

NIVELES SÉRICOS DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN POBLACIONES DE TRUCHA COMÚN (SALMO TRUTTA FARIO) DEL NORTE DE CASTILLA Y LEÓN

J. Martín Gil¹, S. Hernández Navarro¹, Francisco J. Martín Gil², Andrés Martínez Rodríguez¹, Javier Álvarez Martínez¹, Mariana Val Gaudó¹, Norlan M. Ruiz Potosme¹

(1) Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, E.T.S.IIAA., Universidad de Valladolid, Campus de la Yutera, Avenida de Madrid, 44, 34004, Palencia.

Correo electrónico: inpaisal@iaf.uva.es

(2) Hospital Universitario "Río Hortega" Valladolid.

Resumen:

En este estudio se muestra como el grado de masculinización y feminización de las truchas puede ser establecido a través de los niveles plasmáticos de 17- α -hidroxiprogesterona, testosterona y 17- β -estradiol. Asimismo, también se muestra que los niveles plasmáticos de estas hormonas en truchas pueden ser considerados un marcador útil para estimar el grado de contaminación estrogénica de las aguas. El análisis de nuestros resultados para poblaciones de trucha común del norte de Castilla y León permite concluir que las aguas de los ríos de esta zona geográfica se encuentran estrogénicamente más contaminadas que las de las piscifactorías. Las mejores evidencias de feminización de truchas macho se han observado en ejemplares capturados en el río Órbigo, que ha resultado estar más contaminado que el Carrión, Arlanzón, Arlanza y Porma. La determinación adicional de niveles de cortisol para todas las poblaciones estudiadas y el hallazgo de valores bajos para la mayor parte de las sometidas a cautividad ha permitido evidenciar que éstas sufren un bajo nivel de estrés, lo que resulta altamente deseable en acuicultura.

Palabras clave: acuicultura, ordenación pesquera, conservación, reproducción, inmunoensayo, calidad del agua, estrés.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es una función clave para la perpetuación de las especies en la naturaleza. En peces, el control de esta función biológica es indispensable para asegurar la producción de cualquier industria acuícola (BLANCO, 1995). Sin embargo, un control eficaz de este y otros procesos (ordenación pesquera, estaciones depuradoras de aguas residuales) requiere conocimientos profundos de los mecanismos en cuestión, siendo las hormonas esteroideas parámetros esenciales (ANDERSEN *et al.*, BARONTI *et al.*, OLBROCK *et al.*, YUAN *et al.*). En peces existen pocos estudios sobre la caracterización y función de las hormonas esteroideas (THOMAS-JONES *et al.*, THORPE *et al.*, RADICE *et al.*). El abordaje de este tipo de estudios en peces se ve dificultado por la falta de equipamiento metodológico para realizarlos, las cuales se encuentran inevitablemente en contados centros de investigación y, principalmente, en laboratorios hospitalarios dedicados a la endocrinología humana. En el presente trabajo se hace uso de tales equipos automatizados para estudios de fertilidad en peces, así como su aplicación para la ordenación pesquera, la acuicultura y la conservación, tomando como modelo la trucha. Los objetivos concretos a alcanzar son: 1. Disponer de valores medios e intervalos de referencia para cada una de las hormonas consideradas, tanto para truchas machos como hembras a lo largo del ciclo reproductivo. 2. Conocer el efecto de la calidad del agua sobre los niveles hormonales de la trucha. 3. Conocer el efecto de la alimentación sobre los niveles hormonales. 4. Conocer el efecto del estrés sobre esos niveles. 5. Interpretar los acontecimientos fisiológicos que desencadena la acción de las diversas hormonas en truchas.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

La metodología llevada a cabo en la investigación ha consistido en tomar varios ejemplares de *Salmo trutta fario* (trucha común) de cada una de las zonas de estudio: Burgos, León y Palencia. El número de muestras se corresponde con individuos de las piscifactorías de El Soto (Celadilla del Río, Palencia), Vegas del Condado (León), Quintanar de la Sierra (Burgos) e individuos de los ríos Carrión, Arlanzón, Órbigo y Porma. El número de ejemplares asciende a un total de 56. Una vez capturados se les ha extraído el suero sanguíneo. Previamente se les ha anestesiado para inmovilizarlos y así facilitar la toma de sangre. La punción se ha realizado en el pedúnculo caudal, ventralmente y la sangre se ha obtenido de la vena caudal. Una vez reanimados son devueltos al agua.

La determinación cuantitativa de Progesterona en suero sanguíneo de truchas se ha llevado a cabo mediante un ensayo inmunoquímico de micropartículas (MEIA), según el sistema Abbott Diagnostics, en un autoanalizador AxSYM. La determinación cuantitativa de Cortisol en suero sanguíneo de truchas se ha realizado mediante un inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (FPIA) según el sistema Abbott Diagnostics, también en un autoanalizador AxSYM. Las determinaciones, 17- α -hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol se han realizado por radioinmunoanálisis (RIA). La determinación cuantitativa de 17- β -estradiol y testosterona en suero sanguíneo de truchas se ha llevado a cabo mediante un inmunoensayo quimioluminiscente basado en micropartículas (CMIA), según el sistema Architect de Abbott Diagnostics, en un autoanalizador Architect i2000. Previo a las determinaciones se ha realizado, tanto para 17- β -estradiol como para testosterona, una curva de calibración a seis puntos, con calibradores por duplicado. Adicionalmente, se han introducido, a lo largo de la serie y en el curso de cada determinación hormonal en las muestras séricas, 14 controles internos, 6 controles externos y 7 blancos, a efectos de garantía de la calidad.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En las Tablas 1 a 5 aparecen recogidos algunos de los análisis de hormonas efectuados en sueros de truchas, para un periodo de no desove en el río Porma (León) y en la Piscifactoría de Quintanar de la Sierra. En el resto de ríos y piscifactorías analizados solo recogemos los resultados que se ofrecen seguidamente.

Los niveles séricos de cortisol en las truchas del río Órbigo son normales (valor medio: 9,6 $\mu\text{g/dL}$; intervalo de referencia: 4,7-14,5 $\mu\text{g/dL}$). Sin embargo, los valores de cortisol de las truchas de Soria, Quintanar de la Sierra y Acera de la Vega resultan discretamente altos (entre 16 y 18 $\mu\text{g/dL}$). Es preciso destacar los bajos valores de cortisolemia ($< 6 \mu\text{g/dL}$) en las truchas del río Arlanzón, tanto en San Medel como en Ibeas de Juarros.

Las concentraciones séricas de progesterona en las truchas del río Órbigo, Soria y Acera de la Vega son normales (entre 0,06 y 0,14 ng/mL). Los únicos valores de progesterona elevados los encontramos en las truchas de la piscifactoría de Quintanar del Río (0,46 ng/mL). Consideramos que los valores elevados de progesterona en las truchas de Quintanar no son reales y se deben al efecto de la hemólisis de los sueros, producido por una extracción traumática.

Existe una cierta asociación inversa entre los resultados de 17- β -estradiol y testosterona. Los resultados combinados de 17- β -estradiol y testosterona permiten diferenciar machos de hembras en la mayor parte de los casos.

A la vista de los datos hormonales obtenidos en los sueros de las truchas de Piscifactoría del Condado, puede establecerse una asociación inversa entre los correspondientes a 17- β -estradiol y 17- α -hidroxiprogesterona ($r = -0,938$). Los resultados combinados de 17- β -estradiol y 17- α -hidroxiprogesterona también permiten diferenciar machos de hembras en la mayor parte de los casos. La insuficiencia de resultados de 11-desoxicortisol ha impedido establecer comparaciones con niveles de otras hormonas. En el caso de los sueros de las truchas de la Piscifactoría del Condado, cuatro muestras han proporcionado valores de 11-desoxicortisol muy correlacionados con los de 17- α -hidroxiprogesterona ($r = 0,983$) pero los resultados obtenidos para la muestra restante descartan la generalización de esta asociación.

A la vista de los datos obtenidos para 17- α -hidroxiprogesterona, testosterona y cortisol en los sueros de las truchas de San Medel, podemos afirmar que existe una asociación directa significativa entre los niveles de 17- α -hidroxiprogesterona y testosterona ($r = 0,9$), pero no entre los niveles de 17- α -hidroxiprogesterona y cortisol ($r = 0,53$).

El hecho de que la toma de muestras ha sido realizada en un periodo de no desove, ha determinado que los niveles de progesterona aparezcan bajos en todos los casos (el valor más alto ha resultado ser 1 ng/mL). La utilidad de los análisis de progesterona realizados radica en la consecución de niveles basales a los cuales podremos referir los resultados que obtengamos en periodos de desove.

No hemos observado asociaciones significativas entre los niveles séricos de progesterona, cortisol, testosterona y 17- β -estradiol cuando hemos comparado los pares: progesterona-cortisol, progesterona-estradiol, progesterona-testosterona y 17- β -estradiol-cortisol. En el caso de las asociaciones en las que interviene la progesterona ha de tenerse en cuenta que, aunque fidedignos, los bajos valores obtenidos para esta hormona limitan el valor de las comparaciones realizadas. Tampoco se ha encontrado, en contra de lo que cabía esperar, relación significativa alguna, entre los niveles de cortisol y testosterona ($r = -0,23$) estudiados en las poblaciones más "estresadas" correspondientes a los ríos Porma, Carrión (Acera de la Vega) y piscifactoría de Quintanar de la Sierra.

El examen de resultados de niveles de 17- β -estradiol sérico en las poblaciones de truchas estudiadas pone de manifiesto su diferente grado de contaminación estrogénica. Las truchas del río Órbigo (valor medio: 1098 pmol/L) están más estrogénizadas que las del Carrión (valor medio: 655 pmol/L) o el río Arlanza (valor medio: 528,5 pmol/L) y las de éstos, más estrogénizadas que las de las restantes procedencias.

Los niveles de estradiol en truchas macho de la Piscifactoría de Celadilla criados en aguas de diferentes procedencias muestran niveles de estradiol ligeramente diferentes. Los procedentes del Carrión están menos estrogénizados (valor medio: 127,2 pmol/L) que los del Pisuega (media: 128,15 pmol/L) y ambos, menos

que los cultivados en aguas reutilizadas (media: 181,25 pmol/L). Sin embargo, la baja significatividad de las diferencias, y la escasez de datos no permite mantener esta observación como definitiva.

La similitud encontrada entre los niveles de testosterona de las truchas provenientes de las piscifactorías (valor medio de 2,04 ng/ml) y los niveles observados en las de los ríos (media: 1,97 ng/ml), así como la diferencia del grado de estrogenización, que es ligeramente mayor en los ríos (valor medio de 17-beta-estradiol de 0,14 ng/ml), que en las piscifactorías (media de 17-beta-estradiol de 0,081ng/ml) sugiere la falta de técnicas de manipulación genética y alimenticias empleadas en la mejora de la acuicultura.

CONCLUSIONES

1. Dada la asociación directa de los resultados de 17- α -hidroxiprogesterona con los de testosterona ($r = 0,9$) y la asociación inversa de los resultados de cada uno de estas ensayos con los de 17- β -estradiol, podemos concluir que la información de las tres hormonas es redundante y que bastaría determinar una de ellas para estimar el grado de masculinización/feminización de las truchas. Así mismo, podemos afirmar que nuestros resultados de 17- β -estradiol y testosterona son elucidativos para establecer el sexotipado en truchas.
2. A falta de determinaciones de hormonas libres en el agua de los ríos y de las piscifactorías, los niveles plasmáticos de hormonas en truchas resultan ser un marcador útil para estimar el grado de contaminación estrogénica de las aguas. De nuestros resultados se puede concluir que las aguas de los ríos están más contaminadas por estrógenos que las de las piscifactorías. El cumplimiento de la normativa sobre aguas por parte de los piscicultores y la disponibilidad de agua de manantial en la mayor parte de las instalaciones ha llevado a un grado de calidad del agua deseable.
3. Los resultados muestran un 42% de 17-beta-estradiol más, en los ejemplares de los ríos que en las truchas de las piscifactorías. Puesto que este estrógeno es muy lábil en el agua, y existen mecanismos naturales de eliminación de este contaminante: almacenamiento en el tejido adiposo de los animales, excreción en forma conjugada no dañina, disminución por acción hormonal en momentos de estrés, se aprecia la necesidad de una fuerte presión estrogénica y un aporte continuo de 17- beta-estradiol en los ríos para alcanzar las cifras obtenidas.
4. Las mejores evidencias de feminización de truchas macho se han observado en los ejemplares capturados en el río Órbigo, que ha resultado estar más contaminado que el Carrión, Arlanzón, Arlanza y Porma.
5. El perfil de determinaciones hormonales en suero de truchas siempre ha de incluir la petición de cortisol. Esta hormona es un marcador del estrés y la existencia de bajos valores en poblaciones en cautividad es de alto interés en acuicultura.
6. La determinación sérica de niveles de progesterona solo tiene interés como marcador de ovulación. Toda vez que el presente estudio ha sido realizado en periodo de no desove, ningún ejemplar de los estudiados ha exhibido los valores altos que son de esperar tras la ovulación.
7. A la vista de la similitud encontrada entre los niveles de testosterona de los ejemplares provenientes de los ríos y de las piscifactorías, así como el diferente grado de estrogenización que muestran los resultados de ambos, podemos concluir que no existe ninguna técnica de manipulación genética ni alimenticia (fitoestrógenos como la soja o estrógenos de las harinas de pescado suministrados en forma de pienso en las piscifactorías) en las instalaciones estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, H., SIEGRIST, H., HALLING-SORENSEN, B., TERNES, T.A. 2003. "Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant". Environmental Science and Technology, vol. 37, nº 18.
- BARONTI, CH., CURINI, R., D'ASCENZO, G., GENTILI, A., SAMPERI, R. 2003. "Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water". Environmental Science and Technology, vol. 37, nº 24.
- BLANCO CHAFEIRO, M. C. 1995. "La Trucha: Cría Industrial". 2ª edición, Mundi- Prensa.
- OLBROK, D., NOVAK, J.T., GRIZZARD, T.J., LOVE, N. 2003. "Response to Comment on Estrogen Receptor Agonist Fate during Wastewater and Biosolids Treatment Processes: A Mass Balance Analysis". Environmental Science and Technology, vol. 37, nº 20.
- RADICE S, FUMAGALLI R, CHIESARA E, FERRARIS M, FRIGERIO S, MARABINI L. 2004. "Estrogenic activity of procymidone in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes: a possible mechanism of action." Chem Biol Interact. Mar 15;147(2):185-93.
- THOMAS-JONES E, THORPE K, HARRISON N, THOMAS G, MORRIS C, HUTCHINSON T, WOODHEAD S, TYLER C. 2003 "Dynamics of estrogen biomarker responses in rainbow trout exposed to 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol". Environmental Toxicology Chemistry. Dec;22(12):3001-8.
- THORPE, K., CUMMINGS, R.J., HUTCHINSON, T.H., SCHOLZE, M., SUMPTER, J.P., TYLER, CH. 2003. "Relative Potencies and Combination Effects of Steroidal Estrogens in Fish". Environmental Science and Technology, vol.37, 1142-1149.
- YUAN, T. 2003 "Comment on Estrogen Receptor Agonist Fate during Wastewater and Biosolids Treatment Processes: A Mass Balance Analysis". Environmental Science and Technology, vol. 37, nº 20.

-Tabla 1. Río Porma (León).

-Tabla 2. Río Porma (León). Continuación.

-Tabla 3. Piscifactoría de Quintanar de la Sierra

-Tabla 4. Piscifactoría de Quintanar de la Sierra. Continuación.

-Tabla 5. Valores medios e intervalos de referencia de determinaciones hormonales en truchas

Tabla 1.		León		Río Porma			19/05/04	
Identificación/Referencia	longitud cm	peso g	sexo asignado	sexo determinado	17-B-estradiol ng/mL	17-B-estradiol pmol/L	progesterona ng/mL	
Trucha	965751	28	277	H	H	0,184	675,30	0
Trucha	965751	25	167	M	M	0,041	150,00	0,08
Trucha	965751	26,5	220	H	H	0,131	480,80	0,15
Trucha	965751	23	138	M	M	0,027	99,10	0,03
Trucha	965751	26	209	H	H	0,083	304,60	0,14
Trucha	965751	28	302	M	H	0,043	157,80	0,07
Trucha	965751	28	235	M	H	0,03	110,10	0,05
Trucha	965751	24	159	M	M	0,023	84,40	0,24
Trucha	965751	23	133	M	M	0,022	80,70	0,1
Trucha	965751	22	139	M	M	<0,018	<66	0,08
					x = 0,06	x = 220,9	x = 0,094	
					DS = 0,056	DS = 205,3	SD = 0,069	
					VN = 0,004-0,116	VN = 15-426	VN = 0,025-0,16	
					x(M) = 0,024	x(M) = 94,8		
					x(H) = 0,094	x(H) = 345,7		

Tabla 2. León

Río Porma

19/05/04

<i>Identificación/Referencia</i>		<i>progesterona</i> nmol/L	<i>cortisol</i> ug/dL	<i>cortisol</i> nmol/L	<i>testosterona</i> ng/mL	<i>testosterona</i> nmol/L
Trucha	965751	0	17,8	511	1,69	5,97
Trucha	965751	0,26	1,6	45,9	4,15	14,66
Trucha	965751	0,48	19	545	1,09	3,85
Trucha	965751	0,096	25	717	2,17	7,67
Trucha	965751	0,45	18,3	525	1,85	6,54
Trucha	965751	0,22	14,5	416	1,91	6,75
Trucha	965751	0,16	15,2	436	1,8	6,36
Trucha	965751	0,77	18,4	528	2,9	10,25
Trucha	965751	0,32	22	631	2,46	8,7
Trucha	965751	0,26	13	373	2,16	7,63
		x = 0,30	x = 16,5	x = 472,8	x = 2,22	x = 7,84
		DS = 0,22	DS = 6,3	DS = 180,7	DS = 0,83	DS = 2,94
		VN = 0,08 - 0,52	VN = 13-23	VN = 292-653	VN = 1,4-3,0	VN = 4,9-10,8
					x(M) = 2,77	x(M) = 9,8
					x(H) = 1,67	x(H) = 5,9

Tabla 3.

Piscifactoría de Quintanar

19/05/04

<i>Identificación/Referencia</i>		<i>longitud</i> cm	<i>peso</i> g	<i>sexo asignado</i>	<i>sexo determinado</i>	<i>17-B-estradiol</i> ng/mL	<i>17-B-estradiol</i> pmol/L
Trucha	(Hemoliz) 965774	33,7	520	M	M	0,099	362,50
Trucha	(Hemoliz) 965775	32	490	M	M	0,078	285,60
Trucha	(Hemoliz) 965742	31,5	480	M	M	0,095	347,90
Trucha	(Hemoliz) 965743	30	460	M	M	0,108	395,50
Trucha	(Hemoliz) 965776	30	460	M	H	0,343	1256,00
Trucha	965777	54	830	M	M	muestra insufic	muestra insufic
		x = 35,2				x = 0,144	x = 528,5
		DS = 9,3				DS=0,11	DS=408,07
		VN = 26 - 44,5				VN=0,03-0,25	VN=120,43-936,57

Tabla 4.

Piscifactoría de Quintanar

19/05/04

<i>Identificación/Referencia</i>		<i>progesterona</i> ng/mL	<i>progesterona</i> nmol/L	<i>cortisol</i> ug/dL	<i>cortisol</i> nmol/L	<i>testosterona</i> ng/mL	<i>testosterona</i> nmol/L
Trucha	(Hemoliz) 965774	1	3,2	14,5	416,2	no lectura	no lectura
Trucha	(Hemoliz) 965775	0,27	0,86	29,5	846,6	no lectura	no lectura
Trucha	(Hemoliz) 965742	0	0	20,2	579,7	no lectura	no lectura
Trucha	(Hemoliz) 965743	0,8	2,6	14,2	407,5	no lectura	no lectura
Trucha	(Hemoliz) 965776	0,21	0,67	14,5	416,2	no lectura	no lectura
Trucha	965777	muestra insufic	muestra insufic	3,9	111,9	m insufic	m insufic
		x = 0,46	x = 1,46	x = 16,1	x = 463		
		DS = 0,42	DS = 1,36	DS=8,41	DS = 241		
		VN = 0,04 - 0,88	VN = 0,1-2,8	VN=7,69-24,51	VN = 222-704		

Tabla 5.

	Valor medio	Amplitud	Unidad
Progesterona	0,1	0,05 – 0,15	ng/mL
17-α-hidroxiprogesterona	2,75 0,9	hasta 9 hasta 3	nmol/L ng/mL
Cortisol	345 12	172-518 6 – 16	nmol/L μ g/dL
11-desoxicortisol	0,3 1	0,01-0,59 0-2,03	nmol/L ng/mL
17-β-estradiol machos	228 0,089	hasta 648 hasta 0,2	pmol/L ng/mL
hembras	701 0,19	hasta 1520 hasta 0,413	pmol/L ng/mL
Testosterona machos	7,8 2,2	5,61-10 1,59-2,82	nmol/L ng/mL
hembras	5,9 1,6	4,36-7,44 1,22-1,98	nmol/L ng/mL