



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS**

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES
ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES EN
BRANQUIAS, EN SU ZONA RESPIRATORIA Y SENSITIVA,
EN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) TRATADOS CON DIOXINA**

José Miguel Navas Lloret

Córdoba, 2017

TITULO: *Contribución al estudio de las modificaciones estructurales y ultraestructurales en branquias, en su zona respiratoria y sensitiva, en zebrafish (Danio rerio) tratados con dioxina*

AUTOR: *José Miguel Navas Lloret*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

COMPARADAS

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES Y
ULTRAESTRUCTURALES EN BRANQUIAS, EN SU ZONA RESPIRATORIA Y
SENSITIVA, EN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) TRATADOS CON DIOXINA**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR EL LICENCIADO EN
VETERINARIA

JOSÉ MIGUEL NAVAS LLORET

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

VºBº Los Directores

Prof. D. Alfonso Blanco Rodríguez

Prof. D. Andrés María Diz Plaza

Córdoba, 2017

ALFONSO BLANCO RODRÍGUEZ y ANDRÉS MARÍA DIZ PLAZA, profesores del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que la Tesis titulada “CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES EN BRANQUIAS, EN SU ZONA RESPIRATORIA Y SENSITIVA, EN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) TRATADOS CON DIOXINA”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. José Miguel Navas Lloret, ha sido realizada bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba, y reúne las condiciones científicas necesarias para ser presentada ante el tribunal correspondiente con el fin de obtener el Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Córdoba, a 13 de diciembre de 2016.

Fdo. D. Alfonso Blanco Rodríguez

Fdo. D. Andrés María Diz Plaza



TÍTULO DE LA TESIS: Contribución al estudio de las modificaciones estructurales y ultraestructurales en branquias, en su zona respiratoria y sensitiva, en zebrafish (*Danio rerio*) tratados con dioxina

DOCTORANDO/A: JOSÉ MIGUEL NAVAS LLORET

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El doctorando ha llevado a cabo un amplio trabajo de investigación, obteniendo resultados muy importantes en el ámbito de la contaminación ambiental y su repercusión en los peces.

La tesis doctoral se ha desarrollado favorablemente, dando lugar a un trabajo de investigación en colaboración con el equipo de investigación de la Universidad de Murcia que ha sido aceptado para su publicación en una revista internacional (Acta Adriatica):

NAVAS J.M., DIZ A.M.; MOYANO R., VÁZQUEZ-AUTÓN J.M.; AYALA M.D., GARCÍA-MONTERDE J. AND BLANCO A. “*Contribution to the study of the changes in the gills of zebrafish (Danio rerio) when exposed to dioxin*”. Acta Adriatica Volumen 57(1): 81-92 aceptada 23 de agosto de 2016.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 13 de diciembre de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Alfonso Blanco Rodríguez

Fdo.: Andrés María Diz Plaza

A mi familia

Índice de contenidos

	<u>Pág.</u>
I. Agradecimientos	1
II. Índice de tablas	3
III. Índice de gráficas	5
IV. Índice de figuras	7
V. Lista de abreviaturas	11
VI. Resumen	13
VII. Summary	16
1. Introducción	18
2. Objetivos	32
3. Revisión bibliográfica	34
4. Material y métodos	60

4.1	Animales utilizados	60
4.2	Protocolo y diseño experimental	61
4.3	Determinación de las dioxinas	64
4.4	Estudio de la vitelogenina en los peces	69
4.5	Estudio histopatológico	75
4.5.1.	Microscopio óptico	75
4.5.2.	Microscopio electrónico	76
4.6	Análisis estadístico	78
5.	Resultados	79
5.1	Determinación de la dioxina en los peces	79
5.2	Determinación de vitelogenina en los peces	83
5.3	Estudio histopatológico	86
5.4	Estudio morfométrico	111
6.	Discusión	115
	Conclusiones	130
	Bibliografía	132

I. Agradecimientos

A mis directores de Tesis, al Prof. Dr. Alfonso Blanco Rodríguez y al Prof. Dr. Andrés María Diz Plaza, Profesores del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba por pensar en mí para realizar esta Tesis, por su inestimable ayuda en su desarrollo y redacción y por todo el apoyo y confianza que me han transmitido desde el comienzo del presente trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, que me ha animado a seguir con esta tarea. En especial a mi amigo y compañero de promoción Alfonso Martínez, de gran apoyo y colaboración desinteresada en todo el proceso.

A todos los componentes del Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, donde se ha realizado una parte importante de este trabajo, por su inestimable colaboración en estos años.

Al servicio de Microscopía electrónica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI).

A los miembros de la fraternidad marista “Comunidad de Bugobe”, en especial a Bernardo Baena, incondicional y leal amigo mío.

A los amigos y comensales de la facultad de Ciencias, que aún dilatándose en el tiempo los trabajos, han mantenido la esperanza en mí.

Y en especial quisiera dedicar estas últimas palabras a mi familia que han puesto todos los medios para que hoy esté aquí y son una parte muy importante de este trabajo y que nunca podré devolverles todo lo que hacen por mí, en especial a M. Carmen que llevamos casi toda la vida juntos y sin ella esto y otras tantas cosas no serían posible. A mis hijos, motivo de todos los esfuerzos. Al resto de mi familia, presentes y ausentes, que aunque lejana siempre permanece próxima. Y por último recordar a mis padres, que hicieron todo lo posible por mí y me aportaron los mimbres necesarios para hacer estos cestos.

En definitiva a todas las personas que directa o indirectamente han compartido este camino y me han ayudado a que hoy tenga finalizada mi Tesis.

Por último, y como colofón, quisiera hacer el ofrecimiento de esta tesis a Dios, para su Gloria y como agradecimiento por mi vida y por las personas que ha puesto en ella.

II. Índice de tablas

CAPITULO 4. Material y Métodos.

4.1 Animales utilizados

Tabla 1. Distribución de los animales, al azar machos y hembras al 50%, en 5 grupos alimentados con alimentos mezclados con distinta concentración de TCDD, o sea, grupo control, 10, 40, 100 y 270 ng de [³H]-TCDD/g de alimentos (ppb) respectivamente. Pág. 62

4.3 Determinación de la dioxina

Tabla 2. Variación de los porcentajes de la solución patrón de 50 ppb con una relación señal/ruido en función de la transición en LC-MS/MS. Pág. 68

Tabla 3. Variación de la energía de colisión de las moléculas en función del rango de transición en LC-MS/MS. Pág. 68

4.4 Estudio de la vitelogenina en los peces

Tabla 4. Disposición del control, el patrón y las muestras en las microplaca. NSB: Control S1-S11: Diluciones patrones 1-11 (0,12-125 ng/ml VTG). P1: Dilución 1: 1.800.000 P2: Dilución 1: 30.000 P3: Dilución 1: 500. Pág. 72

CAPÍTULO 5. Resultados

5.1 Determinación de dioxina en peces

Tabla 5. Medias y desviaciones típicas de las diferentes concentraciones de dioxina en los zebrafish expuestos a las distintas concentraciones en el alimento. nd: no detectable. Pág. 80

Tabla 6. Comparación múltiple entre los diferentes lotes de estudio y significación de las mismas. ns: diferencias no significativas al comparar ambos lotes; *: diferencias significativas al comparar ambos lotes. Pág. 83

5.2 Determinación de vitelogenina (VTG) en los peces

Tabla 7. Concentración de VTG patrón y sus correspondientes valores de absorbancia, tomados desde los pocillos del kit ELISA. Pág. 84

Tabla 8. Concentración de VTG (ng/g) según sexo del pez en función de la concentración de dioxina a la que han sido expuestos los peces con el alimento. ... Pág. 85

5.4 estudio morfométrico

Tabla 9. Medias de números de células del cloro y de los diámetros de las mismas donde se pueden observar el número de muestras tomadas para cada lote. Pág. 111

Tabla 10. Prueba de Scheffe para comparación de medias múltiples. No existen diferencias significativas entre el lote control y el lote 1 en cuanto al número de células del cloro, siendo por otro lado muy significativa la diferencia con los demás lotes. Pág. 111

Tabla 11. Prueba de Scheffe para comparación de medias múltiples. No existen diferencias entre el lote control y los lotes 1 y 2 en cuanto al diámetro de las células del cloro, así mismo no existe diferencia significativa entre los lotes 3 y 4. Siendo muy significativa, a su vez, la diferencia entre las medias de los lotes control, 1 y 2 con los lotes 3 y 4. Pág. 113

III. Índice de gráficas

CAPÍTULO 5. Resultados

5.1 Determinación de dioxina en peces

Gráfica 1. Curva de regresión de las medias obtenidas de las respectivas concentraciones de dioxina. La función que mejor los representa es una exponencial cuya fórmula está incluida en la representación gráfica. Pág. 81

Gráfica 2. Medias de las diferentes concentraciones de dioxina en el alimento. Existe una correlación entre los niveles de dioxina determinados en los peces, y la concentración de dioxina a la que fueron expuestos. Pág. 82

5.2 Determinación de vitelogenina (VTG) en los peces

Gráfica 3. Representación de la recta de regresión patrón, según se desprende de la tabla de absorbancia (concentración vs absorbancia). Pág. 84

Gráfica 4. Comparación de las concentraciones de VTG en machos y hembras según la concentración de TCDD en el alimento. En ambos sexos se produce un incremento de la concentración de VTG a medida que aumenta la concentración de dioxina a la que están expuestos los peces. Pág. 86

5.4 Estudio morfométrico

Gráfica 5. Representación gráfica de la variación del número de células del cloro en cada uno de los lotes. Se observó un aumento del número de células del cloro en el filamento en los lotes 2 y 3 y una disminución del número en el lote 4 que corroboró lo descrito por la observación histológica, en la que se producían degeneraciones y necrosis celulares. *Significativamente diferente del control con $p < 0.05$ Pág. 111

Gráfica.6. Representación gráfica de la variación del diámetro mínimo de las células del cloro en cada uno de los lotes. Observamos en ella que se producía un aumento del tamaño de las células del cloro en los lotes 3 y 4, puesto de manifiesto también con el estudio histopatológico, en el que aparecía tumefacción del tejido epitelial e hinchamientos y vacuolización de las células del cloro. *Significativamente diferente del control con $p < 0.05$ Pág. 114

IV. Índice de figuras

CAPÍTULO 1. Introducción

Figura 1. Estructura molecular de 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-para-Dioxina (TCDD), formada por dos anillos bencílico unidos por dos éteres y con cuatro cloros en las posiciones 2, 3, 7 y 8. Pág. 29

CAPÍTULO 4. Material y métodos

4.2 Protocolo y diseño experimental

Figura 2. Acuario de 25 litros con filtro interno, difusor, termómetro y aireador. Se utilizó uno para cada lote de experimentación. Pág. 63

4.4 Estudio de la vitelogenina (VTG) en los peces

Figura 3. Lavador de microplacas Dynex ultra wash plus[®], utilizado en el proceso de incubación del anticuerpo revelador. Pág. 73

Figura 4. Imagen del lector de microplacas Asys Expert 96[®], usado para la medición de la absorbancia a 492 nm. Pág. 74

4.5 Estudio histopatológico estructural y ultraestructural

4.5.2 Microscopio electrónico

Figura 5. Imagen de un corte histológico genérico en la que se ha superpuesto una plantilla con cuatro áreas test usada para la estimación de la densidad numérica. Sólo se cuentan aquellos núcleos cuyos perfiles caen dentro de las áreas test y no son afectados por las líneas prohibidas (negras). Pág. 77

Figura 6. Imagen de un corte histológico en el que la estimación de los parámetros morfométricos requirió que contorneáramos la silueta de la estructura en cuestión con el puntero del ordenador. Pág. 78

CAPÍTULO 5. Resultados

5.2 Determinación de vitelogenina (VTG) en los peces

Figura 7. Imagen de la placa del kit ELISA. Se observan los pocillos, de donde se medirá la absorbancia y determinar las concentraciones de VTG. Pág. 83

5.3 Estudio histopatológico

Figura 8. Lote control de branquia respiratoria: (A) Detalle de branquias mostrando la zona respiratoria al MO. (B) Detalle de lamelas primarias y respiratorias al SEM. (C) Detalle de lamela respiratoria mostrando capilares al TEM. Pág. 89

Figura 9. Lote control de branquia sensitiva: (A) Detalle de Branquiespina donde presenta varias yemas sensitivas al MO. (B) Detalle de superficie con pliegues epiteliales y zonas de salida de yemas sensitivas al SEM. (C) Detalle al TEM de yema sensitiva donde se aprecian células de teloglía y neurosensitivas. Pág. 92

Figura 10. Branquias respiratorias del lote 1 (10 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de branquia respiratoria con tumefacción y cierto grado de hiperemia al MO. (B) Detalle al SEM de las lamelas respiratorias en la que se observa que mantienen su estructura. (C) Detalle al TEM de lamela respiratoria que presenta abundantes capilares. Pág. 95

Figura 11. Branquia sensitiva del lote 1 (10 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de Branquiespina donde presenta varias yemas sensitivas al MO. (B) Detalle de superficie con pliegues epiteliales y zonas de salida de yemas sensitivas al SEM. (C) Detalle al TEM de yema sensitiva donde se aprecian células de teloglía y neurosensitivas. Pág. 97

Figura 12. Branquia respiratoria del lote 2 (40 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de lamela primaria y secundaria al MO donde se muestra cierto grado de hiperemia. (B) Detalle al SEM de lamelas respiratorias tumefactas. (C) Detalle al TEM de lamela respiratoria con cierto grado de hiperemia. Pág. 99

Figura 13. Branquia sensitiva del lote 2 (40 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de la branquiespina al MO donde se aprecia un aumento de células mucosas. (B) Detalles al SEM de los surcos epiteliales donde aparecen superficies de células mucosas. (C) Detalle de branquiespina al TEM donde se aprecian células epiteliales y aumento de células mucosas con gran actividad.Pág. 101

Figura 14. Branquia respiratoria del lote 3 (100 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de lamela respiratoria dispuesta a modo de mosaico por fusiones de los distintos epitelios con hiperemia manifiesta y microhemorragias. (B) Detalle de lamela respiratoria al SEM con erosión a nivel de epitelio de revestimiento. (C) Detalle al TEM de célula del cloro con dilatación del canal intracelular y pérdida de microvellosidades. Pág. 103

Figura 15. Branquia sensitiva del lote 3 (100 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de zona sensitiva donde aparecen células del cloro y entre la que se desprenden células mucosas. (B) Detalle al SEM de surco epitelial donde aparecen células mucosas con aumento de la mucosidad y alteraciones de la superficie. (C) Célula del cloro al TEM con pérdida de la mayor parte de organoides, sobretodo mitocondrias. Pág. 105

Figura 16. Branquia respiratoria del lote 4 (270 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de lamela con tumefacción, hiperemia y hemorragia. (B) Detalle d lamelas al SEM mostrando erosión del epitelio con salida de exudado y glóbulos rojos. (C) Detalle con TEM de hiperplasia de células del cloro y pérdida de canalículos intracelulares, con hiperemia de capilares. Muestran desorganización de células epiteliales. Pág. 108

Figura 17. Branquia sensitiva del lote 4 (270 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de la mucosa sensitiva donde se manifiestan corpúsculos sensitivos entre abundantes células mucosas y hemorragia. (B) Detalle de la superficie de la branquiespina al SEM donde se aprecia gránulo de mucosidad superficial y las oquedades que corresponde a células mucosas. (C) Detalle de lamela sensitiva al TEM donde se aprecian abundantes células mucosas y conductos de excreción. Pág. 110

V. Lista de abreviaturas

µg: microgramo

µm: micrometro

ACTH: hormona adenocorticotropa

ADN: ácido desoxirribonucleico

BP-A: Bisfenol-A

BSA: suero bovino de albúmina

CFCs: clorofluocarbonos

CIIC: Centro Internacional de
Investigaciones sobre el Cáncer

CO₂: molécula de dióxido de carbono

DDE; distancia de difusión efectiva

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DEHP: di(2etilhexil) ftalato

DES: dietilestilbestrol

E2: 17β-estradiol

EE2: 17-β etinilestradiol

ELISA: prueba por inmunoadsorción
ligado a enzimas

EPA: Agencia Medio Ambiente USA

FELASA: Federación de Asociaciones
Europeas de las Ciencias del
Animal de Laboratorio

FNAs: Factores Natriuréticos Atriales

g: gramo

H₂O₂: molécula de peróxido de
hidrógeno

HCB: hexaclorobenceno

LC-MS/MS: cromatografía líquida
acoplada con espectrometría de
masa

LSD: diferencia significativa mínima de
Fisher

LTH: hormona luteotrópica

mg: miligramo

mm: milimetro

MO: microscopio óptico	PCDD: policlorodibenzodioxinas
MRCs: células ricas en mitocondrias	PCDF: policlorodibenzofuranos
NaCl: molécula de cloruro sódico	PCNA: proliferating cell nuclear antigen
ng/g: nanogramos por gramo	ppb: partes por billón
ng: nanogramo	ppm: partes por millón
nm: nanometro	PRL: hormona prolactina
NP: 4-nonilfenol	PVC: cloruro de polivinilo
O ₂ : molécula de oxígeno	R ² : coeficiente de correlación
°C: grados centígrados	SEM: microscopio electrónico de barrido
OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos	TCDD: 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina
OMS: Organización Mundial de la Salud	TEM: microscopio electrónico de transmisión
OP: 4-tert-octilfenol	VTG: vitelogenina hepática
PBS: phosphate buffer saline	α-MRCs: células del cloro α
PCBs: policlorobencenos	β-MRCs: células del cloro β

VI. Resumen

Desde mediados del siglo XX ha ido aumentando la preocupación acerca de los efectos de los llamados disruptores endocrinos, efectos que se pueden apreciar en todas las especies animales, incluso en el hombre.

Hacemos un recordatorio de características de estos disruptores endocrinos, su naturaleza y sus efectos sobre el medio ambiente, así mismo damos una visión de las actuaciones al respecto de la industria química.

Este estudio determinó los cambios celulares en las branquias del pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822), tanto a nivel respiratorio como sensitivo, como resultado de un suministro en la dieta de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). 120 individuos de pez cebra se distribuyeron en cinco grupos, un grupo de control y cuatro experimentales. A los grupos experimentales le fueron suministrados 10, 40, 100 y 270 ng de TCDD/g de alimento al día, respectivamente.

Fueron valoradas las variaciones de VTG (vitelogenina hepática) en los peces a las distintas concentraciones de tóxico aportado en el alimento, así mismo se valoró la concentración de TCDD en los peces.

Se realizaron estudios estructurales, ultraestructurales y morfométricos de las branquias de los peces, indicando que, en bajas concentraciones, las branquias de los peces presentaron hiperemia con erosión progresiva del endotelio de los capilares resultando un edema y microhemorragias. En las branquias no respiratorias, en los grupos con concentraciones bajas se observó que las células del cloro presentaban hipertrofia como resultado de la dilatación del canal intracelular y el hinchamiento de las microvellosidades, perdiendo su actividad en la degradación de sustancias químicas en los grupos con mayor concentración (coincidiendo con varios autores).

Las células mucosas presentaron hiperplasia e hipertrofia. Las yemas sensitivas no se vieron directamente afectadas, pero, debido a la presencia de edema intersticial y tumefacción de las células de sostén se produjo una afectación de las células neurosensitivas, aún manteniéndose éstas aparentemente normales.

Concluimos que, tanto al microscopio óptico como electrónico, las branquias respiratorias y sensitivas de zebrafish se alteran con el uso de TCDD, mostrándose una desorganización celular de todos los componentes al aumentar la dosis. Se afectaron todos los capilares de las dos zonas de la branquia, llegando a producirse hemorragias con el aumento de la concentración de TCDD en cada uno de los lotes y se produjeron modificaciones graves en los revestimientos epiteliales, comprometiendo el intercambio gaseoso e iónico. Las células que se afectan y alteran en la zona respiratoria son las células del cloro.

En la zona no respiratoria las yemas sensitivas se mantuvieron aparentemente normales, afectándose en los lotes superiores (3 y 4) el tejido vascular que las rodea. Se mantiene la capa de células mucosas que rodean las yemas sensitivas, jugando un papel defensivo, evidenciándose un aumento en la producción de mucosidad a medida que se estudian lotes superiores (3 y 4).

VII. Summary

Since the middle of the 20th century, there has been increasing concern about the effects of so-called endocrine disruptors, effects that can be seen in all animal species, including humans.

In this study we made a reminder about these endocrine disruptors, their nature and their effects on environment, we also gave an insight on the actions of the chemical industry about this matter.

This study determined cellular changes in the gills of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822), both respiratory and sensory, as a result of a dietary supply of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). 120 zebrafish were distributed into five groups, one control group and four experimental groups. 10, 40, 100 and 270 ng TCDD/g of food per day, respectively, were supplied to the experimental groups.

The variations of VTG (hepatic vitellogenin) in the fish were evaluated at the different concentrations of toxicant in the feed, and the concentration of TCDD in the fish was also evaluated.

Structural, ultrastructural and morphometric studies of the fish gill were carried out, indicating that, in low concentrations, fish gills presented hyperemia with progressive erosion of the endothelium of the capillaries resulting in oedema and microhaemorrhages. In the non-respiratory gill, in those groups with low concentrations, it could be observed that the chloride cells presented hypertrophy as a result of dilatation of the intracellular canal and swelling of the microvilli, they losing their activity in the degradation of chemical substances (according to some authors) in those groups with a higher concentration.

The mucous cells presented hyperplasia and hypertrophy. Sensory buds were not directly affected, but due to the presence of interstitial edema and swelling of the supporting cells, neurosensitive cells were affected, even though they remained normal.

We conclude that the respiratory and sensory gills of zebrafish are altered with the use of TCDD, both electron microscopy and electron microscopy, showing a cellular disorganization of all the components when increasing the dose. All the capillaries of the two areas of the gill were affected, with hemorrhages occurring with increasing concentration of TCDD in each of the batches and severe modifications in the epithelial coatings, compromising the gaseous and ionic exchange. The cells that are affected and altered in the respiratory area are the chloride cells.

In the non-respiratory zone sensory buds remained apparently normal, affecting in the upper lots (3 and 4) the vascular tissue that surrounds them. The mucosal cell layer surrounding the sensitive buds is maintained, playing a defensive role, evidencing an increase in mucus production as higher batches (3 and 4) are studied.

1. Introducción

Los disruptores endocrinos son sustancias tóxicas peligrosas, en los peces modifican las células adenohipofisarias (Ankley y Johnson, 2004), alterando gravemente las células LTH secretoras de luteotropina o prolactina (PRL) que regulan la función de las células de cloro de las branquias, por lo que el equilibrio iónico se ve afectado con modificaciones tanto de la zona respiratoria como de la sensitiva de dichas branquias.

Numerosas sustancias químicas, como las dioxinas, policlorobencenos (PCBs), plaguicidas, ftalatos, alquilfenoles y el bisfenol-A, amenazan nuestra fecundidad, inteligencia y supervivencia. En 1962 el libro de Rachel Carson *Primavera silenciosa* dio el primer aviso de que ciertos productos químicos artificiales se habían difundido por todo el planeta, contaminando prácticamente a todos los seres vivos hasta en las tierras vírgenes más remotas. Aquel libro, que marcó un hito, presentó pruebas del impacto que dichas sustancias sintéticas tenían sobre las aves y demás fauna silvestre. Pero hasta ahora no se habían advertido las plenas consecuencias de esta insidiosa invasión, que está trastornando el desarrollo sexual y la reproducción, no sólo de numerosas poblaciones animales, sino también de los seres humanos.

Basándose en décadas de investigación, los autores presentan un impresionante informe que sigue la pista de defectos congénitos, anomalías sexuales y fallos de reproducción en poblaciones silvestres, hasta su origen: sustancias químicas que suplantando a las hormonas naturales, trastornando los procesos normales de reproducción y desarrollo.

Los autores de *Nuestro futuro robado* (Colborn et al. 1997) repasan la investigación científica que relaciona estos problemas con los "disruptores endocrinos", estafadores químicos que dificultan la reproducción de los adultos y amenazan con graves peligros a sus descendientes en fase de desarrollo. Explican cómo estos contaminantes han llegado a convertirse en parte integrante de nuestra economía industrial, difundiendo con asombrosa facilidad por toda la biosfera, desde el Ecuador a los polos. Y estudian lo que podemos y debemos hacer para combatir este omnipresente peligro. *Nuestro futuro robado*, como señala Al Gore, ex-vicepresidente de EE UU y autor del prólogo, es un libro de importancia trascendental, que nos obliga a plantearnos nuevas preguntas acerca de las sustancias químicas sintéticas que hemos esparcido por toda la Tierra.

Disruptores endocrinos

Un gran número de sustancias químicas artificiales que se han vertido al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen potencial para perturbar el sistema endocrino de los animales, incluidos los seres humanos. Entre ellas se encuentran las sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalógenas que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) y las sustancias químicas industriales, otros productos sintéticos y algunos metales pesados. Muchas poblaciones animales han sido afectadas ya por estas sustancias. Entre las repercusiones figuran la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación en aves, peces y tortugas; graves deformidades de nacimiento en

aves, peces y tortugas; anormalidades metabólicas en aves, peces y mamíferos; anormalidades de comportamiento en aves; demasculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos; defeminización y masculinización de peces y aves hembras; y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos. Los disruptores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles. Las sustancias químicas disruptoras endocrinas no son venenos clásicos ni carcinógenos típicos. Se atienen a reglas diferentes. Algunas sustancias químicas hormonalmente activas apenas parecen plantear riesgos de cáncer. En los niveles que se encuentran normalmente en el entorno, las sustancias químicas disruptoras hormonales no matan células ni atacan el ADN. Su objetivo son las hormonas, los mensajeros químicos que se mueven constantemente dentro de la red de comunicaciones del cuerpo.

Las sustancias químicas sintéticas hormonalmente activas son delincuentes de la autopista de la información biológica que sabotean comunicaciones vitales. Atracan a los mensajeros o los suplantán. Cambian de lugar las señales. Revuelven los mensajes. Siembran desinformación. Causan toda clase de estragos. Dado que los mensajes hormonales organizan muchos aspectos decisivos del desarrollo, desde la diferenciación sexual hasta la organización del cerebro, las sustancias químicas disruptoras hormonales representan un especial peligro antes del nacimiento y en las primeras etapas de la vida. Los disruptores endocrinos pueden poner en peligro la supervivencia de especies enteras, quizá a largo plazo incluso la especie humana. Las pautas de los efectos de los disruptores endocrinos varían de una especie a otra y de una sustancia a otra. Sin embargo, pueden formularse cuatro enunciados generales:

*Las sustancias químicas que preocupan pueden tener efectos totalmente distintos sobre el embrión, el feto o el organismo perinatal que sobre el adulto;

*Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la descendencia, que no en el progenitor expuesto;

*El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar su carácter y su potencial futuro;

*Aunque la exposición crítica tiene lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones obvias pueden no producirse hasta la madurez.

La especie humana carece de experiencia evolutiva con estos compuestos sintéticos. Estos imitadores artificiales de los estrógenos difieren en aspectos fundamentales de los estrógenos vegetales. Nuestro organismo es capaz de descomponer y excretar los imitadores naturales de los estrógenos, pero muchos de los compuestos artificiales resisten los procesos normales de descomposición y se acumulan en el cuerpo, sometiendo a humanos y animales a una exposición de bajo nivel pero de larga duración. Esta pauta de exposición crónica a sustancias hormonales no tiene precedentes en nuestra historia evolutiva, y para adaptarse a este nuevo peligro harían falta milenios, no décadas.

La industria química prefiere pensar que, puesto que ya existen en la naturaleza tantos estrógenos naturales, como la soja, no hay por qué preocuparse por los compuestos químicos sintéticos que interfieren con las hormonas. Sin embargo, es importante tener en cuenta las diferencias que existen entre los imitadores hormonales naturales y los sintéticos. Los imitadores hormonales artificiales suponen un peligro mayor que los compuestos naturales, porque pueden persistir en el cuerpo durante años, mientras que los estrógenos vegetales se pueden eliminar en un día. Nadie sabe todavía qué cantidades de

las sustancias químicas disruptoras endocrinas son necesarias para que representen un peligro para el ser humano. Los datos indican que podrían ser muy pequeñas si la exposición tiene lugar antes del nacimiento. En el caso de las dioxinas, los estudios recientes han demostrado que la exposición a dosis ínfimas es peligrosa.

La mayoría de nosotros portamos varios centenares de sustancias químicas persistentes en nuestro cuerpo, entre ellas muchas que han sido identificadas como disruptores endocrinos. Por otra parte, las portamos en concentraciones que multiplican por varios millares los niveles naturales de los estrógenos libres, es decir, estrógenos que no están enlazados por proteínas sanguíneas y son, por tanto, biológicamente activos.

Se ha descubierto que cantidades insignificantes de estrógeno libre pueden alterar el curso del desarrollo en el útero; tan insignificantes como una décima parte por billón. Las sustancias químicas disruptoras endocrinas pueden actuar juntas y cantidades pequeñas, aparentemente insignificantes, de sustancias químicas individuales, pueden tener un importante efecto acumulativo. El descubrimiento de que puede haber sustancias químicas que alteran el sistema hormonal en lugares inesperados, incluidos algunos productos que se consideraban biológicamente inertes como los plásticos, ha puesto en entredicho las ideas tradicionales sobre la exposición.

Efectos en los seres humanos

Los seres humanos se han visto afectados por los disruptores endocrinos. El efecto del dietilestilbestrol (DES), un agente estrogénico, fue un claro aviso. El paradigma del cáncer es insuficiente porque las sustancias químicas pueden causar graves efectos sanitarios distintos del cáncer.

Es preocupante la creciente frecuencia de anomalías genitales en los niños, como testículos no descendidos (criptorquidia), penes sumamente pequeños e hipospadias, un defecto en el que la uretra que transporta la orina no se prolonga hasta el final del pene. En las zonas de cultivo intensivo en la provincia de Granada, en donde se emplea el endosulfán y otros plaguicidas, se han registrado 360 casos de criptorquidias. Algunos estudios con animales indican que la exposición a sustancias químicas hormonalmente activas en el periodo prenatal o en la edad adulta aumenta la vulnerabilidad a cánceres sensibles a hormonas, como los tumores malignos en mama, próstata, ovarios y útero.

Entre los efectos de los disruptores endocrinos está el aumento de los casos de cáncer de testículo y de endometriosis, una dolencia en la cual el tejido que normalmente recubre el útero se desplaza misteriosamente al abdomen, los ovarios, la vejiga o el intestino, provocando crecimientos que causan dolor, copiosas hemorragias, infertilidad y otros problemas. El signo más espectacular y preocupante de que los disruptores endocrinos pueden haberse cobrado ya un precio importante se encuentra en los informes que indican que la cantidad y movilidad de los espermatozoides de los varones ha caído en picado en el último medio siglo. El estudio inicial, realizado por un equipo danés encabezado por el doctor Niels Skakkebaek y publicado en el *British Medical Journal* en septiembre de 1992, descubrió que la cantidad media de espermatozoides masculinos había descendido un 45 por ciento, desde un promedio de 113 millones por mililitro de semen en 1940 a sólo 66 millones por mililitro en 1990. Al mismo tiempo, el volumen del semen eyaculado había descendido un 25 por ciento, por lo que el descenso real de los espermatozoides equivalía a un 50 por ciento. Durante este periodo se había triplicado el número de hombres que tenían cantidades extremadamente bajas de espermatozoides, del orden de 20 millones por mililitro. En España se ha pasado de una media de 336 millones de espermatozoides por eyaculación en 1977 a 258 millones en 1995. El descenso amenaza la capacidad

fertilizadora masculina. De continuar la tendencia actual, dentro de 50 años los hombres podrían ser incapaces de reproducirse de forma natural, teniendo que depender de las técnicas de inseminación artificial o de la fecundación in vitro. La exposición prenatal a sustancias químicas imitadoras de hormonas puede estar exacerbando también el problema médico más común que afecta a los hombres al envejecer: el crecimiento doloroso de la glándula prostática, que dificulta la excreción de orina y a menudo requiere intervención quirúrgica. En los países occidentales, el 80 por ciento de los hombres muestran signos de esta dolencia a los 70 años, y el 45 por ciento de los hombres padecen un grave crecimiento de la glándula. En las dos últimas décadas se ha producido un espectacular aumento de esta dolencia. La experiencia del DES y los estudios con animales sugieren también una vinculación entre las sustancias químicas disruptoras endocrinas y varios problemas de reproducción en las mujeres, especialmente abortos, embarazos ectópicos y endometriosis. La endometriosis afecta hoy a cinco millones de mujeres estadounidenses. A principios de siglo la endometriosis era una enfermedad prácticamente desconocida. Las mujeres que padecen endometriosis tienen niveles más elevados de PCBs en la sangre que las mujeres que no la padecen. Diferentes estudios coinciden en señalar que entre el 60 y el 70 por ciento de los embarazos se malogran en la fase embrionaria inicial y otro 10 por ciento termina en las primeras semanas por un aborto espontáneo. Pero la tendencia sanitaria más alarmante con diferencia para las mujeres es la creciente tasa de cáncer de mama, que es el cáncer femenino más común. Desde 1940, en los albores de la era química, las muertes por cáncer de mama han aumentado en EEUU en un 1 por ciento anual, y se ha informado de incrementos semejantes en otros países industrializados.

Industria química

Nuestro futuro robado (Colborn et al., 1997) abre un nuevo horizonte, que muy probablemente concluya con nuevos tratados internacionales, al igual que sucedió con los

clorofluorocarbonos (CFCs) que agotan la capa de ozono, y a pesar de la oposición de las industrias químicas. Actualmente pueden encontrarse en el mercado unas 100.000 sustancias químicas sintéticas. Cada año se introducen 1.000 nuevas sustancias, la mayoría sin una verificación y revisión adecuadas. En el mejor de los casos, las instalaciones de verificación existentes en el mundo pueden someter a prueba únicamente a 500 sustancias al año. En realidad, sólo una pequeña parte de esta cifra es sometida realmente a prueba. Ya se han identificado 51 productos químicos que alteran el sistema hormonal, pero se desconocen los posibles efectos hormonales de la gran mayoría. Uno de los aspectos más inquietantes de los disruptores endocrinos es que algunos de sus efectos se producen con dosis muy bajas. Las normas actuales que regulan la comercialización de productos químicos sintéticos se han desarrollado sobre la base del riesgo de cáncer y de graves taras de nacimiento y calculan estos riesgos a un varón adulto de unos 70 kilogramos de peso. No toman en consideración la vulnerabilidad especial de los niños antes del nacimiento y en las primeras etapas de vida, y los efectos en el sistema hormonal. Las normas oficiales y los métodos de prueba de la toxicidad evalúan actualmente cada sustancia química por sí misma. En el mundo real, encontramos complejas mezclas de sustancias químicas. Nunca hay una sola. Los estudios científicos muestran con claridad que las sustancias químicas pueden interactuar o pueden actuar juntas para producir un efecto superior al que producirían individualmente (sinergia). Las leyes actuales ignoran estos efectos aditivos o interactivos. Los fabricantes utilizan las leyes sobre secretos comerciales para negar al público el acceso a la información sobre la composición de sus productos. En tanto los fabricantes no coloquen unas etiquetas completas en sus productos, los consumidores no tendrán la información que necesitan para protegerse de productos hormonalmente activos. En algunos casos, las sustancias químicas pueden descomponerse en sustancias que plantean un peligro mayor que la sustancia química original. La industria química trata de desacreditar las conclusiones de *Nuestro futuro robado*, al igual que hasta hace poco hizo

con los CFCs, o como las campañas de la industria del tabaco negando la relación entre el hábito de fumar y el cáncer de pulmón. La Chemical Manufacturers Association, entidad que agrupa a las mayores multinacionales de la industria química, el Chlorine Chemistry Council, el American Plastics Council, la Society of the Plastics Industry y la American Crop Protection Association (los grandes fabricantes de plaguicidas), han recolectado grandes cantidades de dinero entre sus asociados para lanzar una campaña contra el libro *Nuestro futuro robado*. Cuando en 1962 se publicó el libro de Rachel Carson *Silent spring* (1962), la revista de la Chemical Manufacturers Association tituló la reseña del libro "*Silence, Miss Carson*". La industria del cloro, agrupada en el Chlorine Council, que agrupa a empresas como DuPont, Dow, Oxychem y Vulcan, gasta anualmente en Estados Unidos 150 millones de dólares en campañas de imagen y de intoxicación informativa. En España la empresa encargada por los fabricantes de PVC de intoxicar a la opinión pública es la Burson-Marsteller. Treinta y cinco años después la misma industria que casi acaba con el ozono, que ocasionó el accidente de Bhopal y que fabrica miles de sustancias tóxicas, se enfrenta al desafío de *Nuestro futuro robado*. Las empresas Burson-Marsteller, Edelman y Hill & Knowlton, dedicadas al lavado de imagen de la industria del tabaco, de dictadores, del PVC y de empresas contaminantes, muchas de ellas del sector químico, realizan campañas de intoxicación contra los científicos, periodistas y las organizaciones no gubernamentales, tratando de impedir, o al menos reducir, los efectos de libros como *Nuestro futuro robado* y decenas de estudios científicos, informes y artículos sobre los efectos de las sustancias químicas que actúan como disruptores endocrinos.

Una buena prueba de lo acertadas que son las conclusiones del libro *Nuestro futuro robado* es que el gobierno de Estados Unidos gastó de 20 a 30 millones de dólares en 400 proyectos para analizar los efectos de las sustancias químicas en el sistema endocrino. El objetivo de la Agencia de Medio Ambiente (EPA) de EE UU es desarrollar toda una

estrategia para investigar y someter a prueba 600 plaguicidas y 72.000 sustancias químicas sintéticas de uso comercial en Estados Unidos, al objeto de analizar sus efectos como posibles disruptores endocrinos. La National Academy of Sciences de Estados Unidos ha emprendido un amplio estudio para profundizar en los peligros de los disruptores endocrinos. Raro es el mes que no se publica algún artículo en las más prestigiosas revistas científicas confirmando y profundizando los peligros de las sustancias químicas. El mercado mundial de plaguicidas representó unos 2 millones de toneladas en 1999, e incluía 1.600 sustancias químicas. El consumo mundial continúa creciendo. Los plaguicidas son una clase especial de sustancias químicas por cuanto son biológicamente activas por diseño y se dispersan intencionadamente en el entorno. Hoy en día se usan en Estados Unidos 30 veces más plaguicidas sintéticos que en 1945. En este mismo periodo, el poder biocida por kilogramo de las sustancias químicas se ha multiplicado por 10. El 35 por ciento de los alimentos consumidos tienen residuos de plaguicidas detectables. Los métodos de análisis, sin embargo, sólo detectan un tercio de los más de 600 plaguicidas en uso. La contaminación de los alimentos por plaguicidas es a menudo muy superior en los países en desarrollo.

Defendernos de este riesgo requiere la acción en varios frentes con la intención de eliminar las nuevas fuentes de disrupción endocrina y minimizar la exposición a contaminantes que interfieren el sistema hormonal y que ahora están en el ambiente. Para ello se requerirá mayor investigación científica; rediseño de las sustancias químicas, de los procesos de producción y de los productos por las empresas; nuevas políticas gubernamentales; y esfuerzos personales para protegernos a nosotros y a nuestras familias. La agricultura ecológica, sin plaguicidas y otras sustancias químicas, es una alternativa sostenible y viable. Con 100.000 sustancias químicas sintéticas en el mercado en todo el mundo y 1.000 nuevas sustancias más cada año, hay poca esperanza de descubrir su

suerte en los ecosistemas o sus efectos para los seres humanos y otros seres vivos hasta que el daño está hecho. Es necesario reducir el número de sustancias químicas que se usan en un producto determinado y fabricar y comercializar sólo las sustancias químicas que puedan detectarse fácilmente con la tecnología actual y cuya degradación en el medio ambiente se conozca. Estas sustancias no han alterado la huella genética básica que subyace a nuestra humanidad. Elimínense los disruptores de la madre y del útero y los mensajes químicos que guían el desarrollo podrán llegar de nuevo sin obstáculos. Pero la protección de la próxima generación de los disruptores endocrinos requerirá una vigilancia de años e incluso décadas, porque las dosis que llegan al feto dependen no sólo de lo que ingiere la madre durante el embarazo, sino también de los contaminantes persistentes acumulados en la grasa corporal hasta ese momento de su vida. Las mujeres transfieren esta reserva química acumulada durante décadas a sus hijos durante la gestación y durante la lactancia.

El sistema actual da por supuesto que las sustancias químicas son inocentes hasta que se demuestre lo contrario. El peso de la prueba debe actuar del modo contrario, porque el enfoque actual, la presunción de inocencia, una y otra vez ha hecho enfermar a las personas y ha dañado a los ecosistemas. Las pruebas que surgen sobre las sustancias químicas hormonalmente activas deben utilizarse para identificar a aquellas que plantean el mayor riesgo y para eliminarlas del mercado. Cada nuevo producto debe someterse a esta prueba antes de que se le permita salir al mercado. La evaluación del riesgo se utiliza ahora para mantener productos peligrosos en el mercado hasta que se demuestre que son culpables. Las políticas internacionales y nacionales se deben basar en el principio de precaución. Una política adecuada para reducir la amenaza de las sustancias químicas que alteran el sistema hormonal requiere la prohibición inmediata de plaguicidas como el endosulfán y el metoxicloro, fungicidas como la vinclozolina, herbicidas como la atrazina, los

alquifhenoles, los ftalatos y el BP-A. Para evitar la generación de dioxinas se requiere la eliminación progresiva del PVC, el percloroetileno, todos los plaguicidas clorados, el blanqueo de la pasta de papel con cloro y la incineración de residuos.

Sustancias químicas de efectos disruptores sobre el sistema endocrino

Entre las sustancias químicas de efectos disruptores sobre el sistema endocrino figuran:

*Las dioxinas y furanos, que se generan en la producción de cloro y compuestos clorados, como el PVC o los plaguicidas organoclorados, el blanqueo con cloro de la pasta de papel y la incineración de residuos. Entre las dioxinas se encuentra la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Está formada por dos anillos bencílico unidos por dos éteres y con cuatro cloros en las posiciones 2, 3, 7 y 8 (Fig. 1).

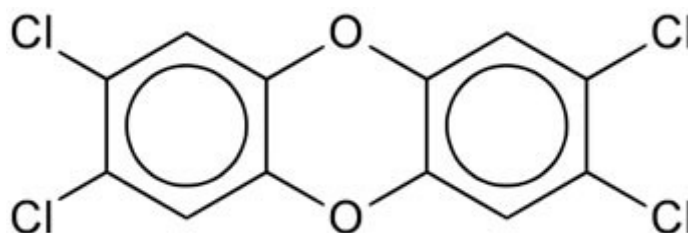


Figura. 1. Estructura molecular de 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-para-Dioxina (TCDD), formada por dos anillos bencílico unidos por dos éteres y con cuatro cloros en las posiciones 2, 3, 7 y 8

*Los PCBs, actualmente prohibidos. Las concentraciones en tejidos humanos han permanecido constantes en los últimos años aun cuando la mayoría de los países industrializados pusieron fin a la producción de PCBs hace más de una década, porque dos tercios de los PCBs producidos en todas las épocas continúan en uso en

transformadores u otros equipos eléctricos y, por consiguiente, pueden ser objeto de liberación accidental. A medida que van ascendiendo en la cadena alimentaria, la concentración de PCBs en los tejidos animales puede aumentar hasta 25 millones de veces.

*Numerosos plaguicidas, algunos prohibidos y otros no, como el DDT y sus productos de degradación, el lindano, el metoxicloro (autorizado en España), piretroides sintéticos, herbicidas de triazina, kepona, dieldrín, vinclozolina, dicofol y clordano, entre otros.

*El plaguicida endosulfán, de amplio uso en la agricultura española, a pesar de estar prohibido en numerosos países.

*El HCB (hexaclorobenceno), empleado en síntesis orgánicas, como fungicida para el tratamiento de semillas y como preservador de la madera.

*Los ftalatos, utilizados en la fabricación de PVC. El 95 por ciento del DEHP (di(2etilhexil) ftalato) se emplea en la fabricación del PVC.

*Los alquilfenoles, antioxidantes presentes en el poliestireno modificado y en el PVC, y como productos de la degradación de los detergentes. El 4-nonilfenol (NP) pertenece a la familia de sustancias químicas sintéticas llamadas alquilfenoles. Los fabricantes añaden nonilfenoles al poliestireno y al cloruro de polivinilo (PVC), como antioxidante para que estos plásticos sean más estables y menos frágiles. Un estudio descubrió que la industria de procesamiento y envasado de alimentos utilizaba PVC que contenían alquilfenoles. Otro informaba del hallazgo de contaminación por 4-nonilfenol en agua que había pasado por cañerías de PVC. La descomposición de sustancias

químicas presentes en detergentes industriales, plaguicidas y productos para el cuidado personal pueden dar origen asimismo a 4-nonilfenol.

*El bisfenol-A, de amplio uso en la industria agroalimentaria (recubrimiento interior de los envases metálicos de estaño) y por parte de los dentistas (empastes dentarios). Uno de los investigadores pioneros sobre los efectos del bisfenol-A es el médico español Nicolás Olea.

2. Objetivos

El objetivo general de nuestro trabajo es tratar de conocer los patrones morfológicos microscópicos de las branquias en zebrafish (*Danio rerio*) y las alteraciones producidas por disruptores endocrinos, en nuestro caso el 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD).

El primer objetivo del trabajo que nos planteamos, usando zebrafish como modelo biológico, es conocer la evolución de las alteraciones producidas por los disruptores endocrinos, en nuestro estudio usando TCDD en la dieta, sobre la lamela secundaria o lamela respiratoria de las branquias.

Así mismo nos planteamos como segundo objetivo el conocer la afectación de la branquia sensitiva o no-respiratoria, observando el grado de afectación que puedan presentar las yemas sensitivas de las branquiespinas y la protección que le puedan dar todo el revestimiento mucoso de la zona por la acción del TCDD en la dieta.

Concretando los objetivos anteriores, en primer lugar analizaremos las modificaciones que se presentan en las branquias respiratorias por acción de los disruptores endocrinos, en cada uno de sus componentes como son:

- El revestimiento epitelial

- Las características de los capilares respiratorios
- El papel desempeñado por las células del cloro.

En segundo lugar analizaremos las modificaciones que se presentan en las branquias sensitivas, en cada uno de sus componentes, provocadas por este disruptor endocrino, en:

- El revestimiento epitelial
- Las yemas sensitivas
- El papel de protección de las células mucosas

3. Revisión bibliográfica

Los peces se agrupan en cuatro clases de vertebrados inferiores: Agnatha, Placodermi, Condrichthyes y Osteichthyes (Teleósteos). Esta última clase, los teleósteos, son peces con esqueleto óseo, que forman la mayor parte de los animales marinos. En la actualidad, muchos de ellos han migrado a aguas dulces, y representan casi la totalidad de los peces en este tipo de agua. Hay aproximadamente 20.000 especies de teleósteos. Difieren en sus hábitos, así como en la alimentación, ya que algunos ingieren partículas vegetales microscópicas, y otros son carnívoros que se alimentan de zooplancton y otros peces (Noga, 2000).

El orden Characiforme, la familia Characidae, subfamilia Serrasalminae, comprende una amplitud de peces, de la clase de los Teleósteos, distribuidos en América del Sur, en las cuencas de los ríos Amazonas, Paraná-Paraguay y Orinoco (Woynarovich y Woynarovich, 1998; Pineda et al., 2004). Uno de los carácidos más importantes es *Colossoma macropomun* denominado “gamitana” en el Perú, “cachama negra” en Colombia y Venezuela, “Tambaqui” en Brasil (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

Las branquias están formadas en la mayoría de los teleósteos por cuatro a cinco arcos branquiales, ubicados a cada lado de la faringe, en el borde caudal de cada arco branquial se proyectan los filamentos branquiales o lamelas primarias, las cuales para aumentar la superficie respiratoria presentan lamelas secundarias dispuestas en la parte superior e inferior de cada filamento (Amlacher, 1961; Ellis, 1981).

Se define varios conceptos anatómicos de las branquias, como son: Arco branquial o estructura generalmente cartilaginosa, aunque también puede ser de estructura ósea que suele poseer una forma ligeramente arqueada. Sobre él se asientan las branquias y nacen los filamentos branquiales y las branquiespinas (Wilson and Laurent, 2002; Torres et al., 2010). Branquiespina que son prolongaciones óseas digitiformes que posee el arco branquial en el lado opuesto a los filamentos branquiales. La función principal de los mismos es captar los posibles nutrientes que se encuentren en el agua en suspensión y retenerlos. La cantidad y tamaño de los mismos es variable dentro de cada especie, y el número de ellos es un dato estudiado para la clasificación e identificación de especies. Filamentos branquiales o lamelas primarias, es la parte carnosa de la branquia, de tonos rojizos y blandos. Se encuentran ubicados en sentido opuesto a las branquiespinas. Estos filamentos en las branquias, son los encargados realmente de captar el oxígeno y su introducción en la sangre (Wilson and Laurent, 2002; Fernandes and Perna-Martins, 2001; Evans, 2005),

Las branquias son órganos que se encuentran en cámaras ubicadas simétricamente a ambos lados del cuerpo, detrás de la cabeza. La macro arquitectura de la branquia de tilapia (*Oreochromis niloticus*) se puede delimitar a dos regiones bien definidas: el arco branquial y los filamentos. Del arco se originan dos hileras de filamentos. El arco branquial es un almacén de tejido óseo, cubierto y protegido en su superficie interna por una membrana serosa, por donde discurren los vasos sanguíneos de mayor calibre, como la arteria aferente del arco la cual se ramifica en vasos, de mediano calibre que irrigan a los filamentos y de

menor calibre (vasos nutricios) y avanzan hasta la punta de la lamela, llevando sangre para el intercambio gaseoso. El retorno de la sangre se hace por la arteria eferente del arco, la que drena vasos más pequeños provenientes de los filamentos. Externamente al hueso, se adosa una lámina de cartílago hialino, que se evagina proyectándose hacia los filamentos. Contigua al cartílago, justo en la base del filamento, se ubica la túnica muscular que genera cierto grado de movimiento a los filamentos, creando turbulencia en el microambiente acuático, facilitando el intercambio de sustancias (Torres et al., 2010).

Los arcos branquiales se forman en la pared faríngea debido a una proliferación del mesodermo de la placa lateral en esta región, reforzado por las células de la cresta neural. Se forman seis engrosamientos cilíndricos (el quinto es una estructura transitoria en los seres humanos) que se expanden desde la pared lateral de la faringe, pasan por debajo del piso de ella, y se aproximan a sus contrapartidas anatómicas que se expanden desde el lado opuesto. Al hacer esto, los arcos separan progresivamente el estomodeo primitivo del corazón en desarrollo (Evans et al., 2005).

En un principio, el estomodeo se halla delimitado por arriba por la placa neural, y caudalmente por la placa cardíaca en desarrollo. Se halla separado del intestino anterior por la membrana bucofaríngea, la que rápidamente se rompe, de modo tal que el estomodeo se comunica con el intestino anterior. Lateralmente, el estomodeo se halla limitado por el primer par de arcos branquiales. La característica más importante del desarrollo de la cabeza y el cuello es la formación de arcos branquiales, que aparecen entre la cuarta y quinta semana del desarrollo intrauterino, dando en gran medida el aspecto externo el embrión (Evans et al., 2005).

El mesodermo original de los arcos forma los músculos de la cara y el cuello. De tal manera, cada arco branquial se caracteriza por poseer sus propios componentes

musculares, los cuales conducen su propio nervio, y cualquiera que sea el sitio al que emigren las células musculares llevará consigo su componente nervioso craneal. Asimismo, cada arco posee su propio componente arterial (Wilson and Laurent, 2002; Evans et al., 2005)

La musculatura del primer arco branquial está constituida por los músculos de la masticación (temporal, masetero y pterigoideos), el vientre rostral del digástrico, el milohioideo, el músculo del martillo y el periestafilino externo (Evans et al., 2005).

El cartílago del primer arco branquial está formado por una porción dorsal llamada proceso maxilar, que se extiende hacia adelante debajo de la región correspondiente al ojo, y una porción ventral, el proceso mandibular o cartílago de Meckel. En el curso del desarrollo ambos procesos, el maxilar y el cartílago de Meckel, experimentan regresión y desaparecen, excepto en dos pequeñas porciones en los extremos dorsales que persisten y forman, respectivamente, el yunque y el martillo. El mesénquima del proceso maxilar dará origen más tarde al premaxilar, maxilar, hueso cigomático y parte del hueso temporal por osificación membranosa. El maxilar inferior se forma de manera análoga por osificación membranosa del tejido mesenquimático que rodea al cartílago de Meckel. Únicamente una pequeña porción del cartílago de Meckel experimenta transformación fibrosa. En consecuencia, los procesos maxilar y mandibular contribuyen en gran medida a la formación del esqueleto facial por osificación membranosa. Además, el primer arco contribuye a la formación de los huesos del oído medio (Wilson and Laurent, 2002).

Si nos fijamos en el desarrollo embrionario diversos autores estipulan que los arcos se ven claramente como abultamientos en las caras laterales en el embrión y se hallan separados en la cara externa de la pared faríngea por pequeñas hendiduras llamadas surcos branquiales. Del lado interno de la pared faríngea se hallan pequeñas depresiones

llamadas bolsas faríngeas, las cuales separan cada uno de los arcos branquiales por el interior. En muchos vertebrados inferiores, las bolsas faríngeas y los surcos branquiales se unen y eventualmente se rompen para formar los surcos de las branquias (Dunel-Erb et al., 1982; Wilson and Laurent, 2002; Evans, 2005). En los seres humanos, los surcos y bolsas poseen otras funciones. Así, un arco branquial posee:

- Un núcleo central de tejido mesodérmico cubierto por tejido ectodérmico (externo), y revestido por tejido endodérmico (interno).
- Un arco aórtico que corre alrededor de la faringe primitiva hacia la aorta dorsal.
- Un bastón cartilaginoso, que forma el esqueleto del arco, que deriva de las células de la cresta neural.
- Un componente muscular que formaran los músculos de la cabeza y el cuello.
- Un componente nervioso, nervio que deriva del neuroectodermo del encéfalo primitivo, que inerva la mucosa y músculos derivados del arco.

El arco branquial además de proteger los filamentos branquiales, las branquiespinas también están especializadas en todo lo relacionado con los alimentos y los hábitos alimenticios de los peces. Al respirar, el opérculo se cierra contra el cuerpo y los arcos branquiales sobresalen lateralmente, al mismo tiempo que el agua penetra en la boca del pez, abierta en ese momento. Al cerrarse la válvula oral los arcos branquiales se contraen, los opérculos se levantan y el agua es comprimida contra los filamentos. En ese proceso la sangre de las laminillas entrega el CO₂ y absorbe el oxígeno del agua. Lo importante de este proceso es que la sangre fluye por las laminillas en el sentido opuesto al flujo del agua sobre los filamentos, produciéndose el denominado "flujo contracorriente" (Evans et al., 2005).

Es un órgano que presenta varias funciones, entre ellas destacan el intercambio gaseoso, osmorregulación, equilibrio ácido-base y excreción de productos nitrogenados

(Noga, 2000; Evans et al., 2005). Se encuentra irrigado por la arteria branquial aferente que proviene de la aorta ventral, diseminándose la sangre a través de capilares para oxigenarse en las laminillas secundarias, luego la sangre oxigenada en los capilares confluye en la arteria branquial eferente, la cual se dirige a la arteria aorta dorsal para irrigación sistémica (Evans et al., 2005).

La descripción histológica, tanto a nivel estructural como ultraestructural de la branquia, muestra la complejidad de sus tejidos y entre ellos, el epitelial cuya estructura permite el intercambio óptimo de gases y de otras sustancias. La formación de los pliegues en la mucosa y la morfología de micropliegues, con su capa de glicocálix, son consideradas estructuras importantes en la retención de moco y son extremadamente sensible al estrés, grado de madurez celular y cambios ambientales (Ferguson 2006; Mazon et al 2002.; Wong & Wong 2000).

La superficie de las branquias está cubierta con un epitelio simple plano, presentando tres tipos de células: células del pavimento, un menor número de células del cloro, estas últimas de forma redondeadas o poligonales, acidófilas, con numerosas mitocondrias (de ahí que se denominen células ricas en mitocondrias, en teleósteos se denominan células del cloro) y ubicándose en el extremo proximal de las lamelas secundarias, y células mucosas dispuestas en las lamelas y en el epitelio basal. También se describen las células pilares, que soportan los múltiples capilares distribuidos en las lamelas secundarias (Hibiya, 1982; Evans et al., 1999; Evans et al., 2005).

Algunos autores indican que haciendo una revisión de la branquia se observa que la unidad funcional básica de la branquia es el filamento o lamela primaria, el cual soporta filas de lamelas secundarias en forma de placa (Wilson and Laurent, 2002; Torres, 2010). Varios autores hacen descripción histológica y funcionalidad de la lamela primaria o filamento y la

lamela secundaria (Wilson and Laurent, 2002; Fernandes and Perna-Martins, 2001; Evans, 2005), determinando que el epitelio del filamento es no-respiratorio, y el epitelio de la lamela secundaria está estructuralmente adaptado para el intercambio de gases (Fernandes and Perna-Martins, 2001).

En otros estudios, se describen las células ricas en mitocondrias (denominadas células del cloro en peces teleósteos), como las células mucosas tanto en su morfometría como su distribución dentro de la branquia (Fernandes and Perna-Martins, 2001; Eiras-Stofella and Fank-de-Carvalho, 2002), así como la comparación de las células del cloro con las encontradas en saco vitelino y en la piel (Kato, 2000).

Aunque el sistema tubular basolateral todavía está presente en MRCs de teleósteos de agua dulce, esta estructura parece estar menos desarrolladas en comparación con MRCs de agua de mar (Evans, 2005).

Pisam et al. (1988, 1990) han descrito dos subtipos de MRCs (células ricas en mitocondrias o células del cloro) (α y β) basado en el grado de tinción de osmio (oscuro o claro) en el citoplasma, morfología de la membrana apical y estructuras subapicales asociadas, extensión del sistema tubular, forma de la célula, y localización en el filamento.

α -MRCs (o α -células del cloro):

- Tinción citoplasmática clara
- Membrana apical lisa con numerosas vesículas subapicales
- Sistema tubular bien desarrollado
- Forma alargada
- Localizada en la base de la lamela, pudiendo estar asociada a células accesorias (ACs)

β -MRCs (o β -células del cloro):

- Tinción citoplasmática oscura
- Membrana apical con complejos salientes asociados con una red tubulovesicular subapical
- Sistema tubular con menor desarrollo
- Forma ovoide
- Localizada en región interlamelar

En la trucha común, las β -MRCs están asociadas con células accesorias (Acs). Tras la aclimatación al agua de mar, α -MRCs proliferan en MRCs típicas de teleósteos de agua de mar, mientras que β -MRCs degeneran. Los papeles funcionales específicos de α - y β -MRCs en teleósteos de agua dulce aún no se han identificado (Evans, 2005).

Para cumplir con su función respiratoria, las branquias presentan una combinación de especialización, cuya función principal es aumentar la superficie de área relativa, aumentando la eficacia para el intercambio gaseoso. Los filamentos son especializaciones constituidos por un núcleo de cartílago hialino que les brinda soporte y les da la forma característica. Sobre la superficie del cartílago se adosa la mucosa del filamento, la cual está formada por epitelio plano simple y una lámina propia de tejido conectivo laxo. La evaginación del epitelio del filamento es otra especialización para aumentar el área de superficie. Las lamelas son estructuras digitiformes, cubiertas por un epitelio plano simple (epitelio lamelar), el cual forma pliegues cuyo análisis ultraestructural muestra una organización a manera de huellas dactilares aumentando la superficie de intercambio; además, las células epiteliales planas facilitan el intercambio rápido entre el O₂ y CO₂.

Entremezcladas con las células planas, se ubican varias poblaciones celulares, tales como las células pilares que regulan el flujo sanguíneo de los canales pilares, son macrófagos y forman parte del sistema retículo endotelial, fagocitan partículas extrañas, patógenos, especialmente bacterias, ya que producen lisozima y son células presentadoras de antígenos; constituyendo la primera línea de defensa de las branquias (Ferguson, 2006).

Otra población celular presente, es la de células caliciformes secretoras de mucina, la cual forma una película de protección mecánica para el epitelio, creando una interfaz entre el ambiente acuoso y el tejido, además, participan en la regulación iónica y protección inmunológica, actuando como barrera contra agentes patógenos y sustancias tóxicas (Ferguson, 2006). Especialmente en la base de la lamela y en el epitelio opercular, se encuentran las células osmorreguladoras de cloro, ricas en mitocondrias, secreta NaCl a través de un gradiente electroquímico producido por la acción de una ATPasa Na^+/K^+ , participando en el balance ácido base y procesos de aclimatación (Biagini *et al.*, 2009; Daborn *et al.*, 2001). El epitelio lamelar se dispone de tal manera que en el centro de ésta se forma el canal pilar por donde discurre un vaso tipo capilar por el cual circulan eritrocitos que avanzan hasta la punta de la lamela. El capilar de la lamela está formado por un endotelio (epitelio plano simple) y su lámina basal, el cual, junto con el epitelio lamelar (plano simple y su lámina basal) forman una barrera hemodinámica, exponiendo a los eritrocitos muy cerca del medio acuático para realizar el intercambio de gases; confiriendo las propiedades de órgano respiratorio a las branquias.

La posición y la distancia entre lamela y lamela en el filamento mantiene una simetría, al igual que el espesor de los epitelios, fenómeno de importancia crítica, ya que cuando son afectados limita la eficiencia de intercambio de gases; alterando la simetría lamelar; perturbando, por lo tanto, lo que se conoce como Distancia de Difusión Efectiva (DDE) y produciendo la disfunción del órgano (Sanchez *et al.*, 1997; Ferguson, 2006).

Existen estudios, en varias especies de peces, sobre la variación del número y localización de las células del cloro dentro de la branquia, dependiendo de las condiciones ambientales del agua, tanto de salinidad como de concentración de oxígeno (Fernandes and Perna-Martins, 2001; Erkmen and Kolankaya, 2009), ya que a las células del cloro se les atribuye una función secretora de NaCl en los teleósteos de agua de mar. En teleósteos de agua dulce, también están presentes, pero se caracterizan por tener diferentes formas y funciones que las de teleósteos de agua de mar (Evans, 2005).

Daborn et al. (2001) estudiaron la estructura y función de las células de cloro; reportando variaciones en su morfología por cambios dados en la salinidad, acidificación, e hiperoxia; además, los autores consideran que estas células participan en procesos de aclimatación por salinidad, en respuesta a un simple estímulo osmótico, demostrando las potencialidades en estudios electrofisiológicos y de evaluación ambiental.

Las branquias externas de anuros son estructuras respiratorias embrionarias que desaparecen en las larvas, mientras que las branquias internas permanecen hasta la metamorfosis. La morfología branquial fue estudiada con microscopio óptico en embriones y larvas de *Bufo arenarum*. Los filamentos branquiales externos se originan a partir de los arcos viscerales 3 a 5 embrionarios; estos filamentos presentan una doble capa epidérmica, células mesenquimáticas y algunos capilares. Las branquias son recubiertas por completo por el opérculo en el estadio 25 y finalmente desaparecen. Los cuatro pares de branquias internas se encuentran ubicadas en dos cámaras branquiales a cada lado del corazón; cada branquia está formada por un arco branquial en el cual se insertan ventralmente los filamentos respiratorios y dorsalmente los filtros branquiales. Cada filamento está compuesto por un eje y numerosas ramificaciones, que presentan una cobertura epitelial, tejido conectivo, vasos sanguíneos y capilares mesodérmicos. El sistema branquial es sostenido por el cartílago del arco branquial; por debajo se encuentran las arterias branquiales

aferentes y eferentes y el músculo constrictor. Si bien el proceso de regresión de las branquias internas de anuros ha sido bastante dilucidado, la desaparición de las branquias externas ha sido poco estudiada hasta el momento. La apoptosis es un tipo de muerte celular presente durante el desarrollo embrionario, caracterizada por la fragmentación de ADN. En el presente trabajo, células apoptóticas fueron estudiadas en el epitelio de las branquias externas con el microscopio óptico, y fueron detectados in situ fragmentos de ADN a través de la técnica TUNEL. La presencia y distribución de núcleos marcados fue mayor en los estadios 24 y 25, aunque también se encontraron en los restantes estadios embrionarios analizados. Un ensayo inmunohistoquímico para detectar PCNA (proliferating cell nuclear antigen) identifica células en todas las fases activas del ciclo celular. En este estudio, esta metodología permitía marcar las células proliferativas en tejidos embrionarios del sistema branquial, durante la regresión de las branquias externas. La presencia de apoptosis en el epitelio de las branquias externas progresa simultáneamente con una activa proliferación en las branquias internas. Los resultados obtenidos muestran la importancia de la apoptosis en la regresión de las branquias externas, ya que este tipo de muerte celular parece ser el proceso principal para reajustar el número celular del epitelio branquial, preparándolo para el nuevo sistema respiratorio de las larvas. No existe información previa acerca de la distribución de componentes del citoesqueleto en las branquias de anuros. Con el objeto de conocer la distribución de algunos de las principales proteínas citoesqueléticas en las branquias de *Bufo arenarum*; se efectuó un ensayo inmunocitoquímico en las branquias externas e internas. Se observó inmunorreacción para actina en el epitelio y tejido conectivo; la inmunodetección a miosina estuvo restringida al tejido conectivo de las branquias internas. Se encontró expresión de a y b tubulinas en el epitelio y las células ciliadas. La inmunocoloración para la vimentina fue débil en las células epiteliales, siendo intensa en el tejido conectivo. La inmunorreacción positiva para las citoqueratinas de bajo peso molecular se encontró en los epitelios branquiales y en otros tejidos que en

vertebrados superiores expresan vimentina, como el endotelio de los vasos y células musculares. Los resultados obtenidos demuestran que existe una gran diversidad de elementos en el citoesqueleto de las branquias larvales de anuros. El desarrollo de las branquias de anfibios es un excelente modelo de estudio de las interacciones entre las capas germinales de los embriones. Con el objeto de analizar la capacidad de diferenciación, especificación y determinación del esbozo branquial en el estadio de botón caudal, se llevaron a cabo explantes y trasplantes en embriones de *Bufo arenarum*. Los esbozos trasplantados desarrollaron filamentos análogos a los observados en las branquias externas e internas, incluso funcionalmente. Los explantes de endo-mesodermo fueron capaces de diferenciar tejidos branquiales típicos, en presencia de distintos ectodermos; el ectodermo presuntivo branquial en forma aislada no diferencia ninguna estructura. En los embriones explantados, el desarrollo de las branquias externas fue impedido tanto por la ausencia del ectodermo como del endo-mesodermo branquial. La diferenciación de las branquias internas solo fue afectada por la pérdida del endo-mesodermo del esbozo. Estos resultados sugieren que el ectodermo branquial presuntivo se encuentra definido en el estadio de botón caudal, pero es incapaz de diferenciar estructuras branquiales en ausencia del endo-mesodermo. Los Factores Natriuréticos Atriales son una familia de péptidos vasodilatadores, diuréticos y natriuréticos, cuya presencia ha sido demostrada en el corazón de larvas y adultos de *Bufo arenarum*. En el presente estudio, se efectúa un análisis ultraestructural e inmunohistoquímico acerca de la presencia de FNAs en las branquias internas de larvas premetamórficas. Los resultados del estudio inmunocitoquímico indican que en el estadio II larval y subsiguientes, se encuentran células inmunorreactivas en las branquias internas. A nivel ultraestructural, se encontraron en las células claras de los filtros branquiales gránulos secretorios similares a los gránulos FNA-inmunorreactivos de las células mioendocrinas de la misma especie. Estas observaciones permiten suponer que las

hormonas cardiacas podrán jugar un rol paracrino y/o autocrino en el balance osmótico y electrolítico a nivel de las branquias internas (Alonso, 2003).

El uso indiscriminado de disruptores endocrinos, en diferentes industrias, favorecen el almacenamiento de estas sustancias en el organismo. Es un hecho como indican Colborn (1993), Campbell (1998), Guillette (2000), Edwards (2006), etc., que estas sustancias entre las que se encuentran las dioxinas, modifican diversos sistemas, destacándose los órganos sexuales, tanto masculinos como femeninos. Como la intoxicación, normalmente, se realiza de forma paulatina (Antunes, 2001; Jacobs, 2002; Vives, 2005), se conocen escasas lesiones en los órganos por donde se introducen los tóxicos, sobre todo las vías digestivas y respiratorias. En mamíferos y peces se citan lesiones en el tracto gastrointestinal (Henry, 1997; Arellano, 2002; Zodrow, 2004), en tanto apenas se conocen modificaciones en vías respiratorias cuando se introducen vía digestiva.

La branquia es el principal órgano blanco por contaminantes (Biagini et al. 2009); su tejido epiteliales un excelente parámetro para evaluar los efectos de variables ambientales, sustancias tóxicas y calidad del agua (Verján et al. 2002; Mazon et al., 2002; Wong & Wong, 2000).

Por otra parte, las branquias han sido evaluadas como indicadores de la presencia de sustancias tóxicas, como metales, entre otras. Las lesiones tisulares observadas en las branquias de los peces constituyen una metodología reconocida y rápida para determinar los daños (Ferguson et al., 1992; Sánchez et al. 1997). El aneurisma, la fusión lamelar, la hiperplasia del epitelio, entre otras, son alteraciones conducentes a trastornos funcionales de las branquias y son utilizadas hoy en día como biomarcadores histopatológico para estudios de evaluación ambiental (Verján et al. 2002; Cengiz, 2006).

Según se desprende de algunos estudios, las células del cloro, sobre todo en la zona respiratoria, aumentaban progresivamente al aumentar la sustancia tóxica (van den Heuvel, 1999), lo que infería una reacción frente a las dioxinas para su eliminación, si bien como las dosis iban en aumento, también se hipertrofiaban (Al-Ghanbousi, 2012).

De forma similar a numerosas intoxicaciones en peces, y de forma inespecífica, tanto las lamelas primarias como secundarias, mostraban una marcada hiperemia (Al-Ghanbousi, 2012), que terminaba en una erosión del epitelio de revestimiento y capilar, produciendo edemas y microhemorragias (Mallatt, 1985). Destacándose la producción de una tumefacción de las lamelas (Zodrow, 2004; Al-Ghanbousi, 2012).

Uno de los sistemas defensivos de las branquias que se ponía en funcionamiento es el que se refiere a las células mucosas. Conforme se acentuaba la intoxicación, se producía una inflamación mucosa, con una hiperplasia e hipertrofia de las células mucosas superficiales y profundas (Lichtenfels, 1996).

Los disruptores endocrinos tienen como órgano blanco de su actuación la hipófisis, y su acción modifica gravemente el parénquima celular adenohipofisario, Russell et al. (1988) describe degeneración de las células gonadotropas, en tanto que Mancera et al. (2002) estudia que en este proceso, en su compensación se activan las células del lóbulo cefálico, las células ACTH y sobre todo las células LTH, afectando, entre otras, a la prolactina o luteotropina (PRL).

Finalizado el experimento se encontró que los valores plasmáticos de los peces sometidos a osmolaridades de 250 mOsmol/Kg⁻¹ y 387 mOsmol/Kg⁻¹ fueron más altos que en los observados en los peces sometidos a una osmolaridad inferior, 22 mOsmol/Kg⁻¹, observando una tendencia similar en lo referido a la concentración de electrolitos. En tanto que la actividad Na⁺-K⁺-ATPasa de branquias y a válvula espiral desarrolló un cambio

relacionado con el transcurso de la exposición y con respecto a la salinidad medioambiental. Después de la transferencia al medio hiperosmótico, la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la válvula espiral disminuyó, en tanto que la actividad branquial permaneció constante. Al final del experimento, la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la válvula espiral aumentó en el grupo de peces expuestos al medio isosmótico e hiperosmótico, así como también aumentó la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ branquial. Las branquias de los peces expuestos a los medio iso e hiperosmóticos presentaron hiperplasia, metaplasia y petequias y signos de trombosis (telangiectasia), unido a un incremento de las células del cloro. La organización de la mucosa de la válvula espiral en peces sometidos al medio hiperosmótico presentó enterocitos con una marcada vacuolización citoplasmática supranuclear y edema intracelular (Mancera et al., 2002).

Factores nutricionales como dietas con una deficiencia de Vitamina C o Ácido Pantoténico también pueden originar lesiones branquiales. Oliveira et al. (2001) mostró en un estudio experimental lesiones como hiperplasia de filamentos, elevación epitelial, telangiectasia y fusión laminar por infiltrado sanguíneo en larvas de tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con dietas con niveles bajos en Vitamina C. La importancia de esta vitamina está también relacionada con la maduración del cartílago y del colágeno, por lo tanto, ante la deficiencia habrá un desarrollo anormal del cartílago, evidenciando distrofia del cartílago y alteración de las branquias (Cowey y Roberts, 1981). Sin embargo, no se observó distrofia del cartílago en los casos estudiados, por lo cual no se puede asegurar que las lesiones como hiperplasia del filamento, hiperplasia interlaminar y fusión de láminas sean consecuencia sólo de la deficiencia de Vitamina C.

En los procesos de intoxicación, los animales muestreados no presentaron alteraciones externas en las branquias ni previamente presentaban signos clínicos aparentes de hipoxia (boquean en la superficie del estanque), a pesar de las lesiones

histológicas anteriormente encontradas tales como hiperplasia interlaminar, hiperplasia del filamento branquial, fusión de laminillas e infiltración de células mononucleares, lo cual se podría explicar a que la mayoría de lesiones se presentaron en forma leve y moderada. Verján (2002), sostiene que el pez paco (*Piaractus brachypomus*) tolera cierto número de parásitos sin manifestar signos clínicos evidentes e incide en que la infección o infestación, así como patologías no equivalen a enfermedad clínica. Así mismo Florindo *et al.* (2006), sostiene que el pez gamitana (*Colossoma macropomum*) es un pez que tiene tolerancia a los niveles bajos de oxígeno disuelto, y que utiliza una serie de mecanismos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento para contrarrestar esta deficiencia en su hábitat. Esto podría ser una de las explicaciones relacionadas al hecho de que estos peces no manifiesten signos clínicos a pesar de una mala calidad del agua o alteraciones en las branquias que dificulten su intercambio gaseoso, más aún si la gamitana ha sido catalogada como una especie resistente a las enfermedades (Gonzales y Heredia, 1998).

Por otro lado, el 30% (12/40) de los peces presentaban quistes de mixosporidios en el músculo esquelético con estadios esporogónicos inmaduros, no habiendo una reacción inflamatoria en la periferia ni daños en el tejido, coincidiendo con Ferguson (2006), que sostiene que la mayoría de los mixosporidios con estadios inmaduros parecen producir una leve o nula respuesta inflamatoria y generalmente, son encontrados como hallazgos incidentales en el trabajo de rutina diagnóstica. Reportes similares en nuestro país en la especie *Colosoma macropomum* que describan lesiones histológicas parasitarias o de otro origen en el músculo no han sido realizados anteriormente (Florindo *et al.*, 2006).

Las dioxinas constituyen un grupo de compuestos químicos que son contaminantes ambientales persistentes. Las dioxinas se encuentran en el medio ambiente de todo el mundo y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en el tejido adiposo de los animales (Guzmán y Zambrano, 2007).

El nombre químico de la dioxina es 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD). El término «dioxinas» se utiliza a menudo para referirse a una familia de compuestos relacionados entre sí desde el punto de vista estructural y químico, constituida por las dibenzo-para-dioxinas policloradas (PCDD) y los dibenzofuranos policlorados (PCDF). Bajo esa designación también se incluyen algunos bifenilos policlorados (PCB) análogos a la dioxina que poseen propiedades tóxicas similares. Se han identificado unos 419 tipos de compuestos relacionados con la dioxina, pero se considera que sólo aproximadamente 30 de ellos poseen una toxicidad importante, siendo la TCDD la más tóxica.

La exposición breve del ser humano a altas concentraciones de dioxinas puede causar lesiones cutáneas, tales como acné clórico y manchas oscuras, así como alteraciones funcionales hepáticas. La exposición prolongada se ha relacionado con alteraciones inmunitarias, del sistema nervioso en desarrollo, del sistema endocrino y de la función reproductora. La exposición crónica de los animales a las dioxinas ha causado varios tipos de cáncer. El Centro Internacional OMS de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) realizó en 1997 una evaluación de la TCDD. De acuerdo con los datos de las investigaciones en animales y los datos epidemiológicos humanos, el CIIC ha clasificado la TCDD como «carcinógeno humano». Sin embargo, no afecta al material genético, y hay un nivel de exposición por debajo del cual el riesgo de cáncer podría ser insignificante.

Hasta hace unos años, se ha considerado a la dioxina como un débil estrógeno medioambiental, debido a que en algunos ensayos, la dioxina resultó de 10.000 a 100.000 veces menos potente que el estradiol (Welshons et al., 2003), utilizándose como afirmación común entre los diversos autores que la dioxina tiene una actividad prolactínica débil en sistemas *in vivo e in vitro* (Snyder et al., 2002). Sin embargo, estudios sobre mecanismos moleculares han revelado una variedad de rutas a través de las cuales la dioxina puede estimular una respuesta celular a muy bajas dosis (Welshons et al., 2006).

La VTG es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (anfibios, aves, peces y reptiles) durante el ciclo de maduración ovárica, bajo el control de regulación endocrina a través del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal, sintetizada por el hígado en respuesta a la circulación de estrógenos endógenos, principalmente el 17β -estradiol (E2). Por ello, un aumento de la inducción de VTG en las hembras de peces, así como la simple inducción de VTG en los machos, puede originar repercusiones directas sobre la capacidad reproductiva de los peces (disminución de la producción de gametos, disminución en el número y tamaño de los huevos, fallos en el desove) así como una anormal diferenciación sexual en las larvas de los peces (Kime y Nash, 1999) por ello se utiliza como biomarcador para medir los efectos estrogénicos y prolactínicos de diversos compuestos químicos, entre ellos la dioxina (Lindhost et al., 2000; Van den Belt et al., 2003).

Sumpter y Jobling (1995), ya observaron una inducción de VTG al exponer a un cultivo de hepatocitos de trucha arco iris a dosis medioambientales de la dioxina de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/l}$ durante sólo 2 días. En nuestros resultados, una gran inducción de VTG sólo la encontramos en machos expuestos a 100 y 270 ng/g de alimento de la dioxina, obteniendo unos valores de 755.357,04 ng/g y 1.189.285,60 ng/g de VTG, respectivamente. Según la clasificación realizada por Mandich et al (2007), los peces que han sido expuestos a estas dos concentraciones serían definidos como vitelogénicos (>11.000 ng/g VTG), y muy vitelogénicos (>1.000.000 ng/g VTG) respectivamente.

En las hembras, los valores de VTG son muy superiores a los valores de los machos en todas las concentraciones de estudio, como cabría esperar, ya que como hemos comentado anteriormente, la VTG es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos. Varios autores han encontrado diferencias entre sexos en relación a la exposición de los peces a diferentes compuestos estrogénicos. Así, Kime y Nash (1999), expusieron durante 2 semanas a zebrafish adultos a diferentes concentraciones de $17\text{-}\beta$ etinilestradiol

(EE2), encontrando que el nivel de inducción de la VTG fue tres veces más alto en las hembras que en los machos.

Aunque los niveles de VTG pudieran ser esperados más altos en las hembras que en los machos, al tratar al zebrafish con diversas dosis de EE2, Van den Belt et al (2001) no encontraron ninguna diferencia significativa entre ambos sexos, aunque sí encontraron diferencias significativas al exponer a ambos sexos del zebrafish a 4-tert-octilfenol (OP).

Diversos autores han evaluado el efecto prolactínico de los disruptores endocrinos en diferentes especies de peces. Ishibashi et al (2005), expusieron a peces medaka (*Oryzias latipes*) machos a dosis de dioxina durante 21 días. La exposición a 1000 µg/l de la dioxina provocó un aumento significativo de las concentraciones de la VTG hepática con respecto al grupo control, coincidiendo con nuestros resultados, no así al exponerlos a dosis de 250 y 500 µg/l de la dioxina, en donde no encontraron un aumento significativo de las concentraciones de VTG en relación a los grupos control.

Lindholst et al (2000) observaron una inducción significativa de la síntesis de VTG en trucha arco iris expuestas a 500 µg/l de la dioxina durante 12 días. Sohoni et al (2001) utilizando un rango de dosis de TCDD parecidas a las empleadas por nosotros aunque con un periodo de exposición mucho mayor, concluyeron que el TCDD inducía la síntesis de VTG en machos de fathea dminnow (*Pimephales promelas*) a concentraciones de 640 y 1280 µg/l después de 43 días y de 160 µg/l después de 71 días. En medaka, Tabata et al (2003) observaron aumentos marcados en las concentraciones de VTG plasmática de los machos después de 5 semanas de exposición a 1000 µg/l de la dioxina.

Mandich et al (2007) en su estudio con la dioxina en carpas, encontraron valores de VTG similares a los nuestros al exponer a los peces a dosis bajas de la dioxina, en cambio, observaron unos valores superiores de VTG en las carpas expuestas a las concentraciones

mayores de la dioxina, partiendo de unos valores de VTG similares a los nuestros en los peces control.

En relación a estas diferencias entre especies, Van den Belt et al (2003), en su estudio comparativo entre machos de zebrafish y de trucha arco iris, expusieron a ambos a la acción de un compuesto estrogénico como es el OP durante 3 semanas, observando una inducción de VTG en trucha arco iris a concentraciones de 30 µg/l, mientras que los zebrafish macho son al menos 3 veces menos sensibles que las truchas arco iris, puesto que encontraron una respuesta significativa de VTG en trucha a un nivel de exposición de 30 µg/l de OP, mientras que para el zebrafish un nivel de exposición de 100 µg/l, la máxima dosis de OP a la que expuso a los peces, fue insuficiente para inducir la VTG Lindholst et al (2003), estudiaron estos datos comparativos entre ambas especies observados por Van den Belt et al (2003), concluyendo que estas diferencias podían ser debidas a un metabolismo hepático más rápido, y por lo tanto, más efectivo en el zebrafish en comparación a la trucha arco iris.

Orn et al (2006) realizaron una comparación entre el zebrafish y el pez medaka exponiéndolos a diversas dosis del compuesto estrogénico sintético EE2. Comparado con los grupos control, la concentración de VTG media era perceptiblemente más alta en el zebrafish, después de la exposición a 10 ng/l de EE2, mientras que no se registró ningún aumento en medaka. La concentración media de VTG en zebrafish expuesto a 10 ng/l de EE2 era de 4.900 µg/g y en el pez medaka de 2,5 µg/g. La exposición del zebrafish a 100 ng/l EE2 dio lugar a la mortalidad del 100% de los peces, mientras que en el pez medaka ésta concentración causó un aumento significativo de VTG, con una concentración media de VTG de 1.400.000 ng/g. Por lo tanto en este estudio, el zebrafish presentó una sensibilidad mucho mayor que en medaka para producir VTG tras la exposición a 10 ng/l de EE2 durante 3 semanas.

Además de la dioxina, existen multitud de estudios en el zebrafish y en otras especies de peces relacionados con compuestos químicos con posible capacidad estrogénica.

Van den Belt et al (2001) expusieron a zebrafish machos y hembras, a la acción del EE2, a dosis de 5, 10 y 25 ng/l durante 3 semanas. Ya a la concentración más baja, se produjo una inducción de la VTG plasmática en los zebrafish macho con respecto al control, y el aumento de la concentración a 10 ng/l EE2 se tradujo en una máxima respuesta de inducción de VTG, superior a la encontrada al exponer a los peces a una dosis de 25 ng/l de EE2. En las hembras la máxima inducción de VTG también se produjo al exponerlas a una dosis de 10 ng/l EE2. Orn et al (2003) encontraron una inducción significativa de VTG en el zebrafish al exponerlo a dosis de 10 ng/l de EE2. Rose et al (2002) utilizando dosis más bajas, encontraron una inducción significativa de los valores de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero al exponer al zebrafish a dosis de sólo 3 ng/l de EE2 durante 8 días.

En relación al 17β -estradiol (E2), un esteroide natural, Rose et al (2002), expusieron al zebrafish a diversas dosis de E2, observando una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero a una dosis de 21,4 ng/l de E2, y aumentando estos niveles al exponer a los peces a dosis mayores de E2. Resultados muy similares han sido encontrados por Van den Belt et al (2003), al exponer a zebrafish a dosis de 20 y 100 ng/l de E2, con una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero, desde la dosis más pequeña y aumentando estos valores al exponerlos a la dosis de 100 ng/l E2.

Otros compuestos ampliamente utilizados en la industria y considerados como disruptores endocrinos, son los alquilfenoles polietoxilados, como el 4-tert-octilfenol (OP) y el 4-nonilfenol (NP). Estos alquilfenoles han sido ampliamente estudiados y su actividad estrogénica en diversas especies de peces ha sido demostrada por diferentes autores

(Jobling et al., 1996; Routledge y Sumpter, 1997). Utilizando el zebrafish, Van den Belt et al (2003) también observaron un aumento significativo en la inducción de VTG plasmática en relación al control al exponer a los peces a una concentración de 500 µg/l de NP, pero este aumento no fue observado a concentraciones inferiores, de 20 y 100 µg/l. En cambio, Yang et al (2006) encontraron en el zebrafish un aumento significativo de la inducción de VTG a partir de una dosis de 100 µg/l, obteniendo unos resultados muy similares a los de nuestro estudio si comparamos las mismas dosis aunque utilizando diferentes productos químicos (NP y BPA, respectivamente).

Se utiliza como biomarcador la histopatología branquial del zebrafish, ya que está demostrado que esta histopatología responde con una gran sensibilidad a la exposición a disruptores endocrinos. El aneurisma, la fusión lamelar, la hiperplasia del epitelio, entre otras, son alteraciones conducentes a trastornos funcionales de las branquias y son utilizadas hoy en día como biomarcadores histopatológicos para estudios de evaluación ambiental (Verján et al.2002; Cengiz, 2006). En 2001, con motivo de la 4ª Reunión del Grupo de Trabajo relacionado con los Compuestos Disruptores Endocrinos de la OCDE, fue comúnmente aceptado que la detección de VTG, junto con el aspecto macroscópico de las branquias y gónadas y la histopatología, son la base del análisis de compuestos proláctínicamente activos (Segner et al., 2003a).

En las branquias respiratorias, encontramos en los dos primeros lotes (10 y 40 ng/g de la dioxina) los mismos tipos de lamelas que hemos observado en el grupo control, todos ellos se observan con nitidez y mantienen la estructura y el tipo de células de revestimiento, siendo muy similares al grupo control. En los zebrafish expuestos a 100 ng/g de la dioxina encontramos alguna anormalidad en los capilares, como es la vacuolización del citoplasma de las células endoteliales. A dosis de 270 ng/g/l de TCDD observamos en todas las lamelas primarias y secundarias una degradación de sus componentes celulares, donde podemos

destacar una fibrosis intersticial caracterizada por la presencia de tejido conectivo fibroso en el interior del estroma capilar, además de infiltraciones granulomatosas. También podemos observar un aumento en el número de elementos infiltrados en relación a los observados en el lote de peces expuestos a 100 ng/g de alimento de la dioxina.

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, no detectaron alteraciones y sólo en un 10% de las muestras encontraron en células del cloro y oocitos en atresia en los ovarios de hembras expuestas a las 2 concentraciones inferiores de la dioxina (1 y 10 µg/l de la dioxina). A dosis superiores de 100 y 1000 µg/l de TCDD, las branquias mostraron alteraciones en el estroma conectivo, granulocitos eosinofílicos e incremento de los hiperémicos, afectando al 60% de los animales en las concentraciones más altas.

En la directriz de la OCDE del 2009, encontramos una serie de criterios diagnósticos en la histopatología branquial en relación al análisis de la acción de compuestos potencialmente prolactínico. Entre los objetivos primarios de diagnóstico encontramos el incremento de la desorganización como marcador del daño histopatológico branquial por la acción de estos compuestos (OECD, 2009).

Se han descrito diversos factores en peces teleósteos como causantes de un aumento de la atresia de las células del cloro, tales como hipofisectomía, desnutrición, cambios de temperatura y tratamientos con compuestos prolactínicos (Guraya, 1986).

Varios autores coinciden con nuestros resultados al utilizar diversos compuestos prolactínicos a concentraciones similares, Weber et al (2002) expusieron a los zebrafish a una concentración de 100 µg/l de NP observando un aumento en el tamaño del canal acuífero con respecto al grupo control. Gray et al (1999) observaron una alta incidencia de atresia en hembras adultas de pez medaka (*Oryzias latipes*) expuestas a 100 µg/l de OP durante 2 meses. Spano et al (2004) tras exponer a goldfish (*Carassius auratus*) adultos a

100 y 1000 µg/l de atrazina durante 3 semanas observaron una mayor proporción de atrésicos en estos lotes de exposición que en el control (20 y 25% de los capilares y canales, respectivamente).

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, observaron desde la menor concentración de estudio (1 µg/l de dioxina), que un número amplio presentaban una organización alterada del espacio intercanalicular, así como la aparición de granulocitos eosinófilicos. En un menor número de branquias sensitivas, también describió una reducción de yemas sensitivas. En la dosis de 10 µg/l de la dioxina, la desorganización del espacio intercanalicular era más evidente, el diámetro de algunos canales estaba disminuido.

Bottero et al (2005), observaron unas lesiones similares a las encontradas por nosotros y por Mandich en las branquias de carpas adultas al exponerlas durante 14 días a diferentes dosis del estrógeno sintético EE2 (1, 4, 16 y 64 ng/l de EE2) mostrando estas branquias una clara evidencia de haber sido sometidas a una acción disruptora (reducción del número del epitelio de revestimiento, reducción de la media del diámetro).

Rey et al (2009) expusieron a peces *Cichlasoma dimerus* al OP (4-tert-octilfenol) a unas concentraciones de 30, 150 y 300 µg/l durante 60 días. La histología de las branquias reveló progresivos efectos adversos en la estructura de las lamelas tras la exposición a concentraciones de OP. Las branquias expuestas a 30 µg/l eran similares a los del control. En cambio, en los peces expuestos a 150 µg/l de OP, se observaron multitud de lesiones, la mayoría similares a las encontradas en nuestro estudio. Las branquias preservaban la estructura canalicular pero se observó una incrementada fibrosis intersticial. También pudieron identificar gránulos eosinófilicos. El tejido branquial de los tratados con 300 µg/l de OP reveló un desorden de los capilares así como una ausencia de envueltas.

Kinnberg et al (2000) expusieron a peces *Xiphophorus maculatus* a diferentes concentraciones (80, 640, 960 y 1280 µg/l) del alquilfenol NP (4-nonilfenol). En las lamelas respiratorias apreciaron un descenso en el número de capilares, un gran número de células del cloro hipertrofiadas sin incluir dentro del epitelio a la que estuvieron expuestos los peces era mayor.

Kinnberg et al (2000) también expusieron a *Xiphophorus maculatus* a una dosis de 96 µg/l de EE2, encontrando efectos sobre la estructura canalicular similar a las observadas en los peces expuestos a altas concentraciones de NP. En algunos de las lamelas los efectos eran aún más pronunciados.

Zha et al (2007), al igual que Kinnberg et al (2000) realizaron un estudio donde expusieron a diversas dosis de EE2 (0, 1, 5 y 25 ng/l) y NP (3, 10 y 30 µg/l) durante 28 días a *Goby cyprusrarus*. Los canales hídricos observados en las exposiciones a 3, 10, y 30 µg/l de NP y 1 y 5 ng/l de EE2 eran similares a los del grupo control a los 28 días. Sin embargo, los canales estaban seriamente degenerados cuando fueron expuestos a 25 ng/l de EE2.

La exposición a compuestos lactotrópicos activos ha dado lugar en diversos estudios a un aumento en el tamaño (hipertrofia) de las células del cloro, con o sin aumento del número de éstas (Miles-Richardson et al., 1999b; Kinnberg et al., 2000; Kinnberg y Toft, 2003; van der Ven et al., 2003). En nuestro estudio hemos medido el diámetro medio de las células del cloro en los diferentes lotes de zebrafish expuestos a la dioxina, observando un aumento del diámetro medio de estas células a medida que incrementamos la concentración de la dioxina a la que exponemos a los zebrafish, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los 3 lotes de mayor concentración (40, 100 y 270 ng/g de alimento de TCDD) y el control.

Miles-Richardson et al (1999b), expusieron a peces *fathead minnow* a NP a concentraciones inferiores a las nuestras (1,1 y 3,4 µg/l), observando un aumento en el tamaño de las células del cloro con respecto al control. Estas presentaban un citoplasma distendido por la presencia de cuerpos residuales y figuras de mielina, así como una proliferación en el número de estas células. Kinnberg et al (2000), expusieron a peces *Xiphoporus maculatus* durante 28 días al NP, a unas concentraciones dentro del rango de las utilizadas por nosotros, observando un incremento en el número de estas células hipertrofiadas con respecto al control al exponer a los peces a dichas concentraciones. Kinnberg y Toft (2003), al exponer a peces guppy (*Poecilia reticulata*) a concentraciones de 1 µg/l de EE y 900 µg/l de OP, observaron la hipertrofia. Van der Ven et al (2003) también pudieron observar la hipertrofia de las células del cloro en las branquias de zebrafish adultos tras exponerlos a la acción del prolactínico sintético metildihidrotestosterona.

El uso indiscriminado de disruptores endocrinos, en diferentes industrias, favorecen el almacenamiento de estas sustancias en el organismo. Es un hecho como indican Colborn (1993), Campbell (1998), Guillette (2000), Edwards (2006), etc., que estas sustancias entre las que se encuentran las dioxinas, modifican diversos sistemas, destacándose los órganos sexuales, tanto masculinos como femeninos. Como la intoxicación, normalmente, se realiza de forma paulatina (Antunes, 2001; Jacobs, 2002; Vives, 2005), se conocen escasas lesiones en los órganos por donde se introducen los tóxicos, sobre todo las vías digestivas y respiratorias. En mamíferos y peces se citan lesiones en el tracto gastrointestinal (Henry, 1997; Arellano, 2002; Zodrow, 2004), en tanto apenas se conocen modificaciones en vías respiratorias.

4. Material y métodos

4.1 Animales utilizados

Para el presente estudio se utilizaron, por un lado 50 ejemplares de zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822) 25 hembras y 25 machos de unas 16 semanas de edad, con un peso medio de $0,568 \pm 0,139$ gramos y una longitud media de $4,173 \pm 0,239$ centímetros, dentro del patrón de la especie, en buen estado de salud y libres de malformaciones para el estudio histopatológico estructural y ultraestructural; por otro lado se utilizaron 70 zebrafish de igual características que los anteriores, divididos en 35 hembras y 35 machos para el estudio de la dioxina y la vitelogenina (VTG). Antes del inicio de la experiencia, los peces fueron separados por sexos, realizándose el sexaje mediante las características fenotípicas específicas.

El procedimiento experimental se realizó en el Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, centro registrado como establecimiento de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación y otros fines científicos cumpliendo con el Decreto 199/2005 de 20 septiembre y siguiendo en todo momento las

directrices del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Los peces se sometieron durante 2 semanas a un periodo de aclimatación en los acuarios con condiciones semejantes a las que tendrán en nuestra experiencia, es decir, pH 7 – 8; T^a del agua 26 ± 1 °C; dureza 50 – 250 mg CaCO₃. Se mantuvo un fotoperiodo durante toda la experiencia de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Durante toda su estancia los animales fueron alimentados 2 veces al día, por la mañana y por la tarde (Supervit[®] minigranulado compuesto de: pescado y subproductos de pescado, cereales, extractos de proteínas vegetales, moluscos y crustáceos, carnes y subproductos animales, levaduras, subproductos de origen vegetal, algas, aceites y grasas, sustancias minerales, vitamina A6 500 IU/kg, vitamina E 190 mg/kg, proteína bruta 48%, materias grasas brutas 8,5%, celulosa bruta 3,5%, cenizas brutas 10,5% y humedad 8%). A Continuación se pasó a una fase de pre-exposición, durante la cual, los peces fueron alimentados diariamente con *Artemia nauplii* y pienso para trucha. Esta fase duró 3 semanas.

4.2 Protocolo y diseño experimental

Una vez realizado el sexaje, los animales se introdujeron al azar machos y hembras al 50% en acuarios de 25 litros en 5 grupos alimentados con alimentos mezclados con distinta concentración de TCDD, o sea, grupo control, 10, 40, 100 y 270 ng de [³H]-TCDD/g de alimentos (ppb) respectivamente (tabla 1). Las condiciones a las que se encontraba el agua de estos acuarios era la misma a la utilizada en el periodo de aclimatación, para evitar cualquier tipo de estrés o cambio de comportamiento.

A C U A R I O	Dosis TCDD	Nº HEMBRAS	Nº MACHOS	TOTAL
1	CONTROL	12	12	24
2	10 ng	12	12	24
3	40 ng	12	12	24
4	100 ng	12	12	24
5	270 ng	12	12	24

Tabla 1. Distribución de los animales, al azar machos y hembras al 50%, en 5 grupos alimentados con alimentos mezclados con distinta concentración de TCDD, o sea, grupo control, 10, 40, 100 y 270 ng de [³H]-TCDD/g de alimentos (ppb) respectivamente.

Los experimentos se llevaron a cabo en dos fases, de pre-exposición y de exposición, y se iniciaron con 10 animales en cada grupo de exposición. Durante la fase de exposición, los peces fueron alimentados (en masa) con pienso para trucha que contenía 0 (solamente se diluyó con acetona), 10, 40, 100, ó 270 ng de [³H]-TCDD/g de alimentos (ppb) y *Artemia nauplii* durante un período de 3 semanas. Los peces fueron alimentados hasta la saciedad y, en base a la media de alimentos consumidos por los peces, recibieron una dosis aplicada que se estima en 0,08, 0,32, 0,80, ó 2,16 ng TCDD / animal / día. El consumo de alimento por pez individual no fue controlado, sin embargo, en el transcurso del experimento, ningún pez mostró ningún cambio significativo en el peso (dentro de 2 desviaciones estándar de la media), lo que sugiere que cada pez recibió una dosis similar en cada uno de los grupos de tratamiento.

El 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Sigma Aldrich®, St. Luis, EE.UU.) se le suministró a los animales mezclado con el alimento, diluido previamente el TCDD en acetona y posteriormente con el pienso, dejando evaporar la acetona de la mezcla,

basándose en el protocolo de Fernandez et al (1998) con algunas modificaciones. Este suministro de alimento se prolongó durante 3 semanas, según la Guía N° 230 OCDE.

Los acuarios contaban en su interior con un filtro interno (Eheim modelo Pick Up 2006-02[®]) que mediante un motor, aspiraba el agua y la transportaba a través de una esponja filtrante, para a continuación el agua limpia volver a ser conducida al interior de la pecera a través de un difusor ajustable; además, en cada acuario colocamos un termómetro de cristal con ventosa (Ica ka 21[®]), para controlar la temperatura, y un aireador (Sonic silent powerful 9905[®]) que consistió en un sistema que producía burbujas por medio de un motor, que distribuye de manera uniforme el oxígeno, mejorando la captación de éste por parte de los peces y facilitándoles el intercambio gaseoso (figura 2).

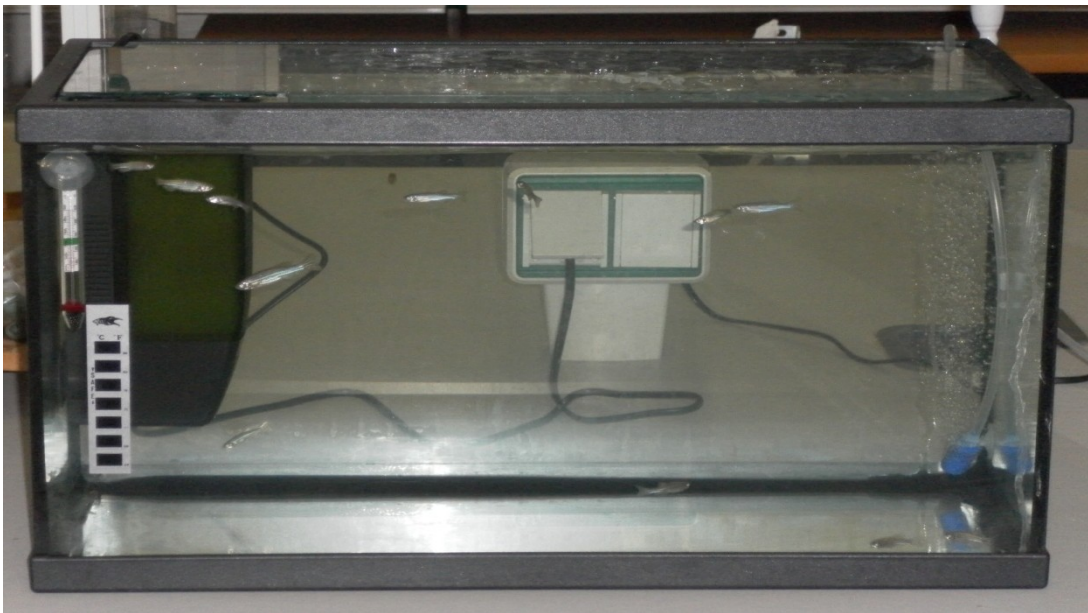


Figura 2. Acuario de 25 litros con filtro interno, difusor, termómetro y aireador. Se utilizó uno para cada lote de experimentación.

Después de las 3 semanas de exposición, todos los animales fueron eutanasiados según las recomendaciones de FELASA (Federación de Asociaciones Europeas de las

Ciencias del Animal de Laboratorio), con una solución del anestésico MS-222[®] (tricaina metano sulfonato, CAS: 886-86-2) a una concentración de 100-500 mg/l y bicarbonato sódico (NaHCO₃ CAS: 144-55-8) a una concentración de 300 mg/l para reducir la irritación de las membranas mucosas y el daño tisular que pudiera producir el MS-222. Se sexaron, se midió la longitud y se pesaron, e inmediatamente se diseccionaron 5 machos y 5 hembras de las que se extrajeron las branquias para su estudio histopatológico y morfométrico, procediéndose también a la extracción de sus gónadas para estudios complementarios.

El resto de peces, tras el sacrificio, fueron macerados por lote y por sexo para el posterior estudio de la dioxina mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masa (LC-MS/MS), y de la vitelogenina hepática (VTG) mediante un kit inmunoenzimático ELISA. El macerado del cuerpo entero de los peces se realizó con un homogeneizador (Ribolyser[®]) a 10.000 G en tubos de 1 ml con bolas de cerámica, utilizando una proporción peso del pez: volumen (50 mM Tris-HCl pH 7,4 y 1% de la proteasa inhibidora (P 8340 Sigma-Aldrich[®], MO, USA)) de 1:2. La proteasa inhibidora fue utilizada sólo en el caso de la determinación de VTG y no en la determinación de dioxina, para evitar la degradación de esta proteína. Para la determinación de la VTG, el homogeneizado fue centrifugado en la centrífuga (Eppendorf Microfuge 5404[®]) durante 20 segundos, a 3.500 revoluciones por minuto, recogiendo posteriormente el sobrenadante en tubos eppendorf. Tanto para la determinación de la dioxina como para la determinación de VTG, las muestras procedentes del homogeneizado del cuerpo entero de los peces fueron congeladas a -80°C.

4.3 Determinación de las dioxinas

El análisis de las dioxinas se llevó a cabo sobre las muestras del cuerpo de los zebrafish, que fueron descongeladas previamente a realizar determinación de los niveles de dioxinas. Paralelamente a las muestras y para cada lote se preparó:

- Blanco de reactivos: compuestos por 0,5 ml de H₂O ultrapura (miliQ), 6 ml de ácido nítrico y 1 ml de H₂O₂.
- Muestras a analizar: se tomó 1 gramo de pez homogenizado.
- Muestra adicionada a 5 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 50µl de la solución de 0,1 ppm de dioxina. Muestra adicionada a nivel de 5 ppb.
- Muestra adicionada a 10 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 10 µl de la solución de 1 ppm de dioxina. Muestra adicionada a nivel de 10 ppb.
- Muestra adicionada a 25 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 25 µl de la solución de 1 ppm de dioxina. Muestra adicionada a nivel de 25 ppb.
- Muestra adicionada a 50 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 50 µl de la solución de 1 ppm de dioxina. Muestra adicionada a nivel de 50 ppb.
- Añadir a todos los puntos de la serie de trabajo 25 µl de la solución de 1 ppm. de dioxina.

Una vez preparados el blanco y las muestras adicionadas podemos distinguir tres etapas en la realización de la detección de dioxina: extracción, purificación y detección.

a) Extracción

- Añadimos 100 μ l de tampón acetato sódico 2M pH 4,8 y 25 μ l de β -glucuronidasa a cada una de las muestras y elementos de la serie de trabajo.
- Incubamos en estufa a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ durante al menos 150 minutos.
- Enfriar, añadir 2 ml de agua reactiva tipo I, agitar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Tomar el sobrenadante.

b) Purificación

- Activar el cartucho de extracción en fase sólida de Oasis HLB con 3 ml de metanol y 3 ml de agua calidad reactiva tipo I.
- Pasar la muestra (sobrenadante) por el cartucho.
- Lavar el cartucho con 3 ml de la solución de (2% de ácido fórmico en agua) 50 %/metanol 50 %.
- Reequilibrar con 3 ml x 2 de agua calidad reactiva tipo I.
- Lavar con 3 ml de la solución (4% de hidróxido amónico) 90 %/ metanol 10 %.
- Pasar 6 ml de agua calidad reactiva tipo I (3 ml x 2).
- Secar bien con N_2 para eliminar el agua.
- Acondicionar el cartucho con NH_2 con 3 ml de metanol (1 x 3 ml).

- Acoplar los cartuchos oasis hlb reservados con los cartuchos isolute ya acondicionados (h1b sobre isolute).
 - Eluir con 3 ml de metanol (1ml
 - Evaporar los 3 ml de metanol en el TurboVap[®] y llevar a sequedad a $48 \pm 5^\circ$ C.
 - Disolver el residuo de evaporación con 200 μ l de acetonitrilo/agua (10/90) y filtrar a través del filtro de 0.45 μ m y transferirlo a viales.
- c) Detección por LC-MS/MS

El sistema cromatográfico, debe ser capaz de visualizar la solución patrón de 50 ppb con una relación señal/ruido ≥ 3 para la transición.

- Condiciones instrumentales

Cromatógrafo líquido:

- 1) Temperatura del horno de columna: 40° C.
- 2) Flujo: 0,2 ml/min.
- 3) Volumen de inyección: 20 μ l.
- 4) Fase móvil: Gradiente.

Tiempo	% A	% B
0	90	10
0,4	90	10
5	50	50
13	50	50
14	20	80
18	20	80
18,01	90	10
21	90	10

Tabla 2. Variación de los porcentajes de la solución patrón de 50 ppb con una relación señal/ruido en función de la transición en LC-MS/MS.

Analito	Voltaje de capilar	Transición	Energía de colisión
dioxina	- 108 V	227 > 132	24.0 Volts
	- 108 V	227 > 211	18.0 Volts
dioxina– d16	- 112 V	241 > 142	26.5 Volts
	- 112 V	241 > 222	20.0 Volts

Tabla 3. Variación de la energía de colisión de las moléculas en función del rango de transición en LC-MS/MS.

Condiciones del espectrómetro de masas:

- 1) Ionización negativa.
- 2) Detector 1400 V.
- 3) Gas de secado: 350 ° C.
- 4) Presión del gas de secado: 30 psi.

- 5) Presión del CID: 2-2,1 psi.
- 6) Housing: 60 ° C.
- 7) Manifold: 42 ° C.
- 8) Método de MS-MS: Se trabaja en modo MRM en un sólo segmento en las siguientes condiciones:

Se realizó una curva de calibrado correspondiente a 5, 10, 25, 50 ppb. La ecuación de la curva es $y= ax+b$. Siendo:

x = Concentración (ppb) del dioxina manteniendo fija la concentración de dioxina-d16.

y = Relación entre el área del dioxina correspondiente a la transición 227>132, y el dioxina-d16 correspondiente a la transición 241>142.

La concentración final en la muestra en el caso de dos o más replicados será la media de la concentración de los replicados debiendo tener un C.V. $\leq 2 \times 32 \%$. La concentración obtenida en la muestra, deberá estar dentro de los márgenes de la curva de calibrado.

4.4 Estudio de la vitelogenina (VTG) en los peces

Para determinar cuantitativamente la VTG se utilizó un ensayo inmunoenzimático ELISA (zebrafish vitellogenin kit ELISA[®] número V01008402, laboratorios Biosense, en Bergen, Noruega) específico para el zebrafish. Este ELISA está optimizado para el análisis de las muestras del homogeneizado del cuerpo entero, aunque también puede utilizarse en otros tipos de muestra como el plasma sanguíneo.

Para la realización de la determinación de la VTG, previamente se descongelaron los tubos eppendorf que estaban a -80° C y, que contenían el sobrenadante procedente del

macerado de los peces que habíamos realizado tras el sacrificio. Debido a la inestabilidad de la molécula de VTG, durante toda la realización de la técnica ELISA, tanto las muestras de homogeneizado de los peces como la VTG patrón, estuvieron mantenidas en hielo picado.

En la determinación de la VTG se utilizó:

- A) Una microplaca pre-tratada de 96 pocillos
- B) 2 tabletas de PBS (fosfato buffer salino)
- C) 1 tableta de PBS/Tween
- D) 2 gramos de suero bovino de albúmina (BSA)
- E) 1 vial que contiene el anticuerpo revelador
- F) 1 vial que contiene el anticuerpo secundario
- G) 1 tableta del sustrato OPD-peroxidasa
- H) 1 vial del patrón de la VTG de zebrafish

- Preparación de los buffers/reactivos

En primer lugar se preparó la dilución buffer que contenía PBS (fosfato buffer salino) y suero bovino albúmina al 1%, contenidos ambos en el kit, en un volumen de 100 ml de agua, y permaneciendo almacenado en refrigeración hasta su uso. Después se preparó el buffer lavador (PBS 0,05% Tween-20) el cual se diluyó en un volumen de 1 litro de agua destilada refrigerándolo hasta su uso.

- Preparación de las diluciones de las muestras y los patrones

1) Se realizó la solución del patrón de VTG, disolviendo el contenido de un vial de VTG patrón de zebrafish en un volumen de 1 ml de la dilución buffer (solución stock). Posteriormente se realizaron por duplicado una serie de diluciones para así

poder establecer la recta patrón. Se preparó la primera dilución de la recta patrón diluyendo 50 µl de la solución stock en un volumen apropiado de dilución buffer consiguiéndose así una solución de 125 ng de VTG de zebrafish/ml. La serie patrón incluyó 11 diluciones más, hasta finalizar con una concentración de 0,12 ng de VTG de zebrafish/ml.

2) Se hicieron las diluciones de las muestras homogeneizadas, tal y como recomendaba la técnica ELISA, dado el amplio rango de niveles de VTG encontrados en los estudios experimentales, se realizaron tres diluciones diferentes de cada muestra. Las diluciones fueron 1: 500 (añadiendo 5 µl de muestra y 2495 µl de dilución buffer), 1: 30.000 (añadiendo 10 µl de la dilución 1: 500 a 590 µl de dilución buffer) y 1: 1.800.000 (añadiendo 10 µl de la dilución 1: 30.000 a 590 µl de la dilución buffer).

La disposición del control negativo, el patrón de VTG y las muestras en la microplaca fue la siguiente (tabla 4):

La adición de las alícuotas en la placa se realizó añadiendo 100 µl de la dilución buffer a los dos pocillos control (NSB), 100 µl por duplicado de cada dilución del patrón de VTG de zebrafish, 100 µl por duplicado de cada dilución de las muestras, después se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.

NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P1	P12	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3

	Peces grupo control
	Peces hembra expuestos a 10 ng
	Peces machos expuestos a 10 ng
	Peces hembra expuestos a 40 ng
	Peces machos expuestos a 40 ng
	Peces hembra expuestos a 100 ng
	Peces machos expuestos a 100 ng
	Peces hembra expuestos a 270 ng
	Peces machos expuestos a 270 ng

Tabla 4. Disposición del control, el patrón y las muestras en las microplaca. NSB: Control S1-S11: Diluciones patrones 1-11 (0,12-125 ng/ml VTG). P1: Dilución 1:1.800.000 P2: Dilución 1:30.000 P3: Dilución 1:500

- Incubación del anticuerpo revelador

Se realizó una dilución 1: 350 del anticuerpo revelador, añadiendo 31 µl a 11 ml de la dilución buffer. A continuación, lavamos la placa 3 veces consecutivas utilizando en cada lavado 100 µl de la dilución buffer, la cual habíamos preparado al comienzo de la técnica, utilizando para ello un lavador de microplacas (Dynex ultra wash plus[®], figura 3). Por último, se añadió 100 µl de la dilución del anticuerpo revelador a todos los pocillos, tras lo cual se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.



Figura 3. Lavador de microplacas. Dynex ultra wash plus[®], utilizado en el proceso de incubación del anticuerpo revelador.

- Incubación del anticuerpo secundario

Se realizó una dilución 1: 2.000 del anticuerpo secundario añadiendo 6 μ l a 12 ml de dilución buffer. Se lavó de nuevo la placa con 300 μ l de buffer de lavado. Se añadieron 100 μ l de la dilución del anticuerpo secundario a todos los pocillos, volviendo a incubar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Visualización de la placa

Finalmente, para terminar la técnica, se preparó la solución sustrato (OPD-peroxidasa[®]), contenida en el kit. Lavamos la placa 5 veces consecutivas utilizando en cada lavado 100 μ l de la dilución buffer. A continuación, añadimos 100 μ l de la solución sustrato a todos los pocillos e incubamos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, añadimos 50 μ l de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción, y tras 5 minutos de incubación leímos la

absorbancia a 492 nm en el lector de microplacas (Asys Expert 96[®], figura 4). Se define absorbancia como la relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra



Figura 4. Imagen del lector de microplacas Asys Expert 96[®], usado para la medición de la absorbancia a 492 nm.

El lector de microplacas nos dio un valor de absorbancia por cada pocillo de la placa, y estos valores son los que, posteriormente, utilizamos para realizar los siguientes cálculos:

- Preparación de la recta patrón

Para determinar el rango de absorbancia con el que íbamos a realizar la recta patrón, tuvimos en cuenta que:

- a) El coeficiente de correlación (R^2) de nuestra recta de regresión debía ser siempre mayor de 0,990. Si el valor de (R^2) era menor de 0,990, excluimos los puntos que se salían de la recta, hasta obtener un valor de (R^2) superior a 0,990.
- b) Los puntos que se desviaban claramente de la recta de regresión, no se incluyeron, incluso si el valor de (R^2) estaba por encima de 0,990.

- c) Los puntos con valores de absorbancia que se encontraron por debajo de 0,020, no se incluyeron en la recta de regresión.
- Cálculo de las concentraciones de VTG en las muestras

Para calcular las concentraciones de VTG, sólo tomamos las diluciones con valores de absorbancia que entraban dentro de nuestro rango de trabajo de la recta patrón. Si más de una dilución de una misma muestra cumpliera este requisito, habría que calcular la media de la absorbancia de VTG de cada una y multiplicar por el correspondiente factor de dilución. El kit también recomendaba que si la media de todas las diluciones de una muestra se salían del rango de trabajo de nuestra recta patrón, esa muestra debería ser analizada de nuevo, pero no fue nuestro caso, ya que en todas las muestras que analizamos, al menos una de las 3 diluciones realizadas entraba dentro de nuestra recta patrón.

Posteriormente aplicamos la fórmula $y = ax + b$, calculándose los valores de las concentraciones que se correspondían con las absorbancia seleccionadas, obteniendo así la concentración de VTG de cada muestra correspondiente a un acuario expuesto a una determinada concentración de dioxinas.

4.5 Estudio histopatológico estructural y ultraestructural

Tras el sacrificio, las branquias de 5 machos y 5 hembras de cada lote al azar, se incluyeron para estudiar la histopatología al microscopio óptico y la morfometría, así como el estudio histopatológico mediante microscopía electrónica y morfométrica (figura 14).

4.5.1 Microscopio óptico

Las muestras de las branquias seleccionadas fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10% a temperatura ambiente, se deshidrataron en escala ascendente de etanol y fueron incluidos en parafina.

Las primeras secciones de cada bloque (4 μm) fueron teñidas con hematoxilina/eosina para su estudio morfométrico e histopatológico. Los cortes fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio Leitz Ortholux.

4.5.2 Microscopio electrónico

Pequeñas muestras de las branquias fueron fijadas en glutaldehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) a 4 °C durante toda la noche y, posteriormente refijadas en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7.4) durante 30 minutos. Después de la deshidratación en escala ascendente de alcoholes e inclusión en Araldita, los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes para el estudio ultraestructural fueron estudiados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

Procedimientos morfométricos y estereológicos

El estudio cuantitativo se llevó a cabo mediante un sistema de análisis de imagen constituido por un microscopio triocular Leitz Ortholux conectado con un sistema informático digitalizador de imágenes por medio de una cámara de vídeo SONY SSC-C370P® y utilizando el programa informático Visilog 5®.

Los cortes histológicos de cada espécimen fueron muestreados de forma sistemática para seleccionar las imágenes microscópicas que fueron digitalizadas con objetivos de 10x (N.A. 0,25) y 40x (N.A. 0,70). En cada sección se capturaron una media de 7 campos, lo que

teniendo en cuenta el número medio de secciones por animal (4), contabilizaron una media de 28 campos capturados de branquias (figura 5).

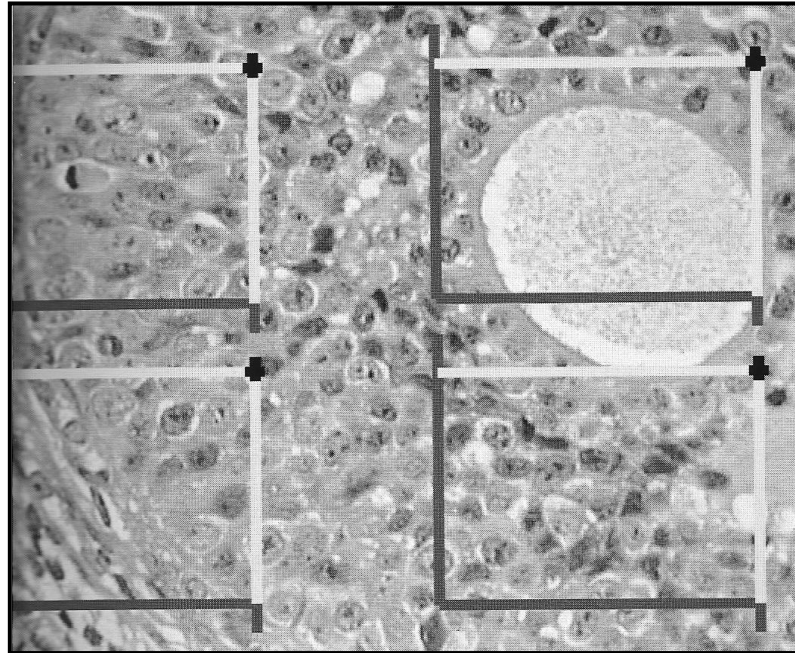


Figura 5. Imagen de un corte histológico en la que se ha superpuesto una plantilla con cuatro áreas test usada para la estimación de la densidad numérica. Sólo se cuentan aquellos núcleos cuyos perfiles caen dentro de las áreas test y no son afectados por las líneas prohibidas (negras).

Estimaciones morfométricas nucleares

Los parámetros morfométricos incluyeron datos sobre el tamaño de los núcleos de las poblaciones celulares de interés (figura 6). Las estimaciones se realizaron trazando los perfiles de los núcleos a estudiar mediante el cursor del sistema de análisis. Los datos morfométricos comprendieron los valores sobre los diámetros máximo, mínimo y medio, así como los factores de forma siguientes:

FFELL (*diámetro mínimo / diámetro máximo*) con los valores de 1,00 para el círculo y < 1,00 para las estructuras elípticas.

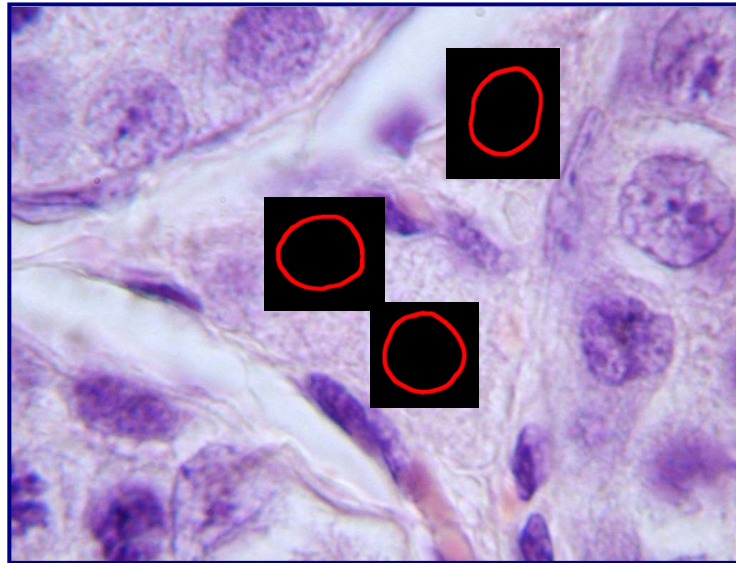


Figura 6. Imagen de un corte histológico en el que la estimación de los parámetros morfométricos requirió que contorneáramos la silueta de la estructura en cuestión con el puntero del ordenador.

4.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI[®]), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD (diferencia significativa mínima) de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media \pm desviación típica y un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

5. Resultados

Tras las 3 semanas de exposición a la dioxina, todos los peces presentaban un aspecto externo normal, no mostraron variaciones en su tamaño, no se observaron cambios en el comportamiento natatorio ni en la ingesta de la comida. No se produjo mortalidad en ninguno de los acuarios, de la misma forma que no existieron diferencias significativas en los valores medios de peso y longitud de los peces al terminar la experiencia.

Las concentraciones de dioxina en el alimento de los diferentes lotes se mantuvieron constantes durante toda la experiencia.

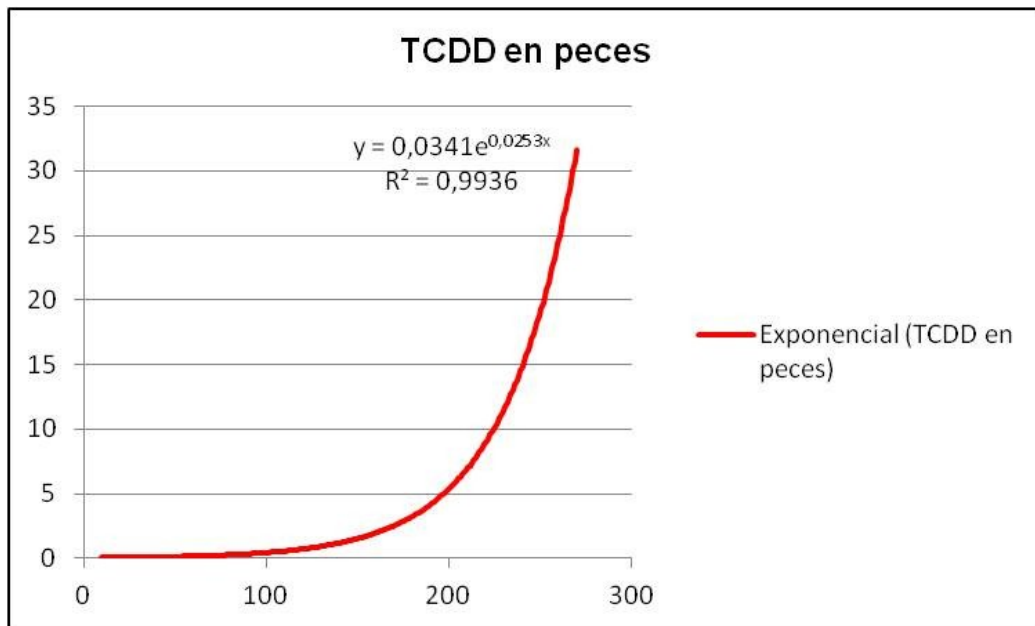
5.1 Determinación de dioxina en los peces

Los valores de dioxina obtenidos en los peces aparecen recogidas en la tabla 5 donde se muestran los niveles obtenidos para cada lote.

Concentración dioxina en el alimento (ng/g de alimento)	Nº peces	Concentración TCDD en los peces (ng/g)
CONTROL	6	nd
10 ng/g TCDD	6	0,0465±0,005
40 ng/g TCDD	6	0,071±0,0152
100 ng/g TCDD	6	0,57±0,0340
270 ng/g TCDD	6	29,5617±4,076

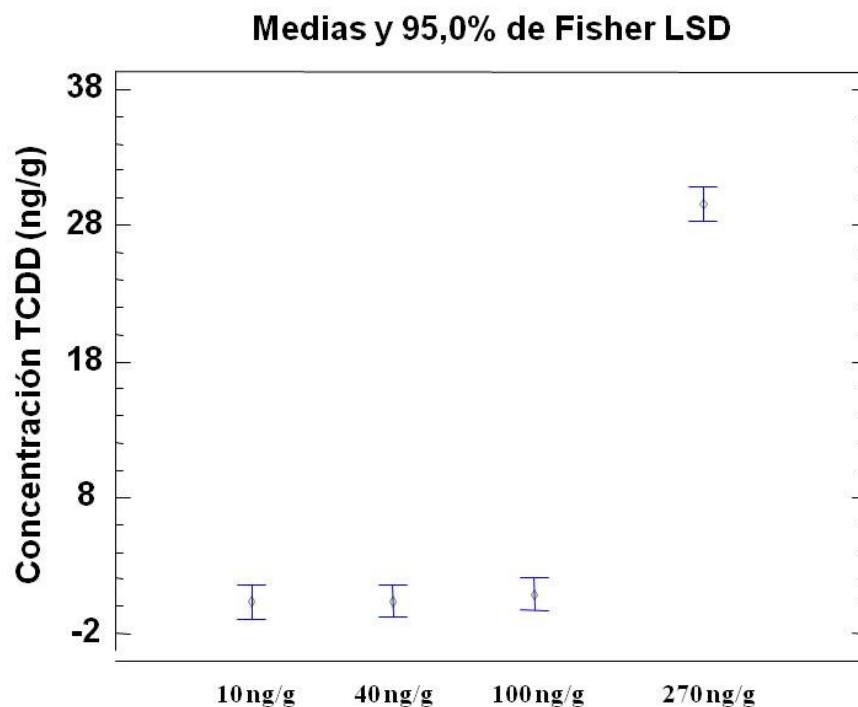
Tabla 5. Medias y desviaciones típicas de las diferentes concentraciones de dioxina en los zebrafish expuestos a las distintas concentraciones en el alimento. nd: no detectable

En los peces expuestos se obtuvieron valores de dioxina frente al lote control en el que no se detectó presencia del mismo. Los valores obtenidos de dioxina en los peces están correlacionados con la concentración de dioxina en el alimento de la dieta. La función que mejor los representa es una exponencial cuya fórmula está incluida en la representación gráfica (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de regresión de las medias obtenidas de las respectivas concentraciones de dioxina. La función que mejor los representa es una exponencial cuya fórmula está incluida en la representación gráfica.

Existe una correlación entre los niveles de dioxina determinados en los peces, y la concentración de dioxina a la que fueron expuestos (Gráfica 2)



Gráfica 2. Medias de las diferentes concentraciones de dioxina en el alimento. Existe una correlación entre los niveles de dioxina determinados en los peces, y la concentración de dioxina a la que fueron expuestos

Al realizar la prueba F en la tabla ANOVA, obtenemos un valor de $p < 0,05$, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un nivel del 95 % de confianza (Gráfica 2).

Al realizar la comparación múltiple entre los distintos lotes, observamos que no existen diferencias significativas al comparar entre sí los lotes 10, 40 y 100 ng/g de dioxina, mientras que sí existían diferencias estadísticamente significativas de cada uno de ellos al compararlo con el último lote de estudio (270 ng/g). Además existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 lotes tratados y el lote control (Tabla 6).

	Control	Lote 10 ng/g	Lote 40 ng/g	Lote 100 ng/g	Lote 270 ng/g
Control		*	*	*	*
Lote 10 ng/g	*		ns	ns	*
Lote 40 ng/g	*	ns		ns	*
Lote 100 ng/g	*	ns	ns		*
Lote 270 ng/g	*	*	*	*	

Tabla 6. Comparación múltiple entre los diferentes lotes de estudio y significación de las mismas. ns: diferencias no significativas al comparar ambos lotes; *: diferencias significativas al comparar ambos lotes

5.2 Determinación de vitelogenina (VTG) en los peces

Al realizar la lectura de la placa del kit en el lector, nos proporcionó una imagen (figura 7) que se tradujo en unos valores de absorbancia por pocillo.

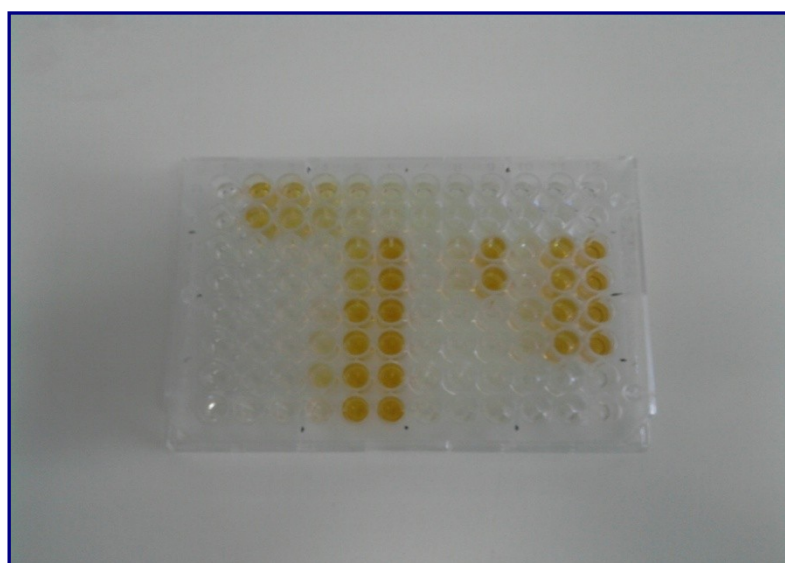
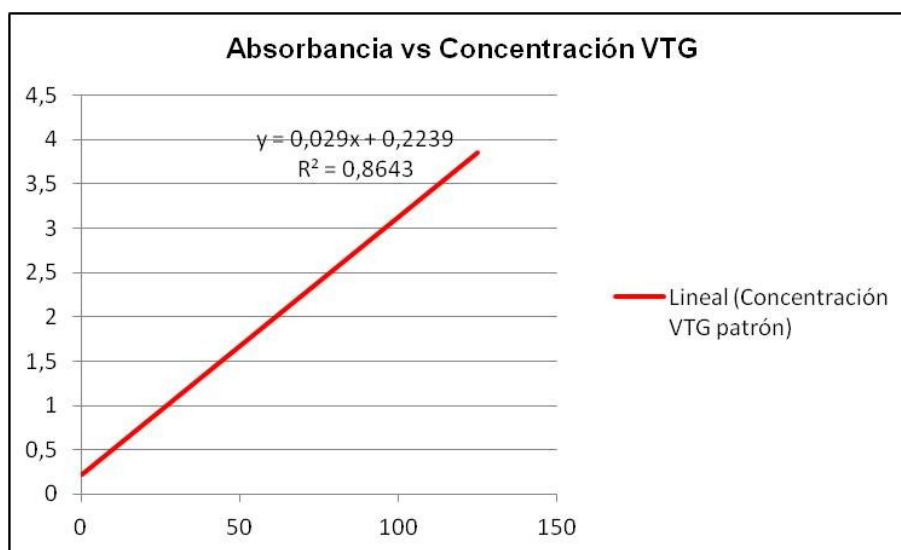


Figura 7. Imagen de la placa del kit ELISA. Se observan los pocillos, de donde se medirá la absorbancia y determinar las concentraciones de VTG.

Para realizar el cálculo de las concentraciones de VTG en las muestras, en primer lugar tomamos los datos de absorbancia obtenidos de los pocillos S1-S11 de la microplaca y calculamos la concentración (tabla 7) para así poder realizar la recta patrón del análisis (Gráfica 3).

ABSORBANCIA										
3,196	3,002	1,755	0,873	0,434	0,224	0,1	0,051	0,027	0,008	0,04
125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24	0,12
CONCENTRACIÓN VTG PATRÓN (ng/g)										

Tabla 7. Concentración de VTG patrón y sus correspondientes valores de absorbancia, tomados desde los pocillos del kit ELISA.



Gráfica 3. Representación de la recta de regresión patrón, según se desprende de la tabla de absorbancia (concentración vs absorbancia).

Las concentraciones obtenidas de VTG de las muestras de peces, se obtuvieron tomando los valores de la absorbancia de la microplaca que se hallaron mediante la

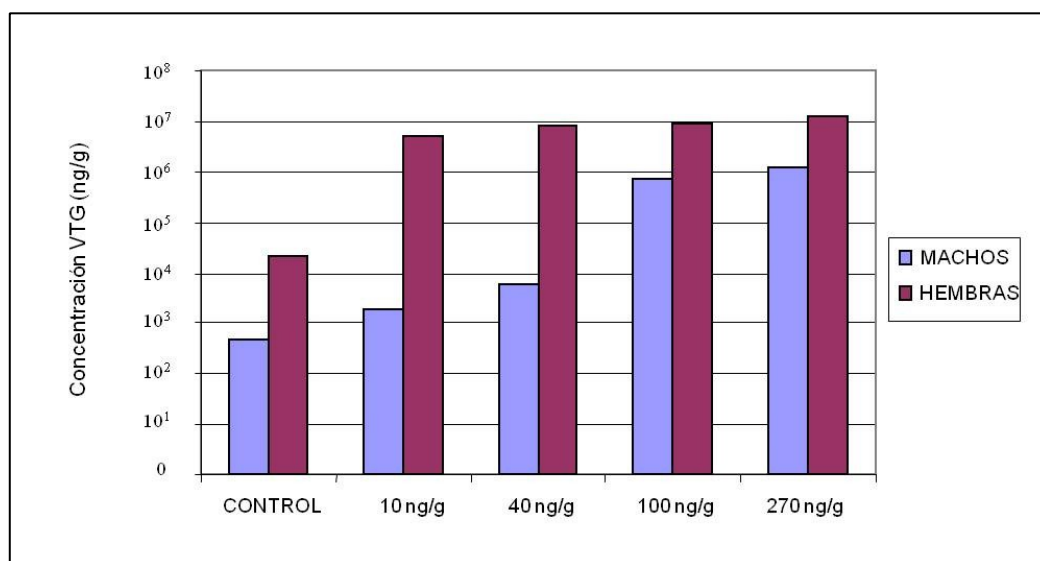
ecuación que aparece en la recta patrón ($y=ax+b$) ($y=0,029x+0,2239$, donde y =valor de absorbancia; x = concentración de VTG (ng/g)), aplicando ésta obtuvimos los valores de concentración de VTG en las muestras de peces según sexo y concentración de TCDD en el alimento a la que habían sido expuestos (tabla 8).

LOTE	CONCENTRACIÓN VTG (ng/g)	
	MACHOS	HEMBRAS
Control	446,42	21.133,93
10 ng/g TCDD	1.875,00	4.676.785,60
40 ng/g TCDD	5.892,85	8.308.928,50
100 ng/g TCDD	755.357,04	9.321.428,50
270 ng/g TCDD	1.189.285,60	11.925.000,00

Tabla 8. Concentración de VTG (ng/g) según sexo del pez en función de la concentración de dioxina a la que han sido expuestos los peces con el alimento.

Al comparar machos y hembras (Gráfica 4) podemos observar como en ambos sexos se produce un incremento de la concentración de VTG a medida que aumenta la concentración de dioxina a la que están expuestos los peces. Si comparamos ambos sexos, los valores de VTG son mayores en las hembras que en los machos tanto en el control como en los diferentes lotes de exposición. Como puede observarse, en los machos se produce un gran aumento de la concentración de VTG en relación al grupo control (446,42 ng/g), en el lote expuesto a dosis de 100 ng/g de dioxina, donde la concentración alcanza unos valores de 755.357,04, mientras que a dosis de 270 ng/g de dioxina obtuvimos unos valores de concentración superiores a 10^6 (1.189.000,00 ng/g). Sin embargo, en las hembras, existe un aumento considerable de la concentración de VTG en todos los lotes de

estudio, en relación al control, alcanzándose un valor máximo a la dosis de exposición de 270 ng/g superior a 10^7 (11.925.000,00 ng/g VTG).



Gráfica 4. Comparación de las concentraciones de VTG en machos y hembras según la concentración de TCDD en el alimento. En ambos sexos se produce un incremento de la concentración de VTG a medida que aumenta la concentración de dioxina a la que están expuestos los peces.

5.3 Estudio histopatológico

Lote control.

Dentro de la estructura de las branquias, se considera como unidad morfológica y funcional, por una parte, el filamento (o lamela primaria) y por otro las lamelas (o lamelas secundarias). Ambos elementos están revestidos por un epitelio, pero éste se diferencia por el grosor del mismo y el tipo de sus células. Este hecho es fundamental para identificar y diferenciar las lamelas y los filamentos básicos.

La morfología que se obtiene en las lamelas, utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM), es de una estructura laminar que muestra una superficie irregular, con unos surcos grandes e irregulares, en tanto que en los filamentos de las espinas branquiales, junto a las protuberancias celulares y de las yemas, su superficie muestra a grandes aumentos, unos surcos regulares a modo de huellas dactilares (Fig. 8, B).

La diferencia de ambas superficies, se detecta al microscopio electrónico de transmisión (TEM), ya que las lamelas se encuentran revestidas por un epitelio simple plano, que muestra unos surcos longitudinales, escasos, delgados e irregulares. En tanto que la superficie de la zona de la espina branquial, esta revestida por un epitelio multiseriado, el cual está revestido por una hilera de células entre planas a cúbicas, y cuya característica es la presentación de unas pequeñas espículas cónicas, que sobresalen a la superficie y son las responsables de las imágenes a modo de huella dactilar que se aprecia en el SEM.

La morfología que hemos observado en las lamelas, utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM), es de una estructura laminar que muestra una superficie irregular, con unos surcos grandes e irregulares, en tanto que en los filamentos de las espinas branquiales, junto a las protuberancias celulares y de las yemas, su superficie se muestra a grandes aumentos, con unos surcos regulares a modo de huellas dactilares (Fig.9,B). La diferencia de ambas superficies, la evidenciamos al microscopio electrónico de transmisión (TEM), ya que las lamelas se encuentran revestidas por un epitelio simple plano, mostrando unos surcos longitudinales, escasos, delgados e irregulares (Fig.9, C). En tanto que la superficie de la zona de la espina branquial, presenta un revestimiento de un epitelio multiseriado, en el cual se evidencia que está revestido, a su vez, por una hilera de células entre planas a cúbicas, y cuya característica es la presentación de unas pequeñas espículas cónicas, que sobresalen a la superficie y son las responsables de las imágenes a modo de huella dactilar que se aprecia en el SEM.

En este grupo, en las imágenes obtenidas con el microscopio óptico (MO) de las branquias respiratorias, observamos una espina central y a ambos lados de ella numerosas lamelas respiratorias, que presenta un control de capilares y todas las células funcionales y de revestimiento (Fig.8,A). Observamos una imagen muy tradicional de las lamelas respiratorias, utilizando el SEM, ya que del cuerpo central espinoso, se proyectan unas protuberancias laminares, con una superficie irregular (Fig.8, B). Y finalmente, los estudios realizados con el TEM, muestran una lamela alargada, con un revestimiento formado por células aplanadas, encerrando una hilera de capilares, con sus correspondientes células endoteliales (Fig.8,C), separadas por la cavidad interna las células de los pilares, y en las zonas más basales se observan las células del cloro y las células mucosas.

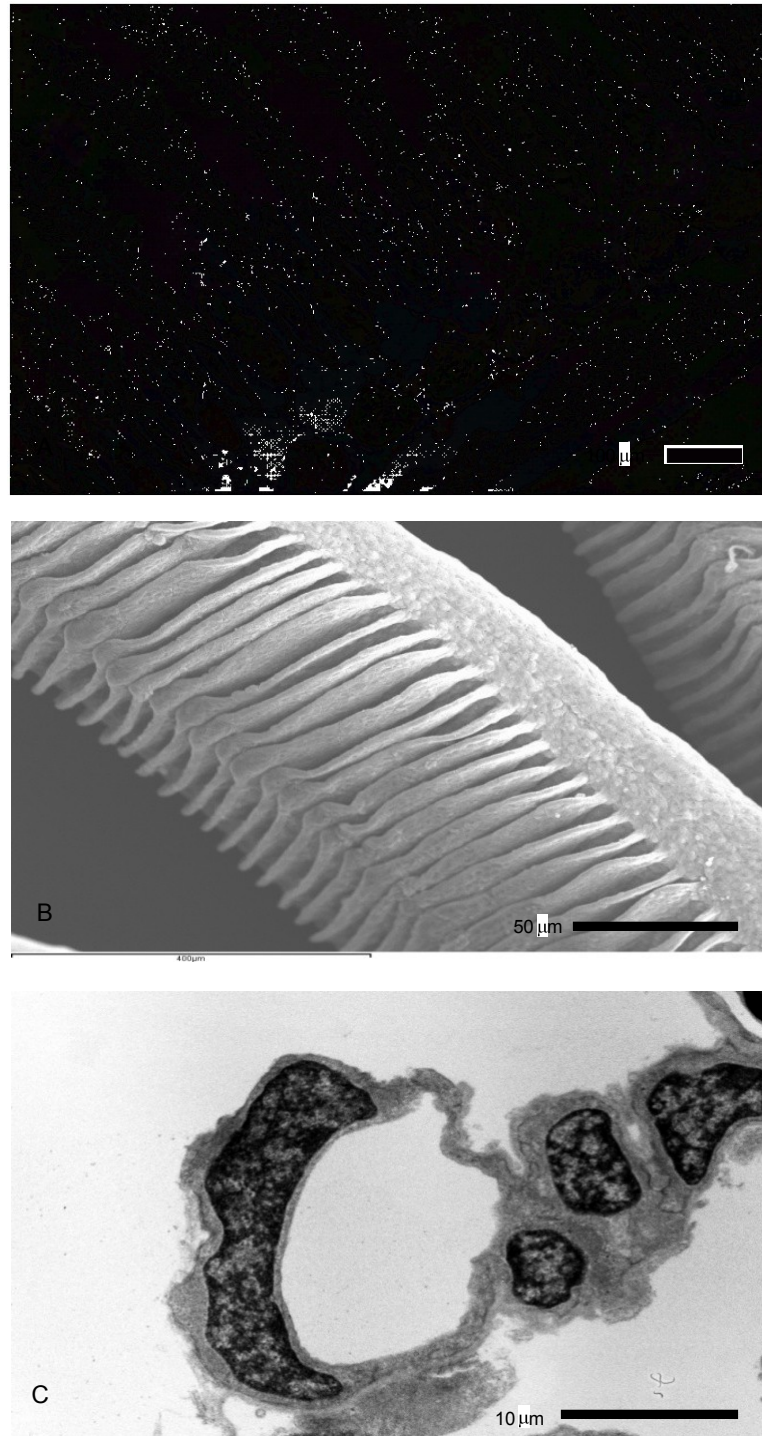


Figura 8. Lote control de branquia respiratoria: (A) Detalle de branquias mostrando la zona respiratoria al MO. (B) Detalle de lamelas primarias y respiratorias al SEM. (C) Detalle de lamela respiratoria mostrando capilares al TEM.

Los filamentos de las espinas branquiales, de las branquias sensibles, son complejos, debido a las funciones que recaen en estas finas protuberancias. Por una parte juega un importante papel en la protección de estos componentes, también protegen por las células mucosas que poseen, regulan las concentraciones iónicas, y finalmente es una zona neurosensible por los neuroepitelios que tienen. Para realizar una protección, fundamentalmente mecánica, desarrollan un epitelio multiseriado, donde se mezclan células de revestimiento y mucosas, y en contacto con la superficie diferencian una hilera de células planas a cúbicas, que muestran las pequeñas espinas cónicas. Participan en la regulación iónica con las células del cloro, y es una zona sensible al desarrollar las yemas sensitivas, que poseen un neuroepitelio muy especializado.

En los filamentos de las espinas branquiales, de las branquias sensibles, se observa el desarrollo de un epitelio multiseriado, donde se diferencian células de revestimiento y mucosas, que se puede pensar que realiza una protección, fundamentalmente mecánica. En contacto con la superficie diferencian una hilera de células planas a cúbicas, que muestran las pequeñas espinas cónicas (Fig.9.A).

Las yemas gustativas se observan, utilizando el MO, como un barril, teniendo una base ancha y estrechándose hacia la parte apical, contactando con la superficie del epitelio de revestimiento (Fig.9.A). En contacto con la luz aparecen los bordes formados por células alargadas, con prolongaciones finas, y su luz está cerrada por células cuboides, entre las que se aprecian estructuras digitiformes, que conectan con las células del neuroepitelio. Al TEM, las células neuroepiteliales aparecen con formas aplanadas, con un núcleo polarizado, y en el polo contrario se destacan vesículas de retículo endoplásmico liso, que terminan dilatándose y formando gránulos grandes ovoides a esféricos, con un contenido homogéneo y de mediana densidad electrónica, y en su centro se destaca un corpúsculo pequeño y muy denso a los electrones. Estas células se presentan rodeadas y protegidas

por células de teloglia, destacándose las microuniones entre las células nerviosas y la teloglia (Fig.9.C).

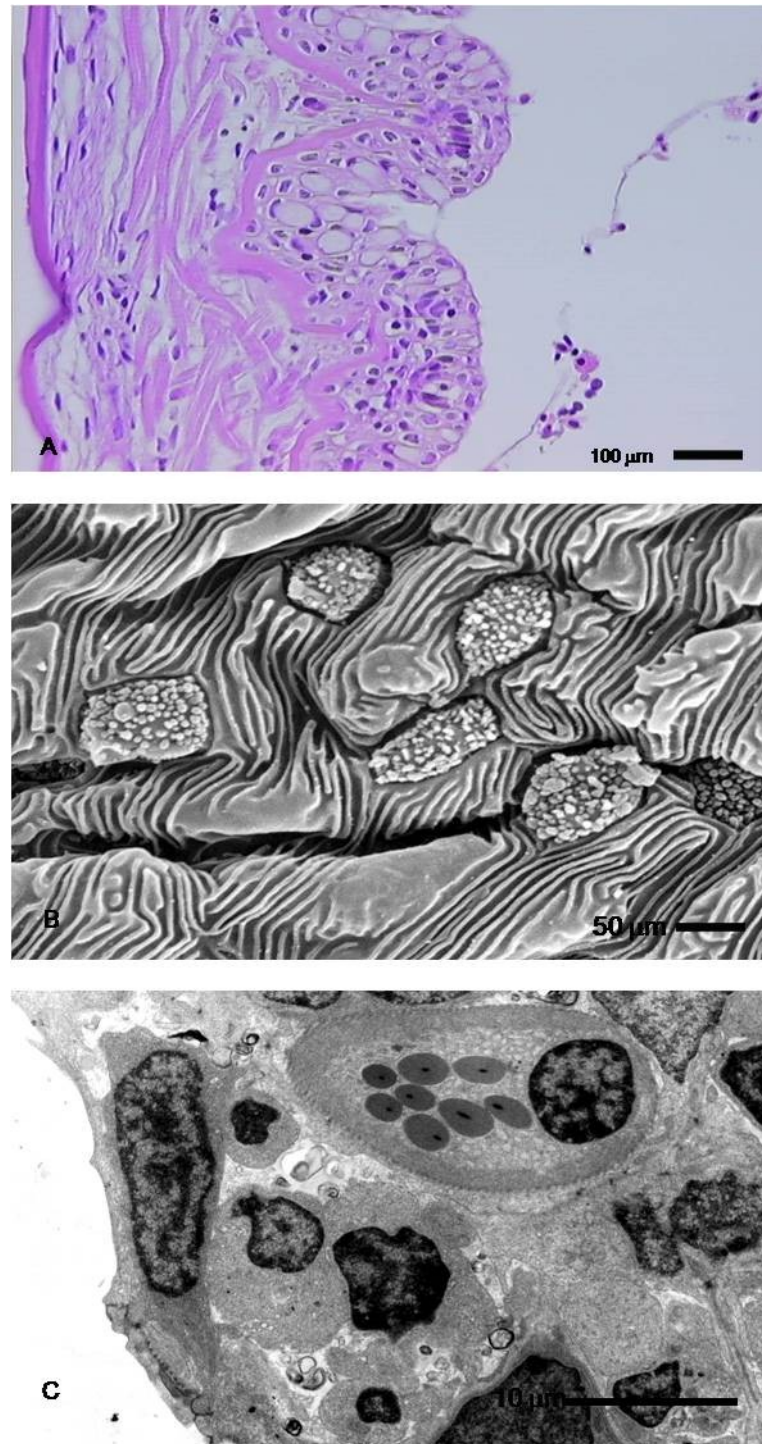


Figura 9. Lote control de branquia sensitiva: (A) Detalle de Branquiespina donde presenta varias yemas sensitivas al MO. (B) Detalle de superficie con pliegues epiteliales y zonas de salida de yemas sensitivas al SEM. (C) Detalle al TEM de yema sensitiva donde se aprecian células de teloglía y neurosensitivas.

Lote 1°.

En el lote N° 1, o sea, el de animales tratados con 10 ng/g de alimento de TCDD, identificamos el arco branquial que posee:

Un núcleo central de tejido mesodérmico cubierto por tejido ectodérmico (externo), y revestido por tejido endodérmico (interno).

Un arco aórtico que corre alrededor de la faringe primitiva hacia la aorta dorsal.

Un bastón cartilaginoso, que forma el esqueleto del arco, que deriva de las células de la cresta neural.

Un componente muscular que formarán los músculos de la cabeza y al cuello.

Un componente nervioso, cuyo nervio deriva del neuroectodermo del encéfalo primitivo, que inerva la mucosa y músculos derivados del arco.

El mesoderma original de los arcos forma los músculos de la cara y el cuello. De tal manera, cada arco branquial se caracteriza por poseer sus propios componentes musculares, los cuales conducen su propio nervio, y cualquiera que sea el sitio al que emigren las células musculares llevará consigo su componente nervioso craneal. Asimismo, cada arco posee su propio componente arterial.

Las yemas gustativas, al igual que en lote control, se observan utilizando el MO, con la misma forma de barril, con la base ancha y estrechándose hacia la luz, contactando con la superficie del epitelio de revestimiento. En contacto con la luz aparecen los bordes formados por células alargadas, con prolongaciones finas, y su luz también está cerrada por células cuboides, entre las que se aprecian las mismas estructuras digitiformes, que conectan con

las células del neuroepitelio (Fig.11. A). Al TEM, la imagen es similar a la del lote control, donde las células neuroepiteliales aparecen con formas aplanadas, con el núcleo polarizado, y en el polo contrario destacan vesículas de retículo endoplásmico liso, que también forman gránulos grandes ovoides a esféricos, con un contenido homogéneo y de mediana densidad electrónica que presentan los gránulos del lote control, y en su centro se destaca un corpúsculo pequeño y muy denso a los electrones. Estas células se presentan rodeadas y protegidas por células de teloglía, destacándose las microuniones entre las células nerviosas y la teloglía (Fig.11.C).

Los peces del grupo 1° no mostraron alteraciones en ninguna de las muestras estudiadas. En las branquias no se observaron modificaciones de la estructura branquial, tanto al microscopio óptico (MO), como al microscopio electrónico (ME). Pudimos comprobar que la morfología de los filamentos y de las lamelas mostraba un tejido respiratorio normal, con las luces de los capilares dilatados y con sus envueltas aparentes en todos los peces del grupo 1 evaluados (Fig.10).

Las branquias presentaban un aspecto similar al de los grupos control, excepto zonas hiperémicas aisladas.

Al MO se apreció en las branquias una estructura similar al grupo control en los componentes esqueléticos cartilagosos del arco branquial, presentando un amplio desarrollo de los filamentos branquiales y lamelas, con una morfología aparentemente normal, salvo algunas zonas escasas con hiperémicas y edematosas. Las células de revestimientos eran continuas y planas, destacándose las células de los pilares y las lagunillas. Las células del cloro mantenían sus abundantes mitocondrias y apenas se presentaban células mucosas.

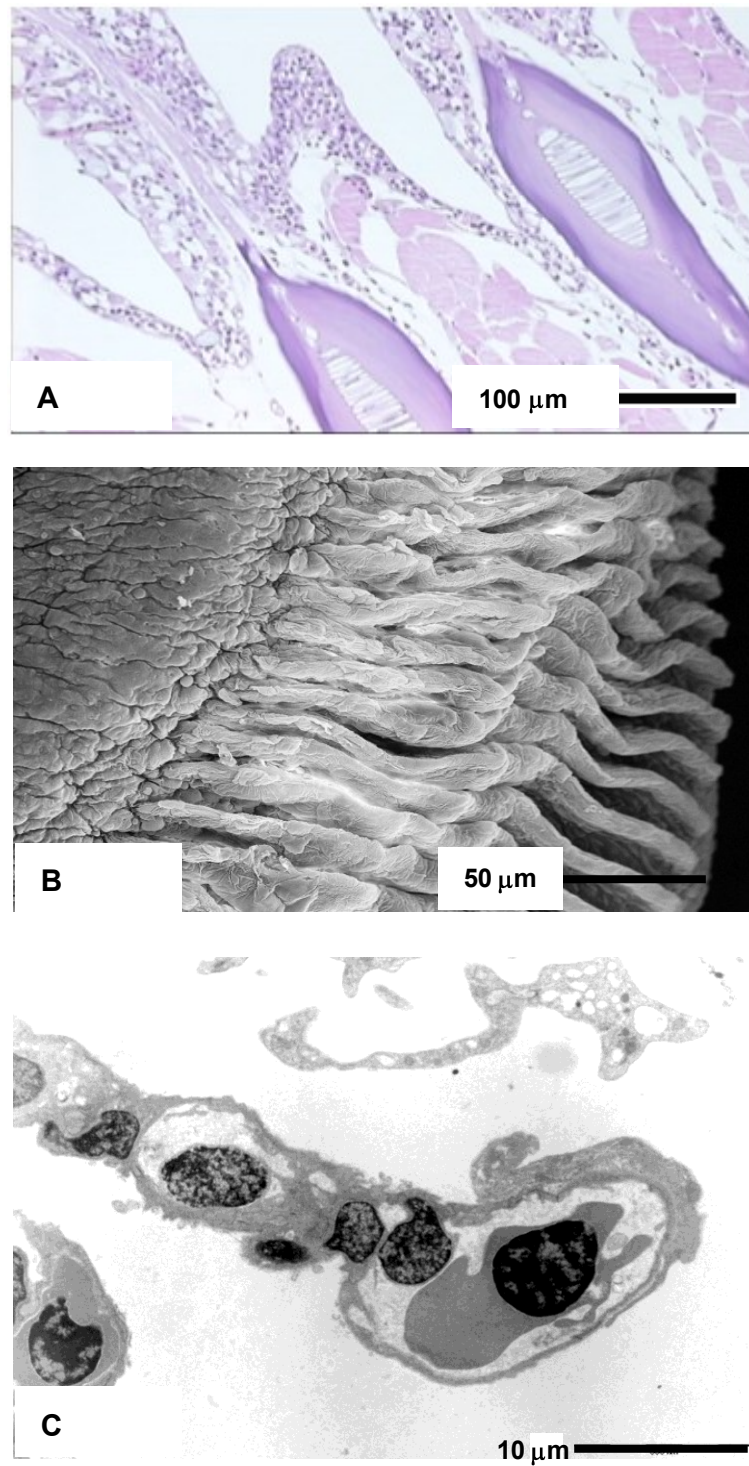


Figura 10. Branquias respiratorias del lote 1 (10 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de branquia respiratoria con tumefacción y cierto grado de hiperemia al MO. (B) Detalle al SEM de las lamelas respiratorias en la que se observa que mantienen su estructura. (C) Detalle al TEM de lamela respiratoria que presenta abundantes capilares.

En los filamentos de las espinas branquiales, de las branquias sensibles, al igual que en el lote anterior, se observa el desarrollo de un epitelio multiseriado, diferenciándose células de revestimiento y mucosas, intuyéndose una protección por parte de estas células, fundamentalmente mecánica. En contacto con la superficie, también, diferencian una hilera de células planas a cúbicas, que muestran las pequeñas espinas cónicas.

Con el SEM observamos que en la superficie de las lamelas existía una mayor presencia de componentes celulares a medida que avanzábamos en los lotes; siendo solo unas pequeñas bridas en la superficie en este primer lote.

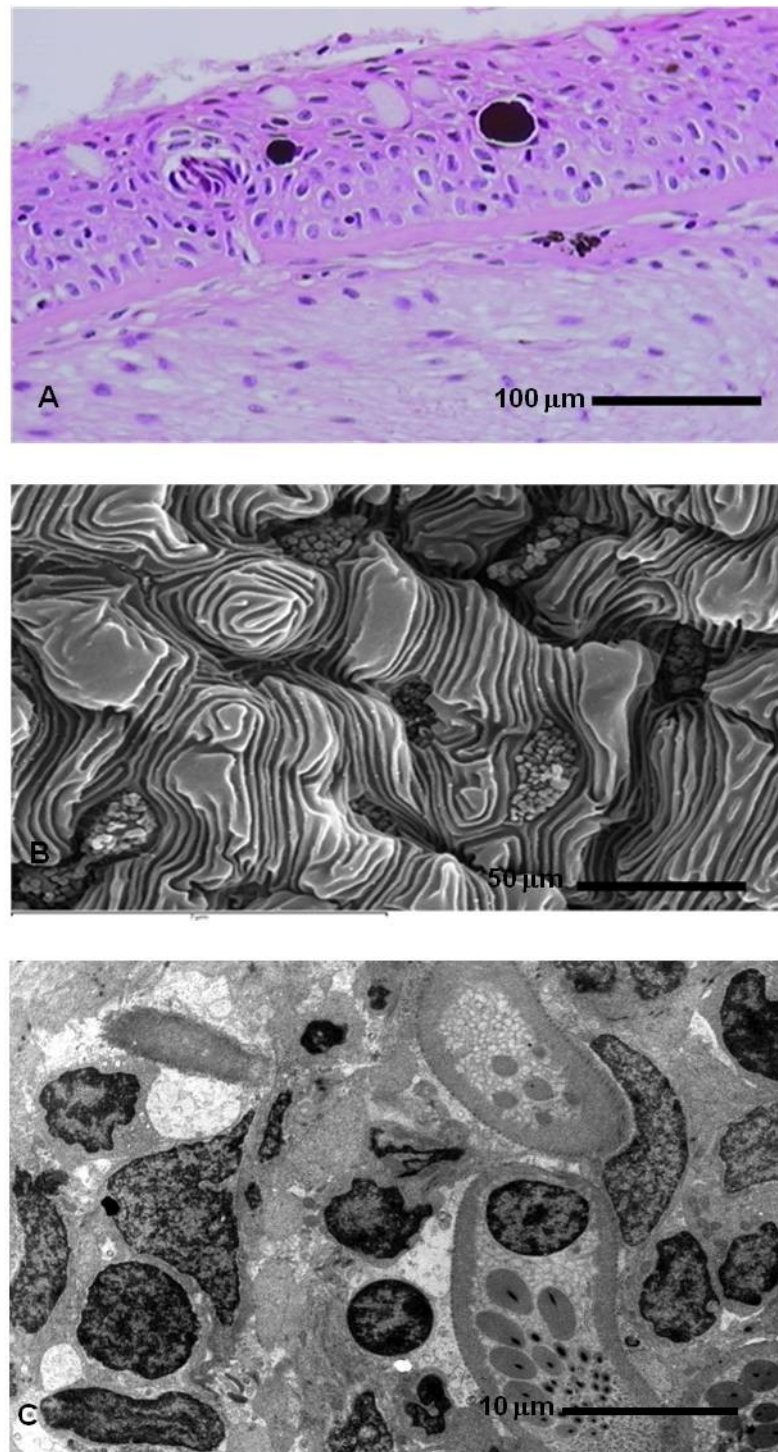


Figura 11. Branquia sensitiva del lote 1 (10 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de Branquiespina donde presenta varias yemas sensitivas al MO. (B) Detalle de superficie con pliegues epiteliales y zonas de salida de yemas sensitivas al SEM. (C) Detalle al TEM de yema sensitiva donde se aprecian células de teloglia y neurosensitivas.

Lote 2°.

En el tejido branquial se describió una leve hiperemia capilar y edema, siendo todos sus componentes celulares aparentemente modificados.

Con el MO, a nivel branquial, tanto los filamentos como las lamelas primarias, se evidenciaron tumefactas, presentando interdigitaciones que se disponían a modo de mosaico. También se describió hiperemia activa generalizada con numerosas células de naturaleza exudativa e inflamatoria y abundantes zonas hemorrágicas (Fig.12.A). La tumefacción y desorganización de las lamelas, así como la presencia de células inflamatorias y hemorrágicas se detectó mayoritariamente en el SEM (Fig.12.B). No obstante, las lesiones más importantes se apreciaron con el TEM, pudiendo observarse tumefacciones capilares con hiperemia y ligera desorganización de los componentes que forman la barrera respiratoria (Fig.12.C).

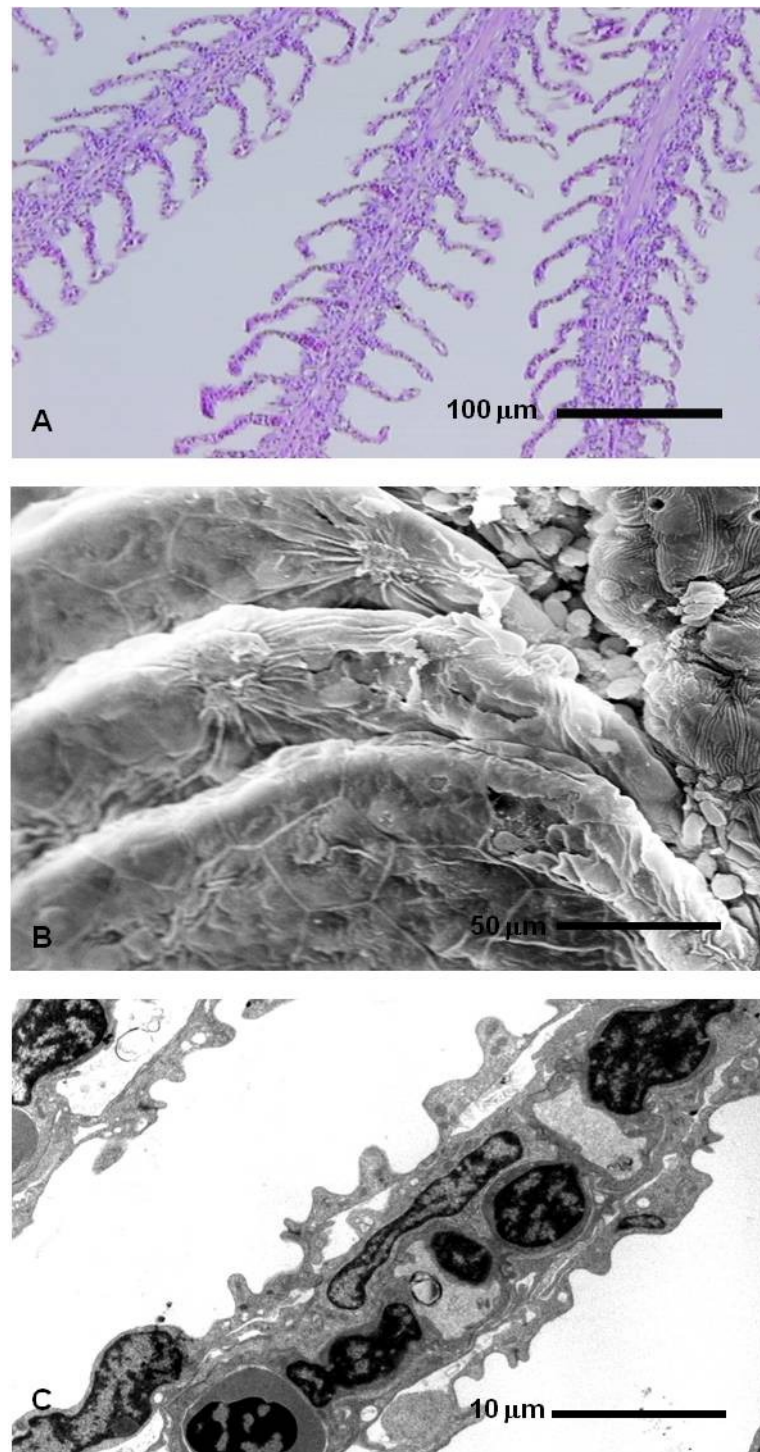


Figura 12. Branquia respiratoria del lote 2 (40 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de lamela primaria y secundaria al MO donde se muestra cierto grado de hiperemia. (B) Detalle al SEM de lamelas respiratorias tumefactas. (C) Detalle al TEM de lamela respiratoria con cierto grado de hiperemia.

En el estudio histopatológico de los filamentos espinobranquiales o lamelas primarias se observó que, en los lotes primeros, las células epiteliales de revestimiento, eran aplanadas y revestían toda la superficie, con citoplasma basófilo (Fig.13.A). También las yemas gustativas eran aparentemente normales, y las células caliciformes tenían una morfología entre ovoide a esférica, y se encontraban en las proximidades de las células de revestimiento; en esta zona las células predominantes eran las células del cloro, que se localizaban en hilera, en la zona más basal del epitelio eran células esféricas ampulosas y grandes, con un núcleo central y un citoplasma muy acidófilo. En las imágenes obtenidas al MO (Fig.13.A) y SEM, solo se detectaba un leve edema por toda su superficie (Fig.13.B).

Al TEM, analizando las muestras de los dos primeros lotes, la morfología de todas las células, era aparentemente normal, destacándose las espículas dactilares de las células epiteliales de revestimiento, las yemas gustativas y las células mucosas, pero se encontraban alteraciones, y sobre todo en las células del cloro, modificando su morfología, dilatando el canal intracelular y perdiendo parcialmente las mitocondrias y los restantes organoides citoplasmáticos (Fig.13.C).

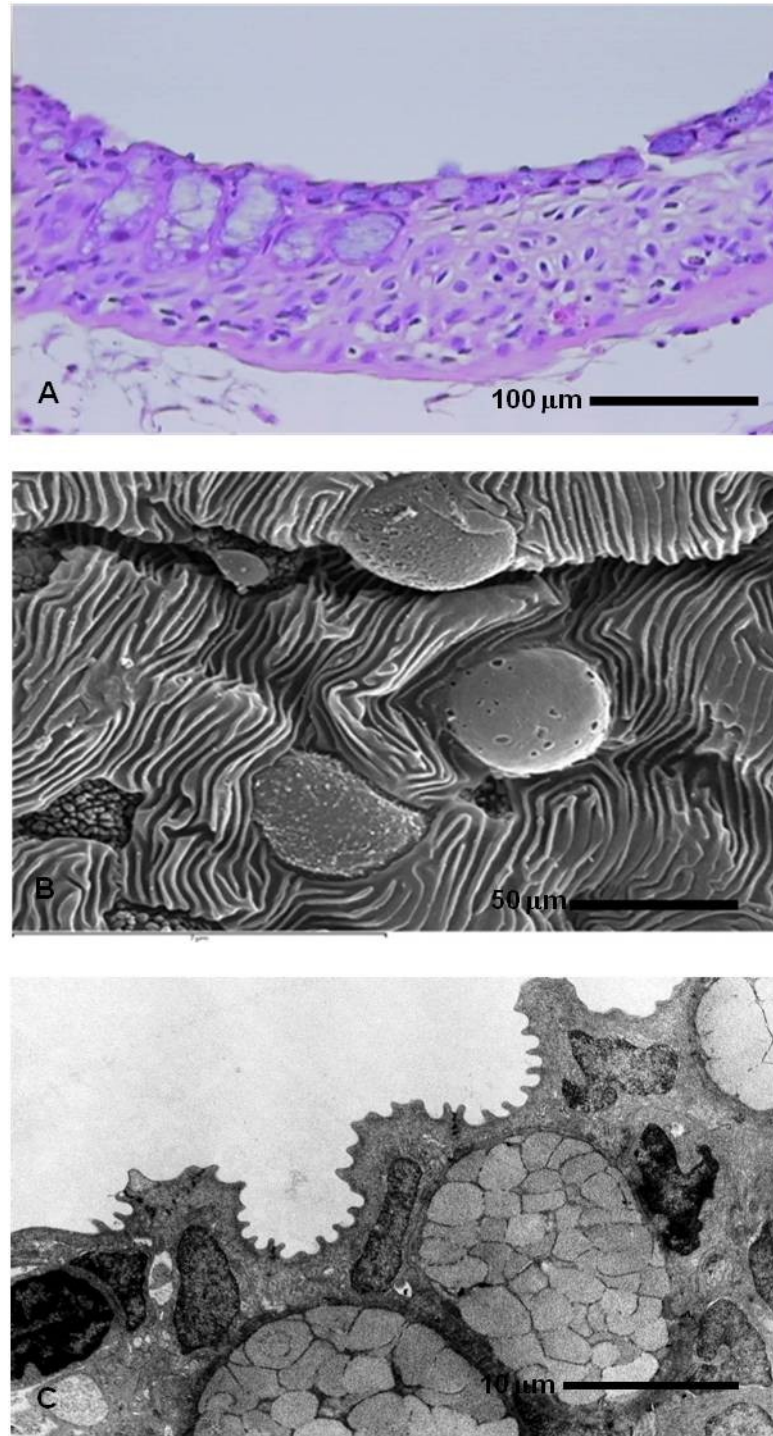


Figura 13. Branquia sensitiva del lote 2 (40 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle de la branquiespina al MO donde se aprecia un aumento de células mucosas. (B) Detalles al SEM de los surcos epiteliales donde aparecen superficies de células mucosas. (C) Detalle de branquiespina al TEM donde se aprecian células epiteliales y aumento de células mucosas con gran actividad.

Lote 3°.

Con el MO, a nivel branquial, tanto los filamentos como las lamelas primarias, se evidenciaron tumefactas, presentando interdigitaciones que se disponían a modo de mosaico. También se describió hiperemia activa generalizada con numerosas células de naturaleza exudativa e inflamatoria y abundantes zonas hemorrágicas (Fig.14.A). La tumefacción y desorganización de las lamelas, así como la presencia de células inflamatorias y hemorrágicas se detectó mayoritariamente en el SEM (Fig.14.B). No obstante, las lesiones más importantes se apreciaron con el TEM, pudiendo observarse tumefacciones capilares con hiperemia y ligera desorganización de los componentes que forman la barrera respiratoria (Fig.14.C).

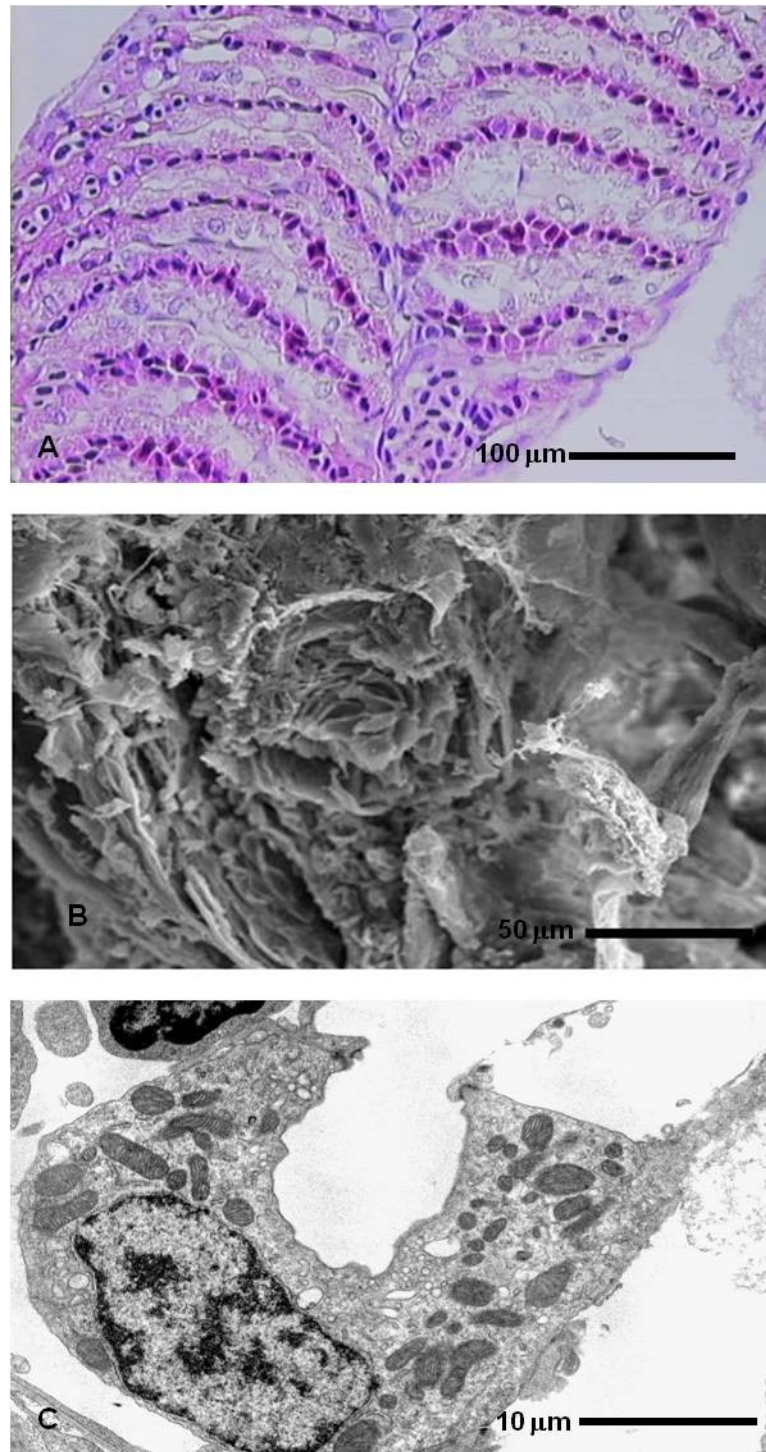


Figura 14. Branquia respiratoria del lote 3 (100 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de lamela respiratoria dispuesta a modo de mosaico por fusiones de los distintos epitelios con hiperemia manifiesta y microhemorragias. (B) Detalle de lamela respiratoria al SEM con erosión a nivel de epitelio de revestimiento. (C) Detalle al TEM de célula del cloro con dilatación del canal intracelular y pérdida de microvellosidades.

Tras el periodo experimental, y una vez tomadas las muestras y procesadas, observábamos al microscopio óptico (MO), que en las lamelas de este lote y en los de menor concentración de TCDD, se identificaban todos los tipos celulares normales de estos componentes, como son: células epiteliales, de los pilares, endoteliales, del cloro y mucosas, aunque en el lote 3 algunos tipos celulares estaban en fase de necrosis, además se desprendían gran número, sobre todo las células epiteliales de revestimiento (Fig.15.A). Con el escáner electrónico observamos alteraciones de la superficie y un desprendimiento de células mucosas, a la vez que existen un aumento de la mucosidad (Fig.15.B). Con el microscopio electrónico de transmisión se observaron células del cloro con la mayor parte de los organoides, sobretodo mitocondrias y retículo endoplásmico liso (Fig.15.C).

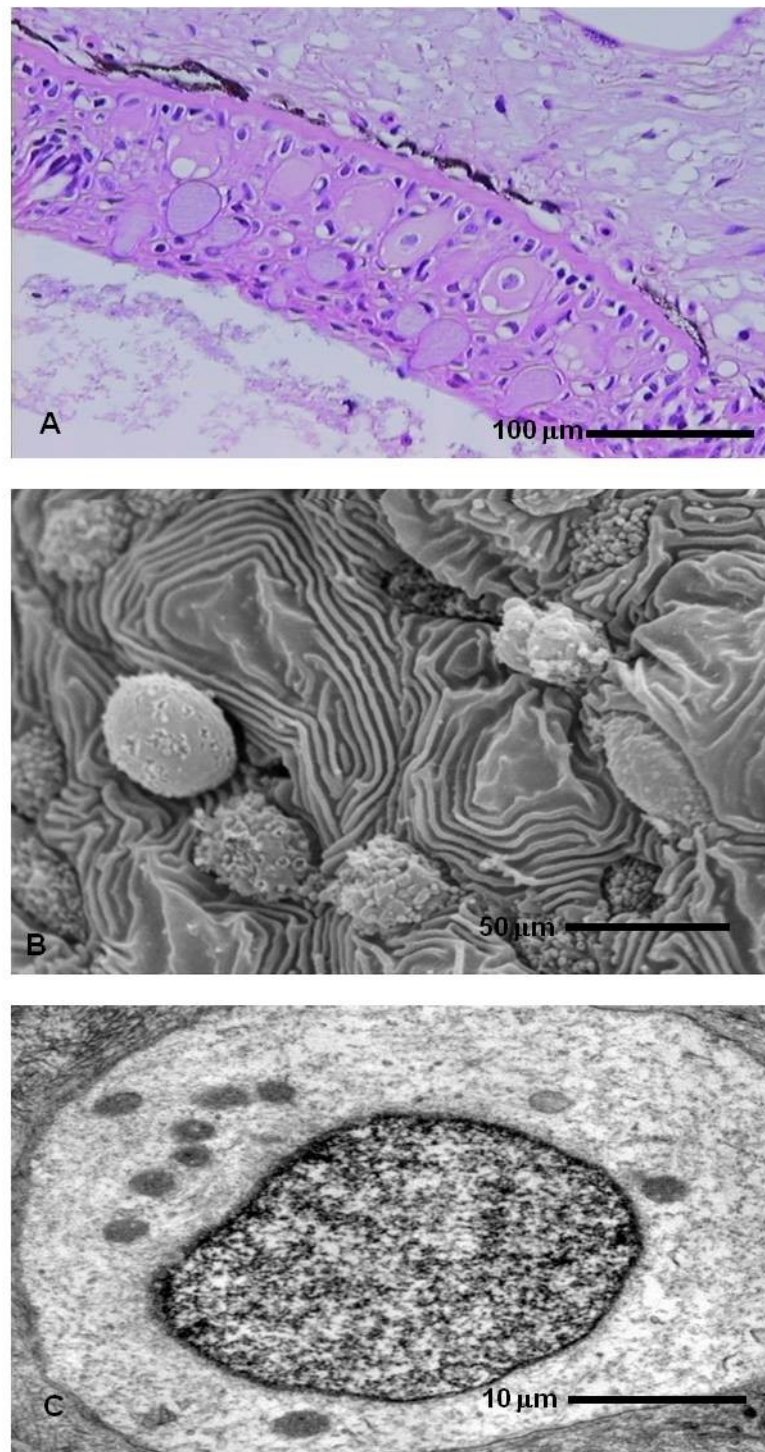


Figura 15. Branquia sensitiva del lote 3 (100 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de zona sensitiva donde aparecen células del cloro y entre la que se desprenden células mucosas. (B) Detalle al SEM de surco epitelial donde aparecen células mucosas con aumento de la mucosidad y alteraciones de la superficie. (C) Célula del cloro al TEM con pérdida de la mayor parte de orgánoides, sobretodo mitocondrias.

Dentro de las alteraciones histológicas en las branquias, el trastorno degenerativo más frecuente fue la hiperplasia interlaminar en un 100% en forma leve, seguida de la hiperplasia del filamento branquial en un 45%, predominantemente en forma leve, habiendo también pérdida de laminillas branquiales en forma severa en un 5%; observándose una moderada infiltración de células inflamatorias, mayormente de tipo mononuclear, en filamento branquial en un 100%; y cambios circulatorios como congestión en el filamento en un 30%. Así mismo, al igual que el músculo se observaron alteraciones tóxicas en el arco branquial y filamento branquial en un 5% de la población. Los quistes lamelares se observaban como estructuras redondas y ovaladas, presentando interiormente diferentes estructuras esféricas, elongadas o con procesos caudales, que representan estadios patológicos vasculares. Uno de ellos ubicado en el filamento branquial, estaba rodeado de tejido conectivo y presentaba estadios apoptóticos en su interior, habiendo una reacción inflamatoria en su periferia.

Lote 4º.

En este grupo las branquias son el órgano que presentó mayor alteración. Al MO se detectó una acentuada desorganización, presentándose destrucción total de las lamelas, con hiperemia muy marcada, edema, exudado y extensas hemorragias (Fig.16.A). Las imágenes obtenidas corresponden a un grave shock vascular-tóxico. Al SEM se evidenció salida e infiltración de células sanguíneas y exudativas, junto con pérdida total de la estructuración normal (Fig.16.B). Se pudo apreciar en el TEM graves alteraciones vasculares, principalmente a nivel capilar, con hiperemia generalizada y desestructuración de sus paredes y de las membranas respiratorias. Se llegó a detectar en el último lote zonas donde existía una hiperplasia de células del cloro, seguida de modificaciones de las mismas, con dilataciones de los canales intracelulares (Fig.16.C). En este último lote todos los componentes celulares mostraban procesos degenerativos e incluso necróticos.

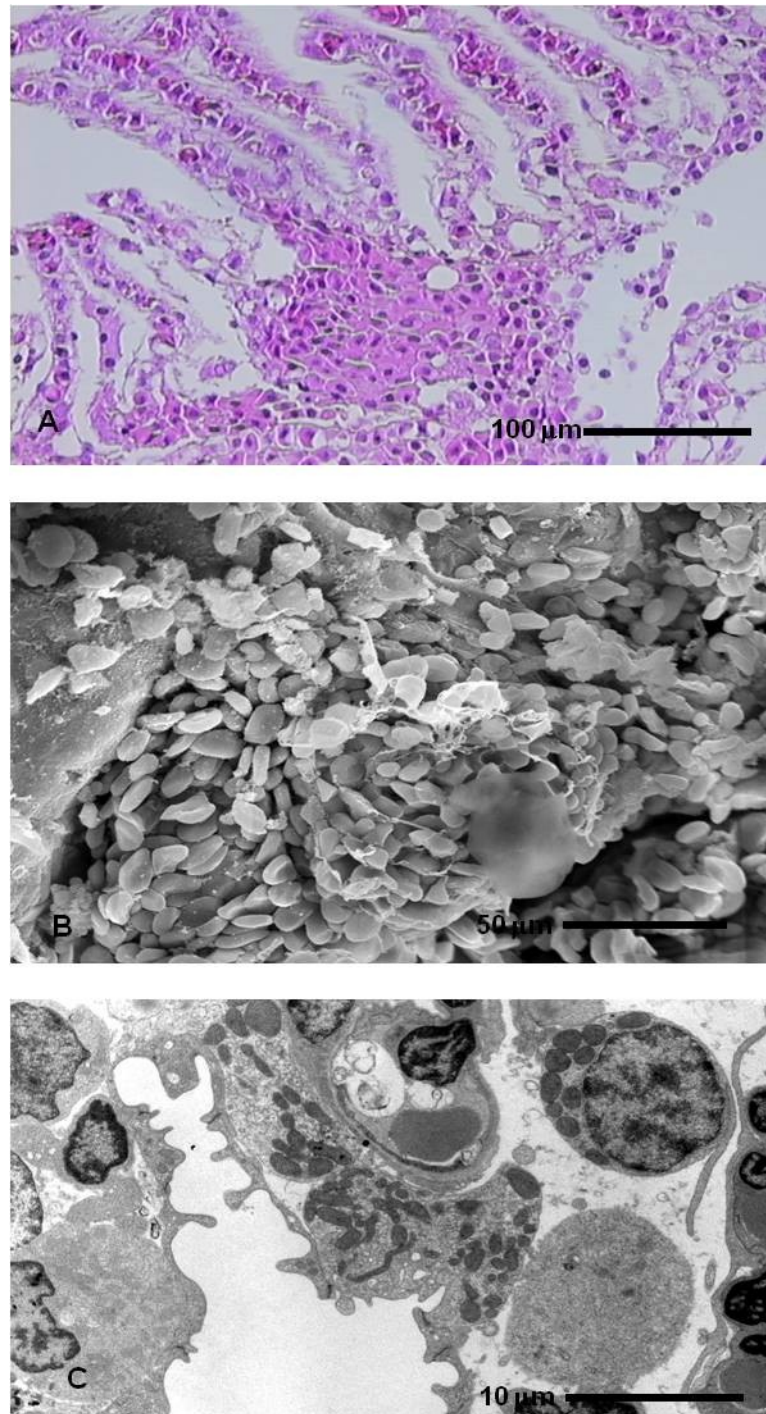


Figura 16. Branquia respiratoria del lote 4 (270 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de lamela con tumefacción, hiperemia y hemorragia. (B) Detalle d lamelas al SEM mostrando erosión del epitelio con salida de exudado y glóbulos rojos. (C) Detalle con TEM de hiperplasia de células del cloro y pérdida de canaliculos intracelulares, con hiperemia de capilares. Muestran desorganización de células epiteliales.

En este último lote se apreciaban al MO procesos alterativos siendo éstos del tipo vascular, con importantes procesos hemorrágicos, y en relación al epitelio se producían necrosis superficiales con desprendimiento de las mismas con abundante células mucosas (Fig.17.A). Las células de cloro estaban en la zona basal y se mostraban hinchadas y con vacuolizaciones, y las yemas sensitivas estaban parcialmente desorganizadas en este lote. Existían modificaciones observadas con el SEM (Fig.17.B) en los grupos de experimentación en el que se suministraron mayor concentración de TCDD, por una parte se mantenían parcialmente los surcos de huellas dactilares propias de esta superficie, pero lo que más se destacaba es que junto a las superficies de las yemas gustativas, eran numerosas las superficies que existían de células mucosas, eliminando al exterior dicha mucosidad y observándose en la superficie oquedades dejadas por las células mucosas.

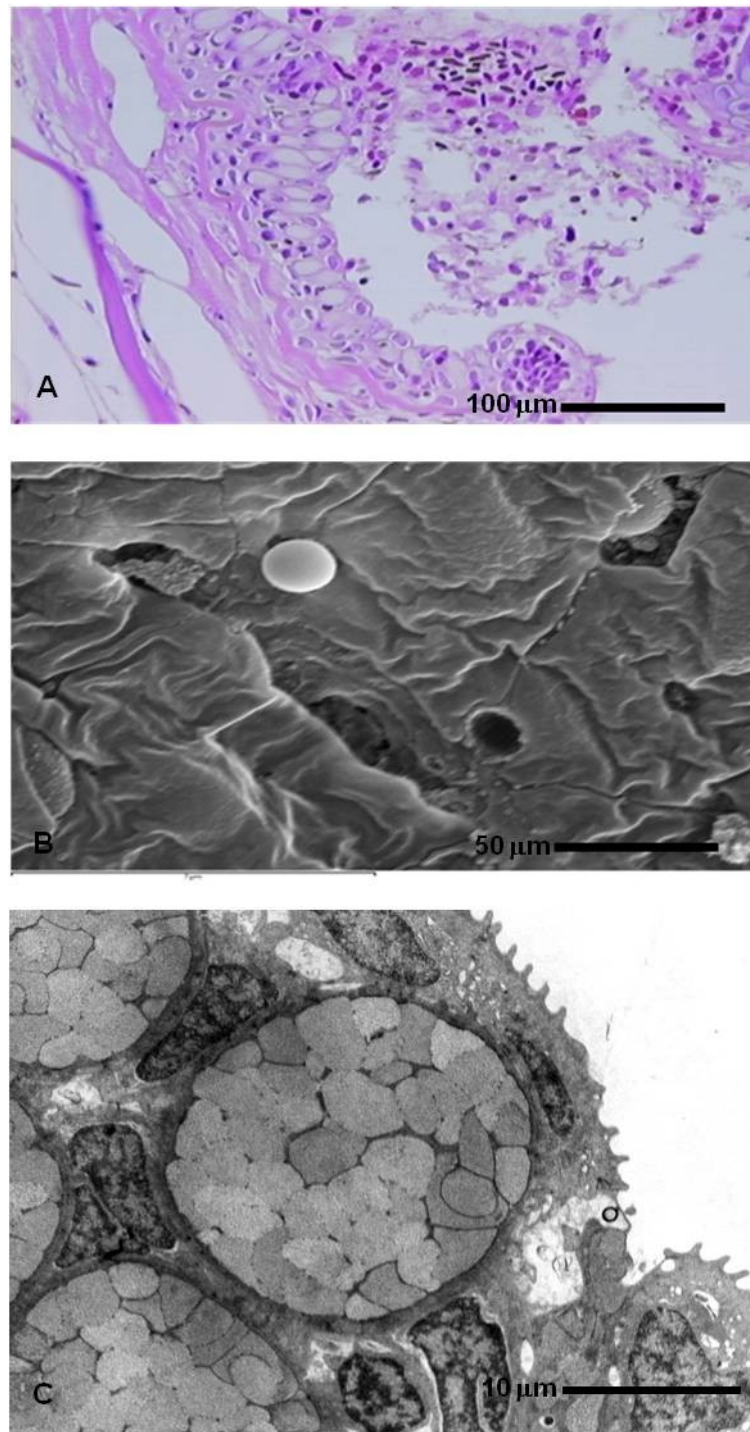


Figura 17. Branquia sensitiva del lote 4 (270 ng/g de alimentos TCDD): (A) Detalle al MO de la mucosa sensitiva donde se manifiestan corpúsculos sensitivos entre abundantes células mucosas y hemorragia. (B) Detalle de la superficie de la branquiespina al SEM donde se aprecia gránulo de mucosidad superficial y las oquedades que corresponde a células mucosas. (C) Detalle de lamela sensitiva al TEM donde se aprecian abundantes células mucosas y conductos de excreción.

5.4 Estudio morfométrico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI®), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba *F* en la tabla ANOVA. Para el conteo del número de células y el diámetro de las mismas se utilizaron 20 campos para el lote control y 21 para los distintos lotes restantes (Tabla 9).

Breakdown Table of Descriptive Statistics (Spreadsheet1_corregido.st N=104 (No missing data in dep. var. list)						
Group	Number Means	Number N	Number Std.Dev.	Diameter Means	Diameter N	Diameter Std.Dev.
Control	194,4500	20	10,06544	58,84450	20	5,003154
1°	191,9048	21	8,61919	58,30381	21	4,586989
2°	245,7143	21	20,12745	56,35000	21	5,213554
3°	262,8571	21	17,83610	73,45524	21	4,213508
4°	146,5714	21	10,92507	77,09905	21	5,499860
All Grps	208,4327	104	44,24815	64,86785	104	9,972965

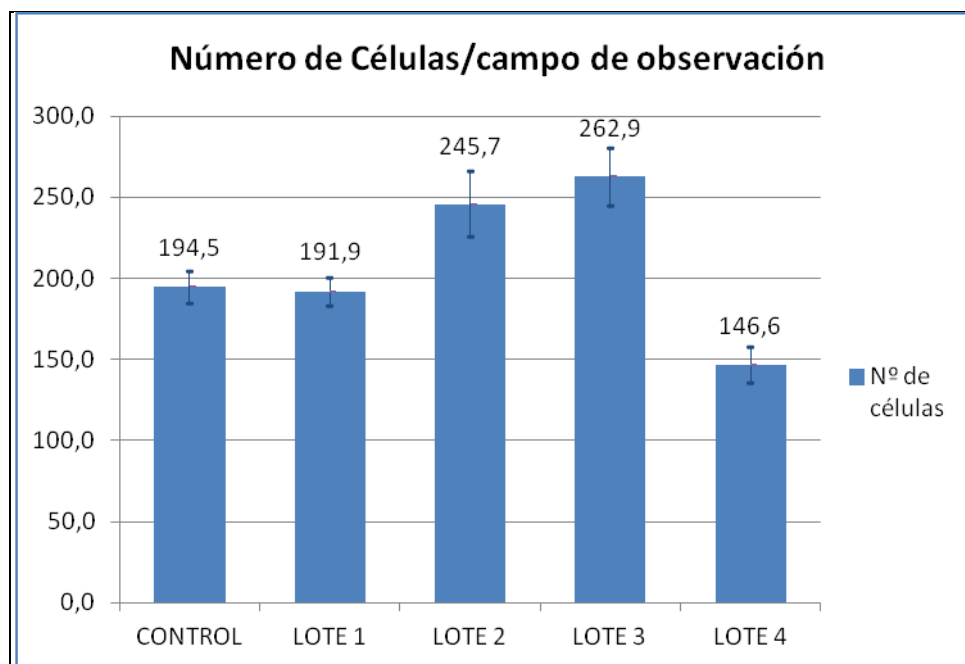
Tabla 9. Medias de números de células del cloro y de los diámetros de las mismas donde se pueden observar el número de muestras tomadas para cada lote.

Al analizar las gráficas, observamos que existía un aumento del número de células del cloro en los lotes 2 y 3, y una disminución del número en el lote 4 (Grafica 5), que corroboraba lo descrito por la observación histológica, en la que se producían degeneraciones y necrosis celulares en este último lote.

Scheffe Test; Variable: Number (Spreadsheet1_corregido.sta) Marked differences are significant at p < ,05000					
Group	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=194,45	M=191,90	M=245,71	M=262,86	M=146,57
Control {1}		0,988008	0,000000	0,000000	0,000000
1° {2}	0,988008		0,000000	0,000000	0,000000
2° {3}	0,000000	0,000000		0,006765	0,000000
3° {4}	0,000000	0,000000	0,006765		0,000000
4° {5}	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

Tabla 10. Prueba de Scheffe para comparación de medias múltiples. No existen diferencias significativas entre el lote control y el lote 1 en cuanto al número de células del cloro, siendo por otro lado muy significativa la diferencia con los demás lotes.

Según la prueba de Scheffe para este parámetro de cada lote se observó que, entre los lotes control y 1 no había diferencias significativas, entendiéndose que no se veía afectada la variación del número de células del cloro a esta concentración de TCDD. Por otro lado, sí se observaban diferencias muy significativas en la variación del número de células del cloro de los lotes 2, 3 y 4 con respecto al lote control.



Gráfica 5: Representación gráfica de la variación del número de células del cloro en cada uno de los lotes. Se observó un aumento del número de células del cloro en el filamento en los lotes 2 y 3 y una disminución del número en el lote 4 que corroboró lo descrito por la observación histológica, en la que se producían degeneraciones y necrosis celulares. *Significativamente diferente del control con $p < 0.05$.

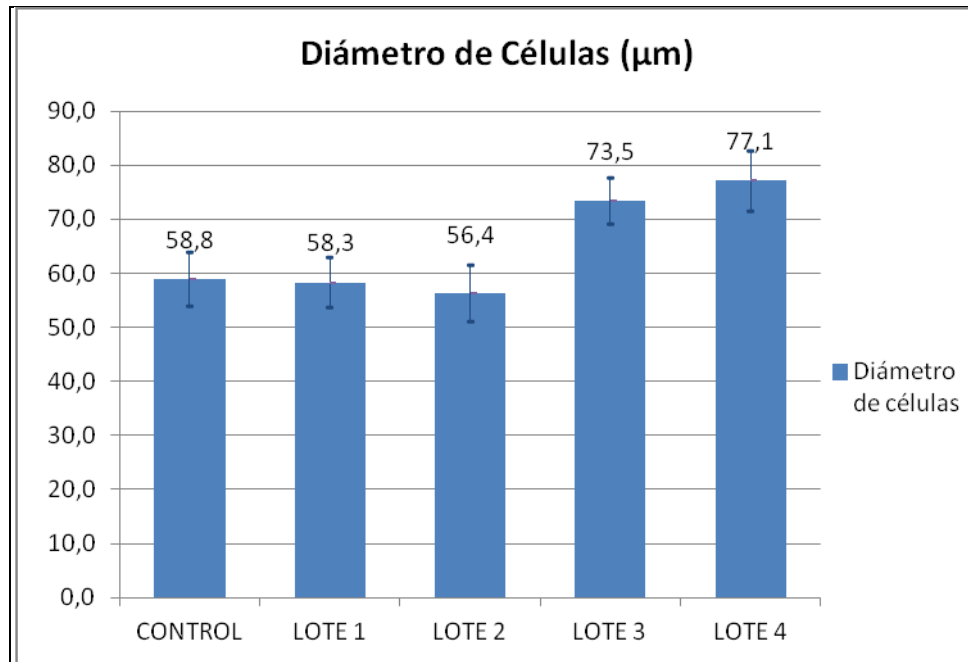
Con respecto a las diferencias de medias de diámetros de las células del cloro, se observa que entre el lote control y los lotes 1 y 2 no hay diferencias significativas, sí existiendo con el resto de los lotes. Ahora bien, entre los lotes de mayor concentración de TCDD, no existen diferencias significativas entre ellos (Tabla 11).

Scheffe Test; Variable: Diameter (Spreadsheet1_corregido.sta)					
Marked differences are significant at p < ,05000					
Group	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=58,845	M=58,304	M=56,350	M=73,455	M=77,099
Control {1}		0,998135	0,623102	0,000000	0,000000
1° {2}	0,998135		0,798667	0,000000	0,000000
2° {3}	0,623102	0,798667		0,000000	0,000000
3° {4}	0,000000	0,000000	0,000000		0,227219
4° {5}	0,000000	0,000000	0,000000	0,227219	

Tabla 11. Prueba de Scheffe para comparación de medias múltiples. No existen diferencias entre el lote control y los lotes 1 y 2 en cuanto al diámetro de las células del cloro, así mismo no existe diferencia significativa entre los lotes 3 y 4. Siendo muy significativa, a su vez, la diferencia entre las medias de los lotes control, 1 y 2 con los lotes 3 y 4.

Por otro lado, si analizamos la gráfica de las medias de las dimensiones de las células del cloro (Grafica 6), observamos en ella que se producía un aumento del tamaño de las células del cloro en los lotes 3 y 4, puesto de manifiesto también con el estudio histopatológico, en el que aparecía tumefacción del tejido epitelial e hinchamientos y vacuolización de las células del cloro

Con respecto a las diferencias de medias de diámetros mínimos de las células del cloro y aplicando la prueba de Scheffe, se observó que entre el lote control y los lotes 1 y 2 no habían diferencias significativas, sí existiendo con el resto de los lotes. Ahora bien, entre los lotes de mayor concentración de TCDD, no existían diferencias significativas entre ellos.



Gráfica.6: Representación gráfica de la variación del diámetro mínimo de las células del cloro en cada uno de los lotes. Observamos en ella que se producía un aumento del tamaño de las células del cloro en los lotes 3 y 4, puesto de manifiesto también con el estudio histopatológico, en el que aparecía tumefacción del tejido epitelial e hinchamientos y vacuolización de las células del cloro. *Significativamente diferente del control con $p < 0.05$.

6. Discusión

Como estudiaba Evans (2005), una de las funciones importantes de la branquia tanto de la zona sensitiva pero fundamentalmente la zona respiratoria, es la regulación iónica del agua que almacenan en sus cordones acuiferos, pero coincidimos con Russell et al. (1988) que son las células de cloro las que a nivel de los conductos iónicos, son los que en definitiva se activan en estos procesos.

Los disruptores endocrinos tienen como órgano blanco de su actuación la hipófisis, y su acción modifica gravemente el parénquima celular adenohipofisario, Ankley y Johnson (2004) describen la degeneración de las células prolactínicas, en tanto que Mancera et al. (2002) estudia que en este proceso, en su compensación se activan las células del lóbulo craneal, las células ACTH y sobre todo las células LTH productoras de prolactina o luteotropina.

Las dioxinas constituyen un grupo de compuestos químicos que son contaminantes ambientales persistentes. Las dioxinas se encuentran en el medio ambiente de todo el mundo y se acumulan en la cadena alimentaria, principalmente en el tejido adiposo de los animales (Colborn et al. 1993)

El término «dioxinas» se utiliza a menudo para referirse a una familia de compuestos relacionados entre sí desde el punto de vista estructural y químico, constituida por las dibenzo-para-dioxinas policloradas (PCDD) y los dibenzofuranos policlorados (PCDF). Bajo esa designación también se incluyen algunos bifenilos policlorados (PCB) análogos a la dioxina que poseen propiedades tóxicas similares. Se han identificado unos 419 tipos de compuestos relacionados con la dioxina, pero se considera que sólo aproximadamente 30 de ellos poseen una toxicidad importante, siendo la TCDD la más tóxica.

La exposición breve del ser humano a altas concentraciones de dioxinas puede causar lesiones cutáneas, tales como acné clórico y manchas oscuras, así como alteraciones funcionales hepáticas. La exposición prolongada se ha relacionado con alteraciones inmunitarias, del sistema nervioso en desarrollo, del sistema endocrino y de la función reproductora. La exposición crónica de los animales a las dioxinas ha causado varios tipos de cáncer. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), perteneciente a la OMS, realizó en 1997 una evaluación de la TCDD. De acuerdo con los datos de las investigaciones en animales y los datos epidemiológicos humanos, el CIIC ha clasificado la TCDD como «carcinógeno humano». Sin embargo, no afecta al material genético, y hay un nivel de exposición por debajo del cual el riesgo de cáncer podría ser insignificante.

Hasta hace unos años, se ha considerado a la dioxina como un débil estrógeno medioambiental, debido a que en algunos ensayos, la dioxina resultó de 10.000 a 100.000 veces menos potente que el estradiol (Welshons et al., 2003), utilizándose como afirmación común entre los diversos autores que la dioxina tiene una actividad estrogénica débil en sistemas *in vivo* e *in vitro* (Snyder et al., 2002). Sin embargo, estudios sobre mecanismos moleculares han revelado una variedad de rutas a través de las cuales la dioxina puede estimular una respuesta celular a muy bajas dosis (Welshons et al., 2006).

Los objetivos de nuestro trabajo han sido evaluar a la dioxina como agente alimentario y ambiental, en relación a su capacidad disruptora del sistema endocrino, a través de la evaluación de su cinética en los tejidos animales y analizando la información obtenida de diferentes biomarcadores como la proteína hepática VTG, así como la histopatología y morfometría branquial.

En nuestro estudio hemos utilizado como modelo experimental al pez zebrafish (*Danio rerio*), una especie de pequeño tamaño, de fácil manejo y bajo coste de mantenimiento, con una gran fertilidad durante toda la vida reproductiva. Los huevos y embriones son transparentes, lo que facilita el estudio del desarrollo de los órganos, y la incidencia de productos químicos en los sistemas orgánicos desde las primeras horas de vida, además de un genoma diploide similar al de los mamíferos con la ventaja que eso conlleva a la hora de realizar estudios genéticos y realizar extrapolaciones al ser humano. En la OECD y en otros organismos oficiales, podemos encontrar multitud de directrices relacionadas con el análisis de sustancias químicas con potencial estrogénico, donde recomiendan el uso del zebrafish como modelo experimental (OECD número 204, 210, 212), así como en el anexo I de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Las concentraciones de la dioxina utilizadas mezcladas con el alimento, 10, 40, 100 y 270 ng/g de alimento de la dioxina, son muy similares a las que utilizaron diferentes autores en diversas especies de peces (Lindholst et al., 2000; Sohoni et al., 2001; Tabata et al., 2003; Van den Belt et al., 2003; Ishibashi et al., 2005; Mandich et al., 2007).

En nuestro estudio, encontramos que la dioxina se acumula en los tejidos de los peces, detectando unas concentraciones que van aumentando a medida que la concentración de la dioxina a la que han sido expuestos los peces es mayor. Nuestros

valores oscilan desde $0,0465 \pm 0,005 \mu\text{g/g}$ al ser expuestos a 10 ng/g de alimento de la dioxina, hasta valores de $29,5617 \pm 4,076 \mu\text{g/g}$ a dosis de 270 ng/g de alimento de la dioxina. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Mandich et al (2007) en su estudio en carpas, en el que utilizando dosis similares de la dioxina que nosotros obtuvieron unas concentraciones similares, con unos valores de $0,23 \pm 0,032 \mu\text{g/g}$, $1,79 \pm 0,68 \mu\text{g/g}$ y $24,47 \pm 10,15 \mu\text{g/g}$, al exponer a las carpas a dosis de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/l}$ respectivamente, siendo semejantes a las obtenidas en nuestro estudio, en zebrafish expuestos a las máximas concentraciones.

La vitelogenina hepática (VTG) es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (anfibios, aves, peces y reptiles) durante el ciclo de maduración ovárica, bajo el control de regulación endocrina a través del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal, sintetizada por el hígado en respuesta a la circulación de estrógenos endógenos, principalmente el 17β -estradiol. Por ello, un aumento de la inducción de VTG en las hembras de peces, así como la simple inducción de VTG en los machos, puede originar repercusiones directas sobre la capacidad reproductiva de los peces (disminución de la producción de gametos, disminución en el número y tamaño de los huevos, fallos en el desove) así como una anormal diferenciación sexual en las larvas de los peces (Kime et al., 1999) por ello se utiliza como biomarcador para medir los efectos estrogénicos de diversos compuestos químicos, entre ellos la dioxina (Lindhost et al., 2000; Van den Belt et al., 2003).

En nuestros resultados observamos un aumento de la concentración de VTG en todos los peces a medida que incrementamos las concentraciones de la dioxina a las que exponemos a los peces, lo que indica una alta correlación entre los valores de VTG y la concentración de la dioxina.

En machos hemos detectado una inducción de VTG con respecto al control en los peces expuestos a dosis de 10 y 40 ng/g de alimento de la dioxina en sólo 3 semanas de exposición. Sumpster y Jobling (1995), ya observaron una inducción de VTG al exponer a un cultivo de hepatocitos de trucha arco iris a dosis medioambientales de la dioxina de 1, 5 y 10 µg/l durante sólo 2 días. En nuestros resultados, una gran inducción de VTG sólo la encontramos en machos expuestos a 100 y 270 ng/g de la dioxina, obteniendo unos valores de 755.357,04 ng/g y 1.189.285,60 ng/g de VTG, respectivamente. Según la clasificación realizada por Mandich et al (2007), los peces que han sido expuestos a estas dos concentraciones serían definidos como vitelogénicos (>11.000 ng/g VTG), y muy vitelogénicos (>1.000.000 ng/g VTG) respectivamente.

En las hembras, los valores de VTG son muy superiores a los valores de los machos en todas las concentraciones de estudio, como cabría esperar, ya que como hemos comentado anteriormente, la VTG es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos. Varios autores han encontrado diferencias entre sexos en relación a la exposición de los peces a diferentes compuestos estrogénicos. Así, Kime et al. (1999), expusieron durante 2 semanas a zebrafish adultos a diferentes concentraciones de 17-β etinilestradiol (EE2), encontrando que el nivel de inducción de la VTG fue tres veces superior en las hembras que en los machos.

Aunque los niveles de VTG pudieran ser esperados más altos en las hembras que en los machos, al tratar al zebrafish con diversas dosis de EE2, Van den Belt et al (2001) no encontraron ninguna diferencia significativa entre ambos sexos, aunque sí encontraron diferencias significativas al exponer a ambos sexos del zebrafish a 4-tert-octilfenol (OP).

En nuestro estudio, en las hembras, al igual que en los machos, encontramos un aumento de la inducción de VTG en todas las dosis de estudio con respecto al control,

aunque sólo en la concentración más alta (270 ng/g de alimento de dioxina), encontramos un gran incremento de los niveles de VTG (11.925.000 ng/g de VTG).

Diversos autores han evaluado el efecto estrogénico de la dioxina en diferentes especies de peces. Ishibashi et al (2005), expusieron a peces medaka (*Oryzias latipes*) machos a dosis de dioxina durante 21 días. A una exposición de 1000 µg/l de la dioxina provocó un aumento significativo de las concentraciones de la VTG hepática con respecto al grupo control, coincidiendo con nuestros resultados de las concentración mayor (270 ng/g), no así al exponerlos a dosis de 250 y 500 µg/l de la dioxina, en donde no encontraron un aumento significativo de las concentraciones de VTG en relación a los grupos control.

Lindholst et al (2000) observaron una inducción significativa de la síntesis de VTG en trucha arco iris expuestas a 500 µg/l de la dioxina durante 12 días. Sohoni et al (2001) utilizando dioxina en concentraciones parecidas que las nuestras aunque con un periodo de exposición mucho mayor, concluyeron que el TCDD inducía la síntesis de VTG en machos de fathead minnow (*Pimephales promelas*) a concentraciones de 640 y 1280 µg/l después de 43 días y de 160 µg/l después de 71 días. En medaka, Tabata et al (2003) observaron aumentos marcados en las concentraciones de VTG plasmática de los machos después de 5 semanas de exposición a 1000 µg/l de la dioxina.

Mandich et al (2007) en su estudio con la dioxina en carpas, encontraron valores de VTG similares a los nuestros al exponer a los peces a dosis de 10 y 40 ng/g de la dioxina, en cambio, observaron unos valores superiores de VTG en las carpas expuestas a las concentraciones de 100 y 270 ng/g de la dioxina, partiendo de unos valores de VTG similares a los nuestros en los peces control.

En relación a estas diferencias entre especies, Van den Belt et al (2003), en su estudio comparativo entre machos de zebrafish y de trucha arco iris, expusieron a ambos a la acción

de un compuesto estrogénico como es el OP durante 3 semanas, observando una inducción de VTG en trucha arco iris a concentraciones de 30 µg/l, mientras que los zebrafish macho son al menos 3 veces menos sensibles que las truchas arco iris, puesto que encontraron una respuesta significativa de VTG en trucha a un nivel de exposición de 30 µg/l de OP, mientras que para el zebrafish un nivel de exposición de 100 µg/l fue insuficiente para inducir la VTG, siendo ésta la máxima dosis de OP a la que expuso a los peces. Lindholst et al (2003), estudiaron estos datos comparativos entre ambas especies observados por Van den Belt et al (2003), concluyendo que estas diferencias podían ser debidas a un metabolismo hepático más rápido, y por lo tanto, más efectivo en el zebrafish en comparación a la trucha arco iris.

Orn et al (2006) realizaron una comparación entre el zebrafish y el pez medaka exponiéndolos a diversas dosis del compuesto estrogénico sintético EE2. Comparado con los grupos control, la concentración de VTG media era perceptiblemente más alta en el zebrafish, después de la exposición a 10 ng/l de EE2, mientras que no se registró ningún aumento en medaka. La concentración media de VTG en zebrafish expuesto a 10 ng/l de EE2 era de 4.900 µg/g y en el pez medaka de 2,5 µg/g. La exposición del zebrafish a 100 ng/l EE2 dio lugar a la mortalidad del 100% de los peces, mientras que en el pez medaka ésta concentración causó un aumento significativo de VTG, con una concentración media de VTG de 1.400.000 ng/g. Por lo tanto en este estudio, el zebrafish presentó una sensibilidad mucho mayor que en medaka para producir VTG tras la exposición a 10 ng/l de EE2 durante 3 semanas.

Además de la dioxina, como se ha podido ver en estudios detallados anteriormente, existen multitud de estudios en el zebrafish y en otras especies de peces relacionados con compuestos químicos con posible capacidad estrogénica.

Van den Belt et al (2001) expusieron a zebrafish machos y hembras, a la acción del EE2, a dosis de 5, 10 y 25 ng/l durante 3 semanas. Ya a la concentración más baja, se produjo una inducción de la VTG plasmática en los zebrafish macho con respecto al control, y el aumento de la concentración a 10 ng/l EE2 se tradujo en una máxima respuesta de inducción de VTG, superior a la encontrada al exponer a los peces a una dosis de 25 ng/l de EE2. En las hembras la máxima inducción de VTG también se produjo al exponerlas a una dosis de 10 ng/l EE2. Orn et al (2003) encontraron una inducción significativa de VTG en el zebrafish al exponerlo a dosis de 10 ng/l de EE2. Rose et al (2002) utilizando dosis más bajas, encontraron una inducción significativa de los valores de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero al exponer al zebrafish a dosis de sólo 3 ng/l de EE2 durante 8 días.

En relación al 17 β -estradiol (E2), un esteroide natural, Rose et al (2002), expusieron al zebrafish a diversas dosis de E2, observando una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero a una dosis de 21,4 ng/l de E2, y aumentando estos niveles al exponer a los peces a dosis mayores de E2. Resultados muy similares han sido encontrados por Van den Belt et al (2003), al exponer a zebrafish a dosis de 20 y 100 ng/l de E2, con una inducción significativa de VTG en el homogeneizado del cuerpo entero, desde la dosis más pequeña y aumentando estos valores al exponerlos a la dosis de 100 ng/l E2.

Otros compuestos ampliamente utilizados en la industria y considerados como disruptores endocrinos, son los alquilfenoles polietoxilados, como el OP y el 4-nonilfenol (NP). Estos alquilfenoles han sido ampliamente estudiados y su actividad estrogénica en diversas especies de peces ha sido demostrada por diferentes autores (Jobling et al., 1996; Routledge y Sumpter, 1997). Utilizando el zebrafish, Van den Belt et al (2003) también observaron un aumento significativo en la inducción de VTG plasmática en relación al control al exponer a los peces a una concentración de 500 μ g/l de NP, pero este aumento no fue observado a concentraciones inferiores, de 20 y 100 μ g/l. En cambio, Yang et al (2006)

encontraron en el zebrafish un aumento significativo de la inducción de VTG a partir de una dosis de 100 µg/l, obteniendo unos resultados muy similares a los de nuestro estudio.

Como establecimos en la revisión bibliográfica, en nuestro estudio hemos incluido como biomarcador la histopatología branquial del zebrafish, ya que está demostrado que esta histopatología responde con una gran sensibilidad a la exposición a disruptores endocrinos. El aneurisma, la fusión lamelar, la hiperplasia del epitelio, entre otras, son alteraciones conducentes a trastornos funcionales de las branquias y son utilizadas hoy en día como biomarcadores histopatológicos para estudios de evaluación ambiental (Verján et al. 2002; Cengiz, 2006). Añadiendo a esto, en 2001, con motivo de la 4ª Reunión del Grupo de Trabajo relacionado con los Compuestos Disruptores Endocrinos de la OECD, fue comúnmente aceptado que la detección de VTG, junto con el aspecto macroscópico de las branquias y gónadas, y la histopatología, son la base del análisis de compuestos prolactínicamente activos (Segner et al., 2003a).

En las branquias respiratorias, encontramos en los dos primeros lotes (10 y 40 ng/g de la dioxina) los mismos tipos de lamelas que hemos observado en el grupo control, todos ellos se observan con nitidez y mantienen la estructura y el tipo de células de revestimiento, siendo muy similares al grupo control. En los zebrafish expuestos a 100 ng/g de la dioxina encontramos alguna anormalidad en los capilares, como es la vacuolización del citoplasma de las células endoteliales. A dosis de 270 ng/g/l de TCDD observamos en todas las lamelas primarias y secundarias una degradación de sus componentes celulares, donde podemos destacar una fibrosis intersticial caracterizada por la presencia de tejido conectivo fibroso en el interior del estroma capilar, además de infiltraciones granulomatosas. También podemos observar un aumento en el número de elementos infiltrados en relación a los observados en el lote de peces expuestos a 100 ng/g de la dioxina.

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, no detectaron alteraciones y sólo en un 10% de las muestras encontraron en células del cloro y oocitos en atresia en los ovarios de hembras expuestas a las 2 concentraciones inferiores de la dioxina (1 y 10 µg/l de la dioxina). A dosis superiores de 100 y 1000 µg/l de TCDD, las branquias mostraron alteraciones en el estroma conectivo, granulocitos eosinofílicos e incremento de los hiperémicos, afectando al 60% de los animales en las concentraciones más altas.

En la directriz de la OECD del 2009, encontramos una serie de criterios diagnósticos en la histopatología branquial en relación al análisis de la acción de compuestos potencialmente prolactínico. Entre los objetivos primarios de diagnóstico encontramos el incremento de la desorganización como marcador del daño histopatológico branquial por la acción de estos compuestos (OECD, 2009).

Se han descrito diversos factores en peces teleósteos como causantes de un aumento de la atresia de células del cloro, tales como hipofisectomía, desnutrición, cambios de temperatura y tratamientos con compuestos estrogénicos (Guraya, 1986).

En nuestro estudio, hemos medido el porcentaje de lamelas a las diferentes concentraciones de exposición a la dioxina. En el control, encontramos un pequeño porcentaje, un 1,8%. Como hemos mencionado la atresia epitelial es un mecanismo fisiológico en las branquias de animales vertebrados. A medida que aumentamos las concentraciones de exposición, observamos un incremento en el porcentaje de capilares atrésicos. A las concentraciones de 100 y 270 ng/g de TCDD, observamos un gran aumento del porcentaje de capilares atrésicos con respecto al control, estando la atresia por encima del 10% del total de los capilares (14,4% y 18,7%, respectivamente), coincidiendo los resultados de la concentración más elevada con los datos aportados por Wolf et al (2004), que obtuvieron un porcentaje medio anormalmente alto del 18% con respecto al control, tras

exponer a fathead minnow (*Pimephales promelas*) a una dosis alta de 2.780 ng/l de E2. En fathead minnow hay datos acerca de unos porcentajes normales de epitelios atrésicos que van desde 1,6% (Mc Cormick et al., 1989), hasta el 5% (Miles-Richardson et al., 1999b).

Varios autores coinciden con nuestros resultados al utilizar diversos compuestos prolactínicos a concentraciones similares, Weber et al (2002) expusieron a los zebrafish a una concentración de 100 µg/l de NP observando un aumento en el tamaño del canal acuífero con respecto al grupo control. Gray et al (1999) observaron una alta incidencia de atresia en hembras adultas de pez medaka (*Oryzias latipes*) expuestas a 100 µg/l de OP durante 2 meses. Spano et al (2004) tras exponer a goldfish (*Carassius auratus*) adultos a 100 y 1000 µg/l de atrazina durante 3 semanas observaron una mayor proporción de atrésicos en estos lotes de exposición que en el control (20 y 25% de los capilares y canales, respectivamente).

Mandich et al (2007), en su estudio en carpas expuestas a la dioxina, observaron desde la menor concentración de estudio (1 µg/l de dioxina), que un número amplio presentaban una organización alterada del espacio intercanalicular, así como la aparición de granulocitos eosinófilicos. En un menor número de branquias sensitivas, también describió una reducción de yemas sensitivas. En la dosis de 10 µg/l de la dioxina, la desorganización del espacio intercanalicular era más evidente, el diámetro de algunos canales estaba disminuido.

Bottero et al (2005), observaron unas lesiones similares a las encontradas por nosotros y por Mandich en las branquias de carpas adultas al exponerlas durante 14 días a diferentes dosis del estrógeno sintético EE2 (1, 4, 16 y 64 ng/l de EE2) mostrando estas branquias una clara evidencia de haber sido sometidas a una acción disruptora (reducción del número del epitelio de revestimiento, reducción de la media del diámetro).

Rey et al (2009) expusieron a peces *Cichlasoma dimerus* al OP (4-tert-octilfenol) a unas concentraciones de 30, 150 y 300 µg/l durante 60 días. La histología de las branquias reveló progresivos efectos adversos en la estructura de las lamelas tras la exposición a concentraciones de OP. Las branquias expuestas a 30 µg/l eran similares a los del control. En cambio, en los peces expuestos a 150 µg/l de OP, se observaron multitud de lesiones, la mayoría similares a las encontradas en nuestro estudio. Las branquias preservaban la estructura canalicular pero se observó una incrementada fibrosis intersticial. También pudieron identificar gránulos eosinofílicos. El tejido branquial de los tratados con 300 µg/l de OP reveló un desorden de los capilares así como una ausencia de envoltas.

A diferencia de nosotros, las branquias de animales tratados con OP, no difirieron histológicamente demasiado de las lamelas control, ni siquiera en los peces expuestos a las concentraciones más altas.

Kinnberg et al (2000) expusieron a peces *Xiphophorus maculatus* a diferentes concentraciones (80, 640, 960 y 1280 µg/l) del alquilfenol NP (4-nonilfenol). En las lamelas respiratorias apreciaron un descenso en el número de capilares, un gran número de células del cloro hipertrofiadas sin incluir dentro del epitelio a la que estuvieron expuestos los peces era mayor.

Kinnberg et al (2000) también expusieron a *Xiphophorus maculatus* a una dosis de 96 µg/l de EE2, encontrando efectos sobre la estructura canalicular similar a las observadas en los peces expuestos a altas concentraciones de NP. En algunos de las lamelas los efectos eran aún más pronunciados.

Zha et al (2007), al igual que Kinnberg et al (2000) realizaron un estudio donde expusieron a diversas dosis de EE2 (0, 1, 5 y 25 ng/l) y NP (3, 10 y 30 µg/l) durante 28 días a *Gobyociprus rarus*. Los canales hídricos observados en las exposiciones a 3, 10, y 30 µg/l

de NP y 1 y 5 ng/l de EE2 eran similares a los del grupo control a los 28 días. Sin embargo, los canales estaban seriamente degenerados cuando fueron expuestos a 25 ng/l de EE2.

La exposición a compuestos lactotrópicos activos ha dado lugar en diversos estudios a un aumento en el tamaño (hipertrofia) de las células del cloro, con o sin aumento del número de éstas (Miles-Richardson et al., 1999b; Kinnberg et al., 2000; Kinnberg y Toft, 2003; van der Ven et al., 2003). En nuestro estudio hemos medido el diámetro medio de las células del cloro en los diferentes lotes de zebrafish expuestos a la dioxina, observando un aumento del diámetro medio de estas células a medida que incrementamos la concentración de la dioxina a la que exponemos a los zebrafish, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los 3 lotes de mayor concentración (40, 100 y 270 ng/g de alimento de TCDD) y el control.

Miles-Richardson et al (1999b), expusieron a peces fathead minnow a NP a concentraciones inferiores a las nuestras (1,1 y 3,4 $\mu\text{g/l}$), observando un aumento en el tamaño de las células del cloro con respecto al control. Estas presentaban un citoplasma distendido por la presencia de cuerpos residuales y figuras de mielina, así como una proliferación en el número de estas células. Kinnberg et al (2000), expusieron a peces *Xiphoporus maculatus* durante 28 días al NP, a unas concentraciones dentro del rango de las utilizadas por nosotros, observando un incremento en el número de estas células hipertrofiadas con respecto al control al exponer a los peces a dichas concentraciones. Kinnberg y Toft (2003), al exponer a peces guppy (*Poecilia reticulata*) a concentraciones de 1 $\mu\text{g/l}$ de EE y 900 $\mu\text{g/l}$ de OP, observaron la hipertrofia. Van der Ven et al (2003) también pudieron observar la hipertrofia de las células del cloro en las branquias de zebrafish adultos tras exponerlos a la acción del prolactínico sintético metildihidrotestosterona.

El uso indiscriminado de disruptores endocrinos, en diferentes industrias, favorecen el almacenamiento de estas sustancias en el organismo. Es un hecho como indican Colborn (1993), Campbell (1998), Guillette (2000), Edwards (2006), etc., que estas sustancias entre las que se encuentran las dioxinas, modifican diversos sistemas, destacándose los órganos sexuales, tanto masculinos como femeninos. Como la intoxicación, normalmente, se realiza de forma paulatina (Antunes, 2001; Jacobs, 2002; Vives, 2005), se conocen escasas lesiones en los órganos por donde se introducen los tóxicos, sobre todo las vías digestivas y respiratorias. En mamíferos y peces se citan lesiones en el tracto gastrointestinal (Henry, 1997; Arellano, 2002; Zodrow, 2004), en tanto apenas se conocen modificaciones en vías respiratorias.

En nuestro planteamiento, realizamos diferentes grupos dependiendo de las dosis que se les administró a los peces. Debido a los trabajos de Camean etc., que detectó mediante técnicas de inmunocitoquímica, que la entrada de tóxicos se realiza por branquias, e incluso que parte de estas sustancias son absorbidas por las células del cloro, ya que al poseer gran cantidad de mitocondrias, y sobre todo cisternas de retículo endoplásmico liso, degradan a las sustancias tóxicas. En la cuantificación que hemos realizado en nuestra experiencia de las células del cloro, sobre todo en la zona respiratoria, existía un aumento progresivo de esta población celular (van den Heuvel, 1999), lo que infería una reacción frente a las dioxinas para su eliminación, si bien como las dosis iban en aumento, también se hipertrofiaban (Al-Ghanbousi, 2012). En los estudios realizados al microscopio electrónico, el sistema retículo membranoso (retículo endoplásmico liso y microvellosidades del canal intracelular), en un principio se mantenía aparentemente normal, pero en los dos últimos grupos, la hipertrofia se debía a una dilatación del canal intracelular, con tumefacción de las microvellosidades, perdiendo de esta forma la actividad de degradación de la dioxina, lo que significaba que se perdía esa primera barrera de retención del tóxico.

De forma similar a numerosas intoxicaciones en peces, y de forma inespecífica, tanto las lamelas primarias como secundarias, mostraban una marcada hiperemia (Al-Ghanbousi, 2012), que terminaba como en nuestro caso en una erosión del epitelio de revestimiento y capilar, produciendo edemas y microhemorragias (Mallatt, 1985). Destacándose la producción de una tumefacción de las lamelas (Zodrow, 2004; Al-Ghanbousi, 2012).

Otro de los sistemas defensivos de las branquias que se ponía en funcionamiento es el que se refiere a las células mucosas. Y como pudimos comprobar, conforme se acentuaba la intoxicación, se producía una inflamación mucosa, con una hiperplasia e hipertrofia de las células mucosas superficiales y profundas (Lichtenfels, 1996).

Todo parecía indicar que el paso del toxico, por las branquias no afectaba directamente las yemas sensitivas, aunque en los últimos grupos debido a la presencia de edemas intersticiales, producían tumefacciones de las células de sostén, sin que se produjera ningún tipo de modificación sobre las células neurosensitivas.

Conclusiones

1. Hemos podido comprobar, tanto al microscopio óptico como electrónico, que las branquias respiratorias y sensitivas de zebrafish se alteran con el uso de disruptores endocrinos, en nuestro caso con 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD). Si bien, en la zona respiratoria de las branquias son más evidentes dichas modificaciones.

2. Con TCDD, tanto en las branquias respiratorias como sensitivas se muestran una desorganización general de todos sus componentes, haciéndose muy evidente en las concentraciones mayores del tóxico.

3. En las branquias respiratorias se destacan modificaciones graves de los revestimientos epiteliales que alteran las zonas de intercambio gaseoso.

4. Dentro de las alteraciones de la zona respiratoria de las branquias están significadas por una hiperemia de todos los capilares respiratorios, que se va acentuando conforme avanzamos en los lotes de mayor concentración de TCDD. Incluso en aquellos lotes en la que la concentración es máxima hay hemorragias.

5. Las células que se alteran y participan en las modificaciones generales de las branquias respiratorias son las células del cloro, que experimentan inicialmente una hiperemia de las mismas y posteriormente, según avanzamos en los lotes, una hipertrofia con pérdida de canaliculos intracelulares.

6. Aunque nosotros no hayamos podido demostrarlo, existe suficiente información para suponer que las células del cloro se modifican a causa de las alteraciones de las células de PRL de la adenohipófisis de los peces.

7. En relación a las yemas sensitivas de las branquias no respiratorias o branquias sensitivas destacamos que en si esta estructura nerviosa se mantiene aparentemente normal, solo en los lotes finales de la experiencia hay posibles modificaciones por las alteraciones del tejido vascular que las rodean.

8. Se destaca el mantenimiento de la capa de células mucosas que rodean a las yemas sensitivas y forman la parte esencial del cuerpo de la branquia sensitiva. Juegan un papel defensivo al aumentar la producción de mucosidad, evidenciándose en los lotes de mayor concentración de dioxina.

Bibliografía

Al-Ghanbousi R, Ba-Omar T, Victor R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*. A microscopic study. *Tissue and Cell* 44: 7–14. 2012

Alonso D. "Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de *Bufo arenarum*: análisis descriptivo y experimental". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003

Amlacher E. Fish as Food. Chapter 12: Rigor Mortis in fish. Academic Press INC (London) LTD. 1961

Ankley GT, Johnson RD. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR Journal* 45 (4): 469-483. 2004

Antunez P, Gil O, Costa O. Accumulation pathways of PCBs in sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Ecotoxicol. Environ. Restor* 4: 39-44. 2001

Arellano JM, Ortiz JB, González de Canales ML, Sarasquete C. Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *The Histochemical Journal* 33: 663–674. 2001

- Biagini FR, Oliveira JA, Fontanetti CS.** The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. *Micron* 40 (8): 839–844. 2009
- Bottero S, Monteverde M, Pedemonte F, Pedemonte R, Bertolotti L, Vigano A, Manidich A, Massari A.** In vivo and in vitro exposures of carp and tissues to graded concentrations of endocrine disrupting chemicals. *Annual New York Academy of Sciences* 1040: 234-238. 2005
- Campbell PM, Hutchinson TH.** Wildlife and endocrine disrupters: Requirements for hazard identification. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 17, Issue 1, pages 127–135. 1998
- Carson R.** *Silent spring*. Houghton Mifflin Harcourt. Boston pp 528. 1962
- Cengiz EI, Unlu E.** Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21 246–253. 2006
- Colborn T, Meyers JP, Dumanoski D.** *Nuestro Futuro Robado*. Editorial Ecoespaña S.L., Apto.16.158-28080, Madrid. 1997
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM.** Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* 101: 378-384. 1993
- Cowey C, Roberts R.** Patología de la nutrición de los teleósteos. *Patología de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa. p, 249-261. 1981
- Dunel-Erb S, Bailly Y, Laurent, P.** Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. *Journal of Applied Physiology* 53: 1342-1353. 1982
- Edwards TM, Moore BC, Guillette Jr LJ.** Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *International journal of andrology* 29: 109–121. 2006
- Eiras-Stofella DR, Charvet-Almeida P, Fanta E, Casagrande Vianna AC.** Surface Ultrastructure of the Gills of the Mulletts *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces). *Journal of Morphology* 247:122–133. 2001

Eiras-Stofella DR, Fank-de-Carvalho SM. Morphology of gills of the seawater fish *Cathorops spixii* (Agassiz) (Ariidae) by scanning and transmission electron microscopy. *Revta bras. Zool.* 19 (4): 1215 -1220. 2002

Ellis AE. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. *Stress and fish*, 1981

Erkmen B, Kolankaya D. The relationship between chloride cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost. *Lebistes reticulatus*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8(5): 888-892. 2009

Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85: 97-177. 2005

Ferguson JW, Absolon RF, Carlson TJ, Sandford BP. Evidence of Delayed Mortality on Juvenile Pacific Salmon Passing through Turbines at Columbia River Dams. *Transactions of the American Fisheries Society* 135:139–150. 2006

Ferguson RA, Tufts BL. Physiological Effects of Brief Air Exposure in Exhaustively Exercised Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications for "Catch and Release" Fisheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49 (6): 1157-1162, 10.1139/f92-129. 1992

Fernandes MN, Perna-Martins SA. Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricariidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 61(1): 69-78. 2001

Fernandez JD, Denny JS, Tietge JE. A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058–2062. 1998

Florindo LH, Leite CAC, Kalinin AL, Reid SG, Milsom WK, Rantin FT. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 209 (9): 1709-1715. 2006

Gonzales Y, Alberto J, Heredia B. El cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*). SIDALC. 1998

- Gray MA, Metcalfe CD.** Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to *p*-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1082-1086. 1997
- Guillette LJ Jr.** Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Horm IGF Res.* 10B: S45-50. 2000
- Guraya SS.** Follicular (or oocyte) atresia. *The Cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis:* 169-180. 1986
- Guzman C, Zambrano E.** Endocrine disruptor compounds and their role on the developmental programming of the reproductive axis. *Rev. invest. clín.* vol.59 (1): 73-81. 2007
- Henry TR, Spitsbergen JM, Hornung MW, Abnet CC, Peterson RE.** Early Life Stage Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and applied pharmacology* 142: 56-68. 1997
- Hill A, Howard CV, Strahle U, Cossins A.** Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology* 76: 392-399. 2003
- Ishibashi H, Watanabe N, Matsumura N, Hirano M, Nagao Y, Shiratsuchi H, Kohra S, Yoshihara S, Arizono K.** Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sciences* 77: 2643-2655. 2005
- Jacobs M, Ferrario J, Brne C.** Investigation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzo-*p* furans and selected coplanar biphenyls in Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chemosphere* 47: 183-191. 2002
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP.** Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 194-202 (1996).
- Katoh F, Shimizu A, Uchida K, Kaneko T.** Shift of Chloride Cell Distribution during Early Life Stages in Seawater-Adapted Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Zoological Science*, 17(1):11-18. 2000

Kime DE, Nash JP. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *Science Total Environment* 233: 123-129 (1999).

Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A. Effects of nonhyphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 171-181 (2000).

Kinnberg K, Toft G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (1): 16-24 (2003).

Lichtenfels AJFC, Lorenzi-Filho G, Guimarães ET, Macchione M, Saldiva PHN. Effects of Water Pollution on the Gill Apparatus of Fish. *Journal of Comparative Pathology* 115(1): 47-60. 1996

Lindholm C, Pedersen KL, Pedersen SN. Estrogenic response of bisphenol-A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 48 (2-3): 87-94 (2000).

Loonen H, Parsons JR, Govers HAJ. Dietary accumulation of PCDDs and PCDFs in guppies. *Chemosphere*, 23(8-10): 1349-1357. 1991

Machado MR, Fanta E. Effects of organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian archives of biology and technology* 46(3): 361-372. 2003

Mallatt J. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4): 630-648. 1985

Mancera JM, Laiz R, Martin MP. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology* 129: 95-103. 2002

Mandich A, Bottero S, Benfenati E, Cevasco A, Erratico C, Maggioni S, Massari A, Pedemonte F, Vigano L. In vivo exposure of carps to graded concentrations of bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 153: 15-24 (2007).

Mazon AF, Cerqueira CCC, Fernandes MN. Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. Environmental Research 88, Issue 1, January, Pages 52-63. 2002

McCormick, J. M., Stokes, G. N., Hermanutz, R. O. Oocyte atresia and reproductive success in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to acidified hardwater environments. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 18: 207-14 (1989).

Miles-Richardson, S. R., Pierens, S., Nichols, K. M., Kramer, V. J., Snyder, E. M., Snyder, S. A., Render, J. A., Fitzgerald, S. D., Giesy, J. P. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environment Resolution 80: 122-137 (1999b).

Noga EJ. Skin Ulcers in Fish: Pfiesteria and Other Etiologies. Toxicologic pathology 28 (6): 807-823. 2000

Oliveira JC, Vari RP, Ferraris CJ. A new species of "Whale Catfish" (*Siluriformes: Cetopsidae*) from the western portions of the Amazon basin. Proceedings of the Biological Society of Washington 114 (3): 574-578. 2001

Orn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L, Petersen GI. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. Aquatic Toxicology 65 (4): 397-411 (2003).

Orn S, Yamani S, Norrgren L. Comparison of vitellogenin Induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese Medaka after exposure to 17a-ethinylestradiol and 17b-trenbolone. Archives of Environmental Toxicology Contamination 51: 237-243. 2006

Pineda SH, Olivera AM, Urcuqui IS, Builes GJ, Trujillo BE. Polimorfismo genético en cachama blanca *Piaractus brachypomus* (*Characidae, Serrasalminae*) mantenida en cautiverio. II Congreso Colombiano de Acuicultura p: 49-50. 2004

Pisam M, Prunet P, Boeuf G, Jrambourg A. Ultrastructural features of chloride cells in the gill epithelium of the atlantic salmon, *Salmo salar*, and their modifications during smoltification. American Journal of Anatomy 183(3): 235-244. 1988

Pisam M, Prunet P, Boeuf G, Rambourg A. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *Journal of Anatomy* 187(1): 21-31. 1990

Rey, G., Meijide, F.J., Da Cuña R.H., Lo Nostro, F.L., Piazza, I.G., Babay P.A., Trudeau, V.L., Maggese, M.C., Guerrero, G.A. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 150: 298-306 (2009).

Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Nørum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. Vitellogenin induction by 17 α -estradiol and 17 μ -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and Physiology C. Toxicology and Pharmacology* 131 (4): 531-539 (2002).

Routledge, E.J., Sumpter, J.P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogen activity. *Journal Biology and Chemistry* 272: 3280-3288 (1997).

Russell DH, Buckley AR, Shah GN, Sipes IG, Blask DE, Benson B. Hypothalamic site of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol Appl Pharmacol.* 94(3):496-502. 1988

Sanchez JG, Speare DJ, Johnson GJ. Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramine-T treatment. *Journal of Fish Diseases* 20, 375–381. 1997

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. Identification of endocrine disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3): 302-314 (2003a).

Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C.J., Fennell, T.R. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 168: 225-234 (2000).

Sohoni, P.C.R.T., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science Technology* 35: 2917-2925 (2001).

Spano, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology* 66: 369-379 (2004).

Sumpter, J.P., Jobling, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103 (7): 173-178 (1995).

Tabata, A., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., Itoh, M., Yamada, T., Kamei, T., Magara, Y. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Science and Technology* 47 (9): 51-57 (2003).

Tanabe S. Dioxin Problems in the Aquatic Environment. *Marine Pollution Bulletin*, 19(8): 347-348. 1988

Torres GA, González S, Peña E. Anatomical, Histological and Ultrastructural Description of the Gills and Liver of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Morphology* 28(3): 703-712. 2010

Uchida K, Kaneko T, Yamauchi K, Hirano T. Morphometrical Analysis of Chloride Cell Activity in the Gill Filaments and Lamellae and Changes in Na⁺,K⁺-ATPase Activity During Seawater Adaptation in Chum Salmon Fry. *The Journal of Experimental Zoology*. 276:193-200. 1996

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 271-281 (2003).

Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4-t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 41 (4): 458-467 (2001).

Van den Heuvel MR, Power M, Richards J, MacKinnon M, Dixon DG. Disease and Gill Lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) Exposed to Oil Sands Mining-Associated Waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 334-341. 1999

Van der Ven LT, Wester PW, Vos JG. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry 22 (4): 908-913 (2003).

Verjan N, Iregui CA, Rey AL, Eslava PR. Micobacteriosis en peces ornamentales. Rev. Med. Vet. Zoot, 49: 51-58. 2002

Vives I, Grimalt JO, Ventura M, Catalan J, Rosseland BO. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redó, Pyrenees) Environ. Pollut. 2: 343-350. 2005

Weber D, Aguilar C, Petering DH, Ryder R.

Weber LP, Kiparissis Y, Hwang GS, Niimi AJ, Janz DM, Metcalfe CD. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 131: 51-59. 2002

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. Endocrinology 147 (6): 56-69 (2006).

Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. Environmental Health Perspectives 111 (8): 994-1006 (2003).

Wilson JM, Laurent P. Fish Gill Morphology: Inside Out. Journal of experimental zoology 293:192–213. 2002

Wong CKC, Wong MH. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. Aquatic toxicology 48 (4): 517-527. 2000

Woynarovich A, Woynarovich E. Reproducción Artificial de las Especies Colossoma y Piaractus, Una Guía Detallada para la Producción de Alevinos de Gamitana, Paco y Craña, Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero–FONDEPES, Lima, Peru Chapter 3: 67. 1998

Yang FX, Xu Z, Hui Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology part C 142: 77-84 (2006).

Zha J, Wang Z, Wang N, Ingersoll C. Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere* 66: 488-495 (2007).

Zodrow JM, Stegeman JJ, Tanguay RL. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 66 25–38. 2004

LEGISLACIÓN

Decreto 199/2005 de 20 de Septiembre. Modifica el Decreto 142/2002, de 7 de mayo, por el que se crea y regula el registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos. B.O.J.A. No. 189 of September 27, 2005.

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010. Directive on the protection of animals used for scientific purposes. EU Official Journal on October 20, 2010

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day-Study, Section 2, Guideline 204. Paris, France (1993).

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. Guideline 230. Paris, France (2009).

RD 1201/2005 de 10 Octubre. Real Decreto sobre protección de animales usados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. No. 252 of October 21, 2005