

Alteración endocrina en poblaciones de peces de estuarios vascos: evaluación mediante biomarcadores y análisis histológico

Maren Ortiz-Zarragoitia, Cristina Bizarro, Eunete Puy-Azurmendi, Miren P. Cajaraville

Grupo de Investigación BCTA, Dpto. Zoología y Biología Celular Animal,
Facultad de Ciencia y Tecnología y Estación Marina de Plentzia, UPV/EHU.
maren.ortiz@ehu.es

La salud del medio acuático depende críticamente de los aportes de sustancias contaminantes como consecuencia de la actividad humana, en concreto de la influencia de los vertidos agrícolas, urbanos e industriales, que terminan finalmente en ríos y estuarios. Un gran número de los contaminantes conocidos son tratados y eliminados de las aguas residuales mediante una red normalizada de depuradoras, pero existen varios contaminantes que por su naturaleza química evitan la acción de los sistemas de depuración. Además, muchos de ellos, como por ejemplo los retardantes de llama bromados, los detergentes de tipo alquilfenol etoxilado y algunos fármacos, son alteradores endocrinos (DE), lo que implica que una exposición a los mismos puede dar lugar a alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los organismos vivos. Una de las alteraciones más alarmantes y mejor documentadas es la feminización en organismos acuáticos¹⁻³.

El grupo de investigación consolidado Biología Celular en Toxicología Ambiental (BCTA) lleva más de 25 años investigando el impacto de la contaminación ambiental sobre los organismos acuáticos, así como en el desarrollo de biomarcadores tempranos como herramientas diagnósticas de la salud de las poblaciones animales y ecosistemas. Las principales líneas de investigación del grupo incluyen la evaluación de la salud de los ecosistemas acuáticos mediante biomarcadores, la toxicogenómica, la carcinogénesis causada por exposición tanto a contaminantes orgánicos, la toxicidad de nanopartículas, y alteración endocrina en poblaciones de peces e invertebrados marinos (www.ehu.es/GrupoBCTA).

Los primeros trabajos desarrollados por nuestro grupo en el campo de la alteración endocrina, estuvieron enfocados al estudio y caracterización de poblaciones de mejillones de la costa vasca y el Mediterráneo occidental^{4,5,6}. Se detectaron mejillones intersex en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai, indicando la exposición a compuestos alteradores endocrinos. Estos estudios fueron completados con experimentos realizados en el laboratorio dentro del proyecto europeo BEEP (2001-2003), en el que se demostró que la exposición de mejillones a disruptores endocrinos modelos (alquilfenoles, ftalatos, bisfenol-A, compuestos

polibromados, petróleo y PAH), alteraba el desarrollo gametogénico normal⁷. Estudios complementarios con mejillones expuestos a petróleo del Mar del Norte, demostraron que las alteraciones tempranas en el desarrollo gametogénico (atresia de gametos y cambios en el contenido de proteínas vitelogénicas en los ovocitos) condicionaban la calidad de los gametos y el éxito de fecundación. Además, los embriones y larvas obtenidos de los parentales expuestos al petróleo, mostraron desarrollo anormal y viabilidad reducida⁸. La experiencia acumulada en estos estudios, junto con el desarrollo de biomarcadores específicos en mejillones (niveles de atresia en gónada, niveles de vitelogenina mediante el método de ALP), posibilitó la detección de efectos de disrupción endocrina causados por el vertido del petrolero Prestige, en poblaciones de mejillones de toda la costa norte peninsular⁹.

En la línea de investigación sobre alteradores endocrinos se han realizado varios trabajos con el modelo pez cebra, en condiciones de laboratorio y tras exposición a alteradores endocrinos (ftalatos, hormonas estrogénicas, pesticidas organoclorados, alquilfenoles, etc.). Los estudios han comprendido experimentos realizados con individuos adultos, larvas y embriones e incluso estudios transgeneracionales¹⁰⁻¹². Estos trabajos nos han permitido desarrollar herramientas moleculares y celulares como biomarcadores de alteración endocrina en peces, que puedan ser utilizadas en estudios de campo.

Entre los biomarcadores comúnmente utilizados se encuentran los niveles de vitelogenina en plasma o a nivel de transcripción génica en hígado. Organizaciones como la US-EPA, OSPAR y el programa ICES incluyen este parámetro entre sus baterías de ensayos y biomarcadores de xenoestrogenicidad¹³⁻¹⁵. La vitelogenina es una fosfolipoproteína compleja unida calcio. Es la proteína precursora de las vitelinas y fosvitinas que se acumulan en los ovocitos de los organismos ovíparos como fuente de energía para el embrión en desarrollo. Su síntesis ocurre en el hígado de las hembras y en paralelo con el desarrollo de la ovogénesis. El control de la vitelogenénesis en hígado está regulado directamente por estrógenos¹⁶. En machos u organismos juveniles indiferenciados ovíparos, la exposición a estrógenos

o xenoestrógenos puede producir la síntesis de esta proteína y por lo tanto su detección es una clara señal de feminización¹⁶. Otro biomarcador específico de xenoestrogenicidad en peces es la transcripción de la aromatasa cyp19a2, o aromatasa cerebral¹⁷. En peces el gen de la aromatasa (cyp19) está duplicado mostrando dos isoformas funcionales (cyp19a1 y cyp19a2). Ambas participan en la síntesis de estrógenos partiendo de andrógenos, pero su distribución tisular así como su periodo de actividad difiere entre ambas. La cyp19a1 se expresa principalmente en el ovario y la cyp19a2 en el cerebro¹⁸. La regulación de esta última ocurre mediante exposición a compuestos estrogénicos y se utiliza como biomarcador, junto con la vitelogenina. Son varios los trabajos que sugieren que cyp19a2 puede ser más sensible como biomarcador de xenoestrogenicidad que la vitelogenina. El conjunto de ambos biomarcadores mencionados, con el estudio de los receptores de estrógenos y genes reguladores de los niveles de hormonas esteroideas (StAR, cyp11b, sulfotransferasas, glucuronidasas, etc.), puede ayudar en la evaluación de poblaciones de campo expuestas a disruptores endocrinos presentes en el medio acuático³.

Además de los biomarcadores, el estudio de posibles alteraciones histopatológicas en la gónada es un complemento necesario para caracterizar la severidad del impacto causado por alteradores endocrinos en poblaciones de campo^{19,20}. Algunas de las señales de exposición a contaminantes alteradores endocrinos son las alteraciones en el patrón normal del desarrollo gametogénico, los daños en los gametos (atresia, necrosis) y la presencia de gónadas intersex. En especial, la detección de organismos intersex está asociada a la presencia de contaminantes con actividad xenoestrogénica. Los individuos intersex muestran gónadas masculinas (testículos) con diferentes grados de aparición de ovocitos. Esta patología condiciona la capacidad reproductora de los organismos afectados y aunque puede ser reversible dependiendo del periodo de exposición (embrión, larva, juvenil o adulto) a alteradores endocrinos, el efecto intersex se puede mantener de por vida en el organismo afectado²¹.

En complemento a la estrategia de estudios *in vivo*, la aplicación de bioensayos *in vitro* ofrece la posibilidad de comprender los mecanismos de acción de los alteradores endocrinos y de mezclas ambientales, como efluentes residuales y muestras de aguas. Los ensayos gene reporter, en el que las células son transfectadas con un receptor nuclear de hormonas (por ejemplo, receptor de estrógenos) y un gen dependiente de la activación del receptor, son una herramienta rápida y útil.

En la costa vasca hemos centrado nuestras investigaciones en peces de la familia de los mugílidos. Los mugílidos tienen la ventaja de estar presentes en casi todas las zonas costeras del mundo, con excepción de las áreas polares. Son especies que resisten la contaminación, pero que muestran respuestas que pueden ser cuantificables y utilizadas como herramientas de diagnóstico²²⁻²⁴. Además, su captura y manejo son relativamente sencillos, y el control de su sistema endocrino es similar al de otras especies con mayor importancia comercial. Nuestros estudios se han centrado principalmente en la especie *Chelon labrosus*, o muble, con una amplia distribución en los estuarios vascos.

Estas investigaciones con mubles de la costa vasca comenzaron en el año 2007 y se han mantenido con regularidad hasta la actualidad. En los años 2007 – 2008 se realizó un seguimiento intensivo de la población de peces de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (Gernika) en la que se detectaron mubles intersex (hasta un 33 % de los peces estudiados en 2007). La mayor parte de estos organismos intersex mostraban ovocitos previtelogénicos (inmaduros) en los testículos, pero también se encontraron machos con ovocitos vitelogénicos²⁵. Además, en la mayoría de los machos analizados (entre un 60 y 91 % dependiendo de la campaña de muestreo) se pudieron cuantificar niveles elevados de vitelogenina en plasma. El análisis químico de la bilis de los mubles de Gernika mostró la presencia de disruptores endocrinos, principalmente alquilfenoles como el nonilfenol y el octilfenol. Estos estudios pioneros en la costa vasca, se extendieron a otras poblaciones (Santurtzi, Arriluze, Plentzia, Ondarroa, Deba y Pasaia). En todas las poblaciones analizadas hemos detectado respuestas tempranas asociadas a efectos de alteración endocrina (niveles elevados de vitelogenina en plasma y niveles de transcripción elevados de la aromatasa cyp19a1b en cerebro y de vitelogenina en hígado), y presencia de peces intersex en 3 de las 6 poblaciones estudiadas. Las prevalencias de intersex oscilaron entre un 12 % y un 64 % de los machos estudiados. El patrón de contaminantes presentes en la bilis variaba bastante de una población a otra, pero no entre sexos dentro de una misma población. Destacar que entre los principales compuestos detectados se encontraron alquilfenoles (octilfenol y nonilfenol), ftalatos, pesticidas organoclorados (lindano y derivados del DDT), bisfenol A y etinilestradiol, todos ellos compuestos con actividad hormonal demostrada.

En base a los estudios de campo, y teniendo en cuenta que muchos de los contaminantes detectados en bilis pueden tener su origen en efluentes de depuradoras urbanas, se analizaron dos efluentes de depuradoras

para evaluar su actividad hormonal. Se seleccionaron la depuradora de aguas residuales de Galindo, que recoge las aguas residuales de la ciudad de Bilbao y zonas adyacentes (1 000 000 de personas aproximadamente) y el efluente de la depuradora de Gernika situada dentro de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai. Para evitar posibles efectos debido al lugar de origen de los mubles expuestos, se decidió adquirir alevines de muble criados en cautividad de un año de edad. La exposición se realizó durante 10 días, a distintas diluciones de los efluentes (25 %, 50 % y 75 %). Se observó que las aguas de ambos efluentes eran capaces de producir efectos xenoestrogénicos en los mubles expuestos, como la inducción de la transcripción de los genes vitelogenina y aromatasa *cyp19a1b*. Estos resultados in vivo fueron confirmados en ensayos in vitro, utilizando el ensayo basado en células de levadura ER-CALUX con extractos del agua de ambas depuradoras. Estos trabajos demuestran la presencia de disruptores endocrinos en los estuarios vascos, cuyo principal origen pueden ser los efluentes de depuradoras de aguas residuales urbanas, sin olvidar otras fuentes de exposición como vertidos industriales, agrícolas o accidentales.

En base a todos estos resultados, y siguiendo las recomendaciones para la implementación de un programa de vigilancia biológica propuesta por la Directiva Marco del Agua Europea y la Directiva Marco sobre Estrategia Marina, se propone la inclusión en las redes de seguimiento de la calidad de las aguas de biomarcadores sencillos y tempranos de disrupción endocrina. La estrategia propuesta consiste en dos pasos sucesivos: un primer cribado basado en procedimientos rápidos y sencillos, como el análisis histopatológico de la gónada y la cuantificación de los niveles de vitelogenina en plasma; y un segundo análisis utilizando herramientas de biología molecular (niveles de transcripción de genes diana) para caracterizar los mecanismos con precisión, junto con el análisis de metabolitos de compuestos alteradores endocrinos en la bilis.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por: Gobierno Vasco (ayuda a grupos de investigación consolidados GIC07/26-IT-393-07), Agencia Vasca del Agua y UPV/EHU (UFI11/37).

REFERENCIAS

1. EEA (European Environmental Agency). The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments. EEA Technical Report 2/2012. Copenhagen, Denmark. 2012.
2. Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, Rosivatz E. State of the Art Assessment of Endocrine Disruptors. Final Report (Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3), 2011; pp 135.
3. WHO/UNEP. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012. Eds: Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. Geneva (Switzerland). 2013.
4. Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 2010;73:693-701.
5. Puy-Azurmendi E, Ortiz-Zarragoitia M, Kuster M, Martínez E, Guillamón M, Domínguez C, Serrano T, Barbero MC, López de Alda M, Bayona JM, Barceló D, Cajaraville MP. An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve mollusks from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Mar. Environ. Res.* 2010;69:S63-S66.
6. Zorita I, Apraiz I, Ortiz-Zarragoitia M, Orbea A, Cancio I, Soto M, Marigómez I, Cajaraville MP. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environ. Pollut.* 2007;148:236-250.
7. Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2006;50: 361-369.
8. Baussant T, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Bechmann RK, Taban IC, Sanni S. Effects of chronic exposure to dispersed oil on selected reproductive processes in adult blue mussels (*Mytilus edulis*) and the consequences for the early life stages of their larvae. *Mar. Poll. Bull.* 2011;62:1437-1445.
9. Ortiz-Zarragoitia M, Garmendia L, Barbero MC, Serrano T, Marigómez I, Cajaraville MP. Effects of the fuel oil spilled by the Prestige tanker on reproduction parameters of wild mussel populations. *J. Environ. Monitor.* 2011;13:84-94.
10. Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 2005;141:133-144.
11. Ortiz-Zarragoitia M, Trant JM, Cajaraville MP. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol Chem* 2006;25:2394-404.
12. Puy-Azurmendi E, Olivares A, Vallejo A, Ortiz-Zarragoitia M, Piña B, Zuloaga O, Cajaraville MP. Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers in vitro by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. *Sci. Total Environ.* *In press.*
13. Davies IM, Vethaak AD. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report No. 315. 277 pp. 2012.
14. OSPAR. Background Document on Biological Effects Monitoring Techniques. Publication number 333/2007. 2007. pp 122.
15. Skillman AD, Cullinan V, Blanton ML, Schultz IR. Comparative Evaluation of Vitellogenin Methods. Final Report (Contract number 68-W-01-023). 2003 pp 47.

16. Arukwe A, Goksøyr A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic protein for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* 2003;2:4.
17. Kallivretaki E, Eggen R, Neuhauss S, Alberti M, Kausch U, Segner H. Aromatase in zebrafish: A potential target for endocrine disrupting chemicals. *Mar. Environ. Res.* 2006;62:S187-S190.
18. Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002;208:191-364.
19. OECD. OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads. Eds: Johnson R, Wolf J, Braunbeck T. 2009. pp 96.
20. US-EPA. Histopathology guidelines for the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) 21-day reproduction assay. 2006. Pp 59.
21. Söffker M, Tyler CR. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish – a critical review on effects and possible consequences. *Critical Rev. Toxicol.* 2012;42:653-668.
22. Bilbao E, Raingard D, Diaz de Cerio O, Ortiz-Zarragoitia M, Ruiz P, Izagirre U, Orbea A, Marigómez I, Cajaraville MP, Cancio I. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquat. Toxicol.* 2010;98:282-296.
23. Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquat Toxicol* 2005;69:347-357.
24. Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville MP. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs, and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat Toxicol* 2002;58:75-98.
25. Puy-Azurmendi E, Ortiz-Zarragoitia M, Villagrasa M, Kuste M, Aragón P, Atienza J, Puchades R, Maquieira A, Domínguez C, López de Alda M, Fernandes D, Porte C, Bayona JM, Barceló D, Cajaraville MP. Exposure and effects of endocrine disruptors in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay). *Sci. Total Environ.* 2013;443:233-244.