, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A 2013b. *J Immunol* 191: 4628-4639.
- Erlandsson MC, Jonsson CA, Lindberg MK, Ohlsson C, Carlsten H 2002. *J Endocrinol* 175: 319-327.
- Filby AI, Neuparth T, Thorpe KL, Owen R, Galloway TS, Tyler CR 2007. *Environ Health Perspect* 115, 1704-1710.
- García Hernández MP, Rodenas MC, Cabas I, García-Alcázar A, Chaves-Pozo E, García-Ayala A 2016. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 179: 94-106.



- Gómez-González NE, García-García E, Montero J, García-Alcázar A, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V 2014. *Fish Shellfish Immunol* 40: 225-232.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN 2004. *Crit Rev Toxicol* 34: 335-350.
- Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN 2002. *Sci Total Environ* 289: 159-168.
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, 2001. *Environ Toxicol Chem* 20: 1216-1227.
- Liarte S, Chaves-Pozo E, Abellán E, Meseguer J, Mulero V, Canario AV, García-Ayala A 2011 *Dev Comp Immunol* 35: 840-849.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M Wenzel A, 2003. *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 302-314.
- Villeneuve DL, Larkin P, Knoebl I, Miracle AL, Kahl MD, Jensen KM, Makynen EA, Durhan EJ, Carter BJ, Denslow ND, Ankley GT, 2007. *Environ Sci Technol* 41: 321-33.