



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Programa de doctorado: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Tesis doctoral

Evaluación de la toxicidad del Bisfenol A sobre la reproducción y el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental

Evaluation of the toxicity of Bisphenol A in reproduction and development of zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model

Directores

Profa. Dra. María del Rosario Moyano Salvago

Prof. Dr. Nahúm Ayala Soldado

Autora de la tesis

Lilian de Paula Gonçalves Reis

12 de mayo de 2022

TITULO: *Evaluación de la toxicidad del Bisfenol A sobre la reproducción y el desarrollo del pez cebra (Danio rerio) como modelo experimental*

AUTOR: *Lilian de Paula Gonçalves Reis*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE LA TESIS: Evaluación de la toxicidad del Bisfenol A sobre la reproducción y el desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental

DOCTORANDO/A: Lilian de Paula Gonçalves Reis

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

La doctoranda ha mostrado un gran interés y capacidad de trabajo, actitud que ha mantenido desde el inicio de sus estudios de doctorado. Prueba de ello son los resultados obtenidos directamente derivados del trabajo realizado por la alumna, así como la publicación de un artículo científico y diversas comunicaciones a congresos.

En cuanto a los objetivos alcanzados, están dentro de la planificación inicial, ya que, tras la realización de las pruebas preliminares referentes a la fertilidad, fecundidad y viabilidad de los peces adultos, se llevaron a cabo las exposiciones pertinentes a Bisfenol A, así como la evaluación de la calidad de agua, comportamiento de los peces, fertilidad, viabilidad de los embriones, alteraciones de embriotoxicidad y malformaciones embrionarias.

Ha estado implicada en la redacción de un artículo con los principales y más concluyentes resultados obtenidos en el desarrollo de su tesis doctoral. Dicho artículo: "Evaluation of the Toxicity of Bisphenol A in Reproduction and Its Effect on Fertility and Embryonic Development in the Zebrafish (*Danio rerio*)", ha sido publicado en la *International Journal of Environmental Research and Public Health*

Igualmente, a lo largo de su doctorado ha presentado distintas comunicaciones y ponencias en congresos y jornadas científicas de relevancia nacional e internacional relacionadas con los resultados derivados de su tesis. Actualmente, forma parte del comité organizador del XXIV Congreso Español de Toxicología y VII Iberoamericano que tendrá lugar en Córdoba en noviembre de este mismo año.

En cuanto a su formación, aunque ha completado todas las actividades obligatorias previstas en su plan de formación, la doctoranda ha continuado desarrollando actividades formativas relacionadas con su formación investigadora.

Por ello, consideramos que la doctoranda ha mantenido una actitud muy positiva y proactiva de cara a la realización de su tesis doctoral, con una enorme capacidad de adaptación y de resolución de problemas, tal y como ha demostrado a lo largo de su trabajo.

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

Córdoba, 9 de mayo de 2022

Firma del/de los director/es

Fdo.: Mª del Rosario Moyano Salvago

Fdo.: Nahúm Ayala Soldado

*Detrás de cada línea de llegada hay una de
partida, detrás de cada logro hay otro desafío.*

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

A mis directores de tesis, la Profa. Dra. María del Rosario Moyano Salvago y el Prof. Dr. Nahúm Ayala Soldado, por aceptarme para la realización de esta tesis doctoral, por todo vuestro apoyo, paciencia y confianza en mi trabajo, durante todo el proceso. A todos los profesores y técnicos del departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología de la Universidad de Córdoba, por vuestra colaboración y ayuda en el proyecto.

A mis padres, Ademar y Maria por el apoyo incondicional durante mis estudios, por el sacrificio y ayuda para garantizar la realización del doctorado en un país tan lejano del nuestro. A mis hermanas, Eliane, Aline y a mi tía Lucinha que me incentivaron, creyeron en mí y en mis sueños.

A todas mis amigas (os) aquí de España, que se convirtieron en una segunda familia para mí, siempre animándome y con los cuales siempre pude contar. Siendo, además fundamentales para mí, al enseñarme las costumbres de este país. Agradezco a la familia García de Siles por todo el cariño y por recibirme en vuestra casa como una hija. También a aquellos amigos y familiares que ya no están entre nosotros.

No puedo dejar de mencionar a mis amigas (os) de Brasil, tanto las de Facultad de Veterinaria como de otros cursos, que a pesar de la distancia siempre estaban presentes, con la ayuda de la tecnología, escuchándome durante todos estos años y ofreciéndome vuestro apoyo siempre.

A todos los profesores del departamento de Parasitología de Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, en especial al Dr. Álvaro Martínez Moreno y al Dr. Fco. Javier Martínez Moreno por la oportunidad que me dieron de trabajar con ellos y por todos los conocimientos transmitidos durante en el tiempo en que estuve colaborando en el departamento.

Y lo más importante, agradezco a Dios por darme la fuerza y la determinación para emprender en esta aventura. Por haber sido mi pilar en todos estos años en todos los momentos.

Índice

Índice de Figuras	7
Índice de Tablas.....	9
Índice de Abreviaturas.....	11
Resumen	13
Abstract.....	14
1. Introducción.....	15
2. Revisión Bibliográfica.....	18
2.2. Utilización del Bisfenol A y formas de exposición.....	19
2.3. Biodegradación y metabolización del Bisfenol A	22
2.4. Toxicidad y efectos tóxicos relacionados con el Bisfenol A.....	24
2.4.1. Alteraciones en la reproducción y efectos teratogénicos del Bisfenol A	28
2.5. Legislación relacionada con el Bisfenol A	29
2.6. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	31
2.6.1. Mantenimiento del pez cebra.....	32
2.6.2. Reproducción.....	35
2.6.3. Embriogénesis	44
2.6.4. Pez cebra en estudios de ecotoxicología.....	50
3. Objetivos.....	52
4. Material y Métodos.....	53
4.1. Estandarización del medio acuático, de la fertilidad, la fecundidad y viabilidad embrionaria.....	53
4.1.1. Animales.....	53
4.1.2. Instalaciones y evaluación del medio acuático.....	54
4.1.3. Evaluación de la fecundidad y la fertilidad	55
4.1.4. Evaluación de viabilidad embrionaria	56
4.2. Exposición de los peces adultos al Bisfenol A.....	59
4.2.1. Animales.....	59
4.2.2 Fase de aclimatación.....	59
4.2.3 Evaluación del medio acuático	59
4.2.4. Reactivos	60
4.2.5. Determinación de Bisfenol A en agua y en los peces.....	60
4.2.6. Grupos experimentales	61

4.2.7. Evaluación de los peces adultos (reproductores): Signos de toxicidad, Fecundidad y Fertilidad.....	62
4.2.8. Evaluación de los embriones (F1)	63
4.2.9. Eutanasia.....	65
4.2.10. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural	65
4.3. Análisis estadístico	66
5. Resultados.....	67
5.1. Estandarización del medio acuático, de la fertilidad, la fecundidad y viabilidad embrionaria.....	67
5.1.1. Evaluación del medio acuático	67
5.1.2. Evaluación de la fecundidad y la fertilidad	74
5.1.3. Evaluación de viabilidad embrionaria	78
5.2. Exposición de los peces adultos al Bisfenol A	84
5.2.1. Evaluación del medio acuático	84
5.2.2. Evaluación de los peces adultos (reproductores).....	87
5.2.3. Evaluación de los embriones (F1)	91
5.2.4. Estudio Histopatológico	101
5.2.5. Cuantificación del Bisfenol A en el agua y en el homogeneizado del cuerpo de los peces	109
6. Discusión	111
6.1. Evaluación del medio acuático	111
6.2. Evaluación de los peces adultos (reproductores).....	116
6.3. Evaluación de viabilidad embrionaria	120
6.4. Evaluación de los embriones (F1)	122
6.5. Concentración de BPA en los peces y en el agua.....	126
6.6. Evaluación histopatología de peces expuestos al Bisfenol A.....	127
7. Conclusiones	131
8. Referencias Bibliográficas.....	133

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del Bisfenol A	188
Figura 2. Concentraciones medias de BPA en alimentos envasados y no envasados... ..	211
Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos.....	25
Figura 4. Hembra (superior) y macho (inferior) de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).. ..	311
Figura 5. Anatomía del pez cebra macho.	366
Figura 6. Anatomía del pez cebra hembra.	388
Figura 7. Diagrama esquemático de la espermiogénesis en peces	422
Figura 8. Esquema del mecanismo de control endocrino e interacción folicular en peces teleósteos.. ..	433
Figura 9. Desarrollo embrionario del pez cebra (<i>Danio rerio</i>) desde de la fecundación, (cigoto) hasta la edad adulta.	455
Figura 10. Cigoto 1 célula (0 – 45 min post fertilización)	455
Figura 11. División celular de los embriones. En A y B se observan dos células y en C un embrión con múltiples células, en los tiempos de 45 min a 2¼ hpf.....	466
Figura 12. Fase de blástula embriones con 3 a 6 hpf (A, B y C en orden cronológico, de 2¼ - 5¼ hpf).. ..	466
Figura 13. Fase de gástrula, 8 hpf.....	477
Figura 14. Fase de segmentación embriones de entre 10 y 24 hpf (figuras en orden cronológico).....	477
Figura 15. Fase de faríngrula, embriones de 48 hpf.	488
Figura 16. Proceso de eclosión de un embrión (A) y larva tras eclosión (B) a las 72 hpf.	488
Figura 17. Larva de aproximadamente 120 hpf.....	49
Figura 18. Acuario de reproducción utilizados en los ensayos con el pez cebra.	555
Figura 19. Placas de Petri separadas por grupos de tratamiento para la prueba del azul de metileno, incubadas en estufa a 27 °C.	577
Figura 20. Esquema de la distribución de los grupos experimentales y distribución de los animales en el sistema.	622
Figura 21. Representación esquemática de la reproducción, colecta, evaluación y almacenamiento de los embriones de pez cebra.	644
Figura 22. Promedio de los valores mensuales de pH en los acuarios A, B, Reposición.	688
Figura 23. Promedio de los valores mensuales de Temperatura (°C) en los acuarios A, B, Reposición.	69
Figura 24. Promedio de los valores mensuales de conductividad (µS) en los acuarios A, B, Reposición.	700

Figura 25. Promedio de los valores mensuales de dureza (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.	711
Figura 26. Promedio de los valores mensuales de alcalinidad (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.	71
Figura 27. Promedio de los valores mensuales de nitrato (mg/L) en los acuarios A, B, Reposición.	722
Figura 28. Promedio de los valores mensuales de nitrito (mg/L) en los acuarios A, B, Reposición.	733
Figura 29. Promedio de los valores mensuales de amonio (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.	733
Figura 30. Valores medios de temperatura y humedad de la sala donde estaban instalados los acuarios. Correlación prueba de Pearson r ($p < 0.05$).	744
Figura 31. Promedio de la fecundación (FEC) de cada grupo de reproductores en dos momentos, en la preexposición y exposición. (*) medias entre cada momento son diferentes según la prueba t no pareada ($p < 0.05$).	900
Figura 32. Promedio de la fertilidad (FER) de cada grupo de reproductores en dos momentos, en la preexposición y exposición. Las medias entre cada momento son iguales según test t no pareada ($p < 0.05$).	911
Figura 33. Huevo de pez cebra aparentemente normal (A), y huevos con indicios de coagulación (A1 y A2).	933
Figura 34. Promedio del total de embriones y/o larvas viables y eclosiones hasta 96 hpf.	955
Figura 35. Promedio de las tasas de mortalidad e individuos con señales de embriotoxicidad hasta 96 hpf.	966
Figura 36. Embriones y larvas normales (grupo de Control) y con indicadores característicos de embriotoxicidad, procedentes de grupos tratados con BPA..	999
Figura 37. Comparación entre el promedio de alteraciones en el desarrollo embrionario en la fase de preexposición (PPEEX) y después de la exposición (EXPO) de los peces adultos al BPA en distintas concentraciones.	1011
Figura 38. Parénquima ovárico en el pez cebra expuesto durante 21 días al BPA, más el grupo de control, evaluado con microscopio óptico y electrónico.	1044
Figura 39. Parénquima testicular del pez cebra expuesto durante 21 días al BPA más el grupo de control, evaluado con microscopios ópticos y electrónico. a.	10808

Índice de Tablas

Tabla 1. Efectos tóxicos relacionados con el Bisfenol A en la reproducción, desarrollo, metabolismo y otros.	266
Tabla 2. Características generales de los tipos de atresia folicular en peces.....	399
Tabla 3. Promedio y desviación estándar general de los parámetros de calidad de agua, pH, temperatura, conductividad, dureza y alcalinidad, en los acuarios A, B y Reposición	677
Tabla 4. Huevos por cruce, embriones, coagulados y embriones viables a las 2 hpf, además del cálculo de la fecundidad y fertilidad de los desoves efectivos en cuatro grupos de reproductores (R1, R2, R3 y R4) puestos en cruces en seis momentos distintos. ...	766
Tabla 5. Evaluación a las 24 hpf, con el número de coagulados, embriones viables y la fertilidad comparada con los embriones viables a las 2 hpf, en los cuatro grupos de reproductores (R1, R2, R3 y R4).....	777
Tabla 6. Medias y desvíos del total de embriones viables por placas y tasas de muertes en 48 horas post fertilización en los distintos grupos.....	78
Tabla 7. Medias y desvíos de la tasa de eclosión a las 48, 72 y 96 hpf y de malformaciones en los distintos grupos.	79
Tabla 8. Prueba con una carga baja de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, coagulados en 24 hpf y tasas de eclosión a las 72 y 96 hpf en los distintos grupos	800
Tabla 9. Prueba con una carga baja de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, coagulados en 24 hpf y tasas de eclosión a las 72 y 96 hpf en los distintos grupos	811
Tabla 10. Prueba con una carga alta de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, tasa de muertes en 24 y 48 hpf en los distintos grupos	822
Tabla 11. Carga alta. Medias y desvíos de la tasa de eclosión en 48, 72 y 96 hpf y malformaciones en los distintos grupos.....	833
Tabla 12. Promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad de agua en la preexposición (GP1, GP2, GP3 y GP4) y en la exposición al BPA (G1, G2, G3 y Control)	855
Tabla 13. Promedio del total de huevos desovados, los embriones viables, la fecundidad (FEC) y fertilidad (FER) en cada grupo de la preexposición.....	877
Tabla 14. Promedio del total de huevos desovados, los embriones viables, la fecundidad (FEC) y fertilidad (FER) entre las réplicas de cada grupo en la fase de exposición de los peces adultos.....	889

Tabla 15. Promedio del total de embriones y larvas por tiempo, alteraciones encontradas en cada tiempo de evaluación, tasas de muertes y de eclosión en los grupos GP1, GP2, GP3 y GP4.....	922
Tabla 16. Promedio del total de embriones y larvas por tiempo, alteraciones encontradas en cada tiempo de evaluación, tasas de muertes y de eclosión en los grupos expuestos a distintas concentraciones de BPA más el grupo control	944
Tabla 17. Número medio entre las réplicas, en cada grupo, referente a las alteraciones de embriotoxicidad en embriones y/o larvas en los distintos tiempos de evaluación post fertilización.....	97
Tabla 18. Clasificación de las alteraciones en los ovarios de peces cebras en los distintos grupos experimentales, valorados según la gravedad de lesión histopatológica y el porcentaje de animales que las presentaron.....	1033
Tabla 19. Clasificación de las alteraciones testiculares en peces cebras en los distintos grupos experimentales, valorados según la gravedad de lesión histopatológica y el porcentaje de animales que las presentaron.....	1077
Tabla 20. Concentración de BPA en muestras de agua de los acuarios de prueba en distintos tiempos.....	109
Tabla 21. Concentración de BPA en homogeneizado de cuerpo de peces expuestos más el grupo Control.....	1100

Índice de Abreviaturas

AM – Azul de Metileno

AMPC - Adenosin Monofosfato Cíclico

BPA – Bisfenol A

BPAF - Bisfenol AF

BPE - Bisfenol E

BPF - Bisfenol F

BPM - Bisfenol M

BPZ - Bisfenol Z

BPS - Bisfenol S

CYP – monooxigenasas

DE - disruptor endócrino

DHP - 17 α , 20 β -DHP

DL₅₀ - dosis letal 50

E2 – estrógeno

EFSA - *European Food Safety Authority*

FEC - fecundidad

FER - fertilidad

FET - *Fish Embryo Acute Toxicity*

FSH - hormona foliculoestimulante

FSHR – receptor de la hormona foliculoestimulante

GnRH - hormona liberadora de gonadotropina (II y III)

GTH - gonadotropina (I y II)

HAP - Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HE – hematoxilina eosina

HPG - sistema hipotalámico-pituitario-gonadal

hpf – horas post fertilización

HPLC - cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography*

IGS - índice gonadosomático

LC-MS/MS – cromatografía líquida con espectrometría de masas

LH - hormona luteinizante

LHR – receptor de la hormona luteinizante

LME - límite de migración específica

MBP - 4-metil-2,4-bis (p-hidroxifenil) pent-1-eno

NKB - neuroquinina B

OECD - *Organisation for Economic Cooperation and Development*

PCB - bifenilos policlorados

p.c. - peso corporal

PCB - policlorados

RE - receptores estrogénicos

RE α , RE β – receptores de estrógenos α y β

ROS - especies reactivas de oxígeno

TH - hormonas tiroideas

UGT - UDP-glucuronosiltransferasa

Vtg - vitelogenina

ZET - *Zebrafish Embryotoxicity Test*

11-KT - 11-cetotestosterona

Resumen

El bisfenol A es una sustancia química utilizada habitualmente en la fabricación de productos de plástico. Su inhalación o ingestión a partir de partículas en suspensión, agua y/o alimentos contaminados puede desencadenar efectos tóxicos relacionados con la disrupción endocrina, dando lugar a alteraciones hormonales, reproductivas en humanos y animales. El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo experimental ideal para los estudios de toxicidad (en adultos y embriones), por la facilidad de mantenimiento y capacidad reproductiva. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar los efectos tóxicos del Bisfenol A sobre la reproducción y el desarrollo embrionario en una generación tras la exposición de los peces adultos, y de forma complementaria, se hizo previamente la estandarización de los parámetros de calidad de agua de los acuarios, así como de la capacidad reproductiva de los peces. Fueron utilizados un total de 80 peces cebra, machos y hembras, divididos en cuatro grupos por duplicado ($n = 20$) fueron expuestos a concentraciones de BPA de 500, 50 y 5 $\mu\text{g. L}^{-1}$, junto con un grupo de control. Los peces se mantuvieron en acuarios de reproducción durante 21 días, donde se observó la fecundidad y la fertilidad. Los embriones obtenidos en los cruces se incubaron en un medio sin Bisfenol A y se evaluaron posibles indicadores de embriotoxicidad. Fue realizado el estudio histopatológico de las gónadas de los peces adultos y la cuantificación de la concentración de Bisfenol A en el homogeneizado del cuerpo. La fecundidad de los peces adultos tras la exposición a 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de Bisfenol A, ha disminuido significativamente. Los embriones provenientes de tales reproductores fueron los que presentaron con mayor frecuencia signos de embriotoxicidad, como mortalidad y malformaciones cardíacas y musculoesqueléticas. Las concentraciones de Bisfenol A encontrada en el homogeneizado de cuerpo de los peces, fue proporcional a la concentración a que fueron expuestos. En los estudios histopatológicos de los individuos adultos expuestos a la sustancia, se encontraron alteraciones en la maduración de los ovocitos y en la formación de los espermatazoides. Dichas alteraciones se relacionaron directamente con la acción del Bisfenol A, afectando a la fecundidad, fertilidad en ambos sexos, así como a la viabilidad de su descendencia, de forma proporcional a los niveles de Bisfenol A a los que estuvieron expuestos, por lo que nuestros resultados aportan más información al asociar los efectos tóxicos en la reproducción de los peces adultos y sobre la descendencia, lo que puede, consecuentemente, afectar las siguientes generaciones.

Abstract

Bisphenol A is a chemical commonly used in the manufacture of plastic products. Its inhalation or ingestion from particulate suspension, contaminated water and/or food can trigger toxic effects related to endocrine disruption, leading to hormonal and reproductive alterations in humans and animals. The zebrafish (*Danio rerio*) is an ideal experimental model for toxicity studies (in adults and embryos), due to its ease of maintenance and reproductive capacity. The main objective of this work was to evaluate the toxic effects of Bisphenol A on reproduction and embryonic development in one generation after exposure of adult fish, and in a complementary way, the standardisation of the water quality parameters of the aquariums, as well as the reproductive capacity of the fish, was previously carried out. A total of 80 zebrafish, males and females, divided into four groups in duplicate ($n = 20$) were exposed to BPA concentrations of 500, 50, and 5 $\mu\text{g. L}^{-1}$, along with a control group. The fish were kept in reproduction aquariums for 21 days, where fecundity and fertility were observed. The embryos obtained in the crosses were incubated in a BPA-free medium and observed for signs of embryotoxicity. A histopathological study (under optical and electron microscopes) was performed of adult fish gonads and quantification of Bisphenol A concentration in the body homogenate were performed. The fecundity of adult fish after exposure to 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ of Bisphenol A significantly decreased. Embryos from such broodstock showed the most frequent signs of embryotoxicity, such as mortality and cardiac and musculoskeletal malformations. The concentrations of Bisphenol A found in the body homogenate of the fish were proportional to the concentration to which they were exposed. In the histopathological studies of adult individuals, alterations were found in ovocyte maturation and in spermatozoid formation in the groups exposed to the chemical. Those alterations were directly related to BPA action, affecting fecundity, fertility in both sexes, as well as the viability of their offspring, proportionally to the BPA levels to which they were exposed, so that our results provide more information by associating the toxic effects on the reproduction of adult fish and on the offspring, which may consequently affect the next generation.

1. Introducción

El bisfenol A (BPA) es un compuesto orgánico sintético que se utiliza en la síntesis de carbonatos, resinas epoxi y papel térmico (Hoseinifar et al., 2018; Michałowicz, 2014; Vasiljevic y Harner, 2021). Proporciona a los plásticos de policarbonato, por ejemplo, una mayor resistencia a las temperaturas altas y bajas, dureza, tenacidad y resistencia a muchos ácidos y aceites (Bousoumah et al., 2021). En 2020, la industria europea del plástico ha logrado una balanza comercial positiva de 16 millones de euros, con una demanda de aproximadamente 49.1 millones de toneladas de plástico (PlasticsEurope, 2021). La demanda mundial de BPA alcanzó los 7.7 millones de toneladas en 2015 y se espera que supere los 10.6 millones en 2022 (Czarny-Krzywińska et al., 2022).

El uso del BPA en diversos bienes de consumo habitual, como botellas, envases de alimentos, etc., podría conducir a la contaminación de los alimentos, el medioambiente, los seres humanos y los animales. La exposición puede producirse por vía oral, inhalatoria (Vasiljevic y Harner, 2021) o cutánea, mediante el contacto directo o indirecto con el producto (Geens et al., 2012). El BPA se considera un xenoestrógeno o disruptor endocrino (DE), capaz de actuar en el organismo animal y alterar las funciones endocrinas. Lo hace imitando o bloqueando las hormonas endógenas, actuando como agonista de los receptores de estrógenos, teniendo un efecto similar al 17β -estradiol, y alterando la producción de hormonas tiroideas (Goto et al., 2006; Michałowicz, 2014; Schug et al., 2011). En los mamíferos, la metabolización del BPA en el organismo tras su ingestión se realiza en el hígado (Geens et al., 2012), y en los peces, además de en el hígado, también puede ocurrir en el intestino, como se ha evidenciado en la carpa (*Cyprinus carpio*) (Kang et al., 2007).

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleósteo muy utilizado en la investigación durante las últimas décadas. Debido a la similitud de su genoma con el humano, su capacidad de reproducción durante todo el año, su pequeño tamaño y su bajo coste de mantenimiento, se ha convertido en un buen modelo experimental para estudios genéticos y de toxicología (Dai et al., 2014; Howe et al., 2017). Para alcanzar buenos resultados en la investigación con el pez cebra en edad reproductiva, es necesario mantener un medio acuático en condiciones óptimas, la densidad animal por litro en proporciones adecuadas, alimentación equilibrada y control de los parámetros de calidad de agua, para garantizar

la fiabilidad de los resultados en los distintos estudios, sea de comportamiento, toxicidad, reproducción y otros (Lawrence 2007; OECD TG 229, 2012). Todo eso para evitar el estrés de los animales, que es uno de los factores más críticos para la salud de los peces (Zahangir et al., 2015). La calidad del medio también se aplica a los embriones cuanto, al medio embrionario utilizado, que debe mantener parámetros fisicoquímicos adecuados (como por ejemplo una conductividad más alta) y mínimo de contaminantes para que pueda permitir el desarrollo adecuado de los embriones en condiciones normales (Brand et al., 2002).

Otra ventaja de la utilización del pez cebra es por su alta sensibilidad a las sustancias químicas presentes en el agua permite su uso en estudios de evaluación de la toxicidad y teratogenicidad de sustancias disruptoras endocrinas como el BPA (Busquet et al., 2014; Noyes et al., 2016). El empleo de embriones de pez cebra en ensayos de toxicidad también se considera una alternativa al uso de modelos animales; los ensayos de embriotoxicidad del pez cebra, *Zebrafish Embryotoxicity Test* (ZET) (Beekhuijzen et al., 2015) y/o el ensayo de toxicidad aguda en embriones de peces, *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET), pueden ser un modelo predictivo para los ensayos estándar en mamíferos para la toxicidad prenatal del desarrollo (OECD TG 236, 2013).

Además, existe una preocupación constante por los efectos de los DE en las generaciones posteriores. Por ello, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) está estandarizando actualmente una prueba de reproducción ampliada de una generación específica para el pez cebra, *Zebrafish Extended One-Generation Reproduction Test* (ZEOGRT) (OECD 150, 2018). Estas pruebas, basadas en el pez cebra, se emplean también para la identificación de los efectos teratogénicos de una determinada sustancia en los embriones. Los puntos finales de esa prueba determinan, en embriones y larvas, signos de toxicidad en el desarrollo, así como la presencia o ausencia de indicadores característicos que deben ser evaluados en cada etapa, como la morfología del embrión, la formación de somitas, el movimiento embrionario y los latidos del corazón, además de observar posibles alteraciones teratogénicas a nivel cefálico, caudal, cardíaco y/o morfológico (Pelayo et al., 2012; OECD TG 236, 2013; Beekhuijzen et al., 2015).

Hay algunas pruebas de que la exposición a los DE podría activar o inactivar selectivamente partes del genoma, causando efectos epigenéticos y desencadenando alteraciones en la reproducción y en las generaciones venideras (Chen et al., 2015; Akhter

et al., 2018; Santangeli et al., 2019). Actualmente, el BPA está clasificado como tóxico para la reproducción de categoría 1B según el Reglamento de la Unión Europea (UE) (Reglamento 2016/1179) por efectos adversos sobre la función sexual y la fertilidad o sobre el desarrollo, por lo cual está restringido en numerosos productos de consumo principalmente para niños. Por tanto, los estudios de teratogenicidad son necesarios para completar los de los DE.

En 2020, la Unión Europea añadió otra modificación a la Directiva 98/83/CE relativa a la calidad del agua de consumo humano con la nueva Directiva (UE) 2020/2184, en la que se redujo la concentración aceptable de sustancias DE, microplásticos, incluido el BPA. El foco principal de la *European Food Safety Authority* (EFSA) desde 2015 ha sido especialmente el BPA, que se añadió a esta Directiva con un valor paramétrico basado en la salud de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ en el agua (Directive 2020/2184; EFSA, 2021). Teniendo en cuenta el riesgo de estar expuesto a los DE, este estudio tiene como objetivo determinar los cambios causados por el BPA en ovarios y testículos de peces adultos expuestos a él, así como evaluar las posibles alteraciones que podría causar esta exposición en el desarrollo embrionario de la descendencia.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. Bisfenol A: Antecedentes y características químicas

El BPA es una sustancia química artificial utilizada, en cantidades masivas, en la síntesis de policarbonatos, resinas epoxídicas y papel térmico (Hoekstra y Simoneau, 2013, Michalowicz et al., 2014). Fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Alexander P. Dianin a través de la una reacción de condensación de dos moléculas de fenol y una molécula de acetona en presencia de un catalizador como cloruro de hidrógeno o resina de intercambio iónico (Michalowicz et al., 2014). En los años 30, el Bisfenol A fue analizado a fondo y durante las investigaciones se descubrió su actividad estrogénica, semejante al 17 β -estradiol (Rubin, 2011).

En condiciones normales de temperatura y presión, el BPA es encontrado en forma sólida o en polvo de color blanco. Posee baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos (Infosan, 2009; Lusher *et al.*, 2017). Pertenece al grupo de los fenoles, con formula química 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propano, C₁₅H₁₆O₂ (Figura 1), de molaridad M= 228.29 g mol⁻¹ (Infosan, 2009; Vandenberg et al., 2012).

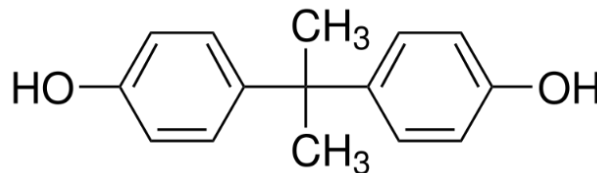


Figura 1. Estructura química del Bisfenol A

En 2017, el BPA fue incluido en la lista de sustancias extremadamente preocupantes por su capacidad de alteración endocrina, con posibles efectos tóxicos en la salud humano de forma tan preocupante como las sustancias cancerígenas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción (ECHA, 2018; Directive 2184/2020; EFSA, 2021). Además, los análogos y sustitutos del BPA, tales como el bisfenol S (BPS), bisfenol AF (BPAF), bisfenol F (BPF) y bisfenol E, M y Z (BPE, BPM, BPZ respectivamente) entre otros, también presentan potencial tóxico como DE, incluso mayor que el propio BPA, por eso siguen las

investigaciones de toxicidad de los bisfenoles para mejor esclarecimiento del riesgo de cada uno a la salud pública (ECHA, 2018, 2022; den Braver-Sewradj et al., 2020).

2.2. Utilización del Bisfenol A y formas de exposición

El BPA es uno de los productos químicos más producidos mundialmente, se utiliza principalmente en la fabricación de policarbonato y resinas epoxi-fenólicas (FAO, 2017; Czarny-Krzywińska et al., 2022). Los productos de plástico de policarbonato son de aspecto rígido transparente que se usa tanto para hacer envases de alimentos como otros muchos objetos no relacionados con la alimentación (González et al., 2019) Incluyen una gran variedad de bienes de consumo común que entran en contacto con alimentos, como biberones, vajillas, microondas, recipientes para alimentos, botellas de agua, botellas de leche y bebidas, equipos deportivos, CD y DVD, equipos de procesamiento y tuberías de agua (AESAN, 2021). Las resinas epóxicas son utilizadas como un revestimiento protector de latas con alimentos en conserva, bebidas y como un recubrimiento en tapas metálicas para frascos y botellas de vidrio, incluidos los contenedores utilizados para la fórmula infantil (AESAN, 2021; Vasiljevic y Harner, 2021).

Además, el BPA también puede ser utilizado como aditivo en otros polímeros (PE, PP, PVC) y es uno de los aditivos más comunes utilizados en los procesos de fabricación y de los macros y microplásticos (poseen entre 5 ng/g a 200 ng/g de BPA, encontrados en microplástico retirados del océano) (FAO, 2017). Los microplásticos y los macroplásticos contienen una mezcla de productos químicos añadidos durante la fabricación contaminantes del entorno (FAO, 2017), tal como el BPA y demás compuestos como bifenilos policlorados (PCB), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas clorados y trazos de metales. Tales sustancias pueden ser bioacumulables en los organismos y ocasionar problemas en corto a largo plazo (FAO, 2017). La preocupación con la contaminación por los plásticos se hace cada vez necesaria una vez que los datos toxicológicos (como la toxicocinética) sobre los efectos de los micro y nanoplásticos, son esencialmente deficientes e indispensables para la evaluación de la seguridad del riesgo alimentario (FAO, 2017). En general, después de la ingestión oral, cerca de 90% de los micro y nanoplásticos ingeridos son excretados a través de las heces, aunque los de menor partícula pueden translocarse a través del epitelio intestinal, causando exposición sistémica (EFSA, 2016). Tal exposición puede conducir a la inmunotoxicidad con acción

inmunosupresora, puede aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas y autoinmunes, respuestas inflamatorias anormales (EFSA, 2016).

Los seres humanos y animales pueden entrar en contacto con el BPA por diferentes vías de exposición: vía oral, vía inhalatoria y vía cutánea (González et al., 2019). Siendo la fuente de contaminación más importante a través de la dieta, agua, polvo, el contacto con papel térmico, materiales dentales, y dispositivos o aparatos utilizados en medicina (Geens et al., 2012; Kolatorova et al., 2018).

Por si tratar de un producto que está directamente en contacto con los alimentos, la contaminación por la dieta tiene especial importancia. Además, su gran utilización en los últimos años hace con que el BPA sea encontrado en el medioambiente, en agua, suelo, peces, animales silvestres, como también en tejidos humanos (sangre, cordón umbilical, leche y grasa) (Geens et al., 2012). La población general también puede estar expuesta al BPA por la inhalación de polvo y los trabajadores industriales normalmente están expuestos tanto por inhalación como por contacto dérmico, durante el proceso de producción de productos plásticos (He et al., 2009; Geens et al., 2012; Bousoumah et al., 2021).

Los policarbonatos pueden liberar más fácilmente el BPA en al agua o alimento con la baja del pH en soluciones, con el uso prolongado de botellas de plástico y biberones de niños, asociado también a la exposición de tales materiales a un aumento de temperatura (Mercea, 2009; Nam et al, 2010, Michalowicz *et al.*, 2014). Las resinas epoxi protegen los alimentos de la contaminación por metales durante su esterilización y almacenamiento. Estudios demuestran que la temperatura de calentamiento tenía un efecto significativo en la migración de BPA, más significativo comparado al tiempo de calentamiento (Kang et al., 2003). Además, las soluciones de aceite vegetal y cloruro de sodio favorecen también la migración del BPA al alimento (Vandenberg et al., 2007). Las categorías de alimentos envasados donde se observaron las concentraciones más relevantes de BPA fueron cereales, legumbres, carnes, pescados, condimentos, comida preparada, *snacks* y helados (EFSA, 2015; García et al., 2015).

La exposición de los animales y de la materia prima vegetal al BPA lleva a una consecuente contaminación de la carne y la acumulación de BPA en el medio ambiente. Se detectó BPA en concentraciones significativas en productos cárnicos de 0.49–56 g/kg, pescado de 7.1–102.7 g/kg, verduras y frutas de 11.0–95.3 g/kg y cereales de 1.0–3.8 g/kg

(Michalowicz, 2014). En un estudio por hecho por EFSA (2015) fueron evaluados la presencia de BPA en distintos productos envasados, como muestra la Figura 2, adaptada de García et al. (2015).

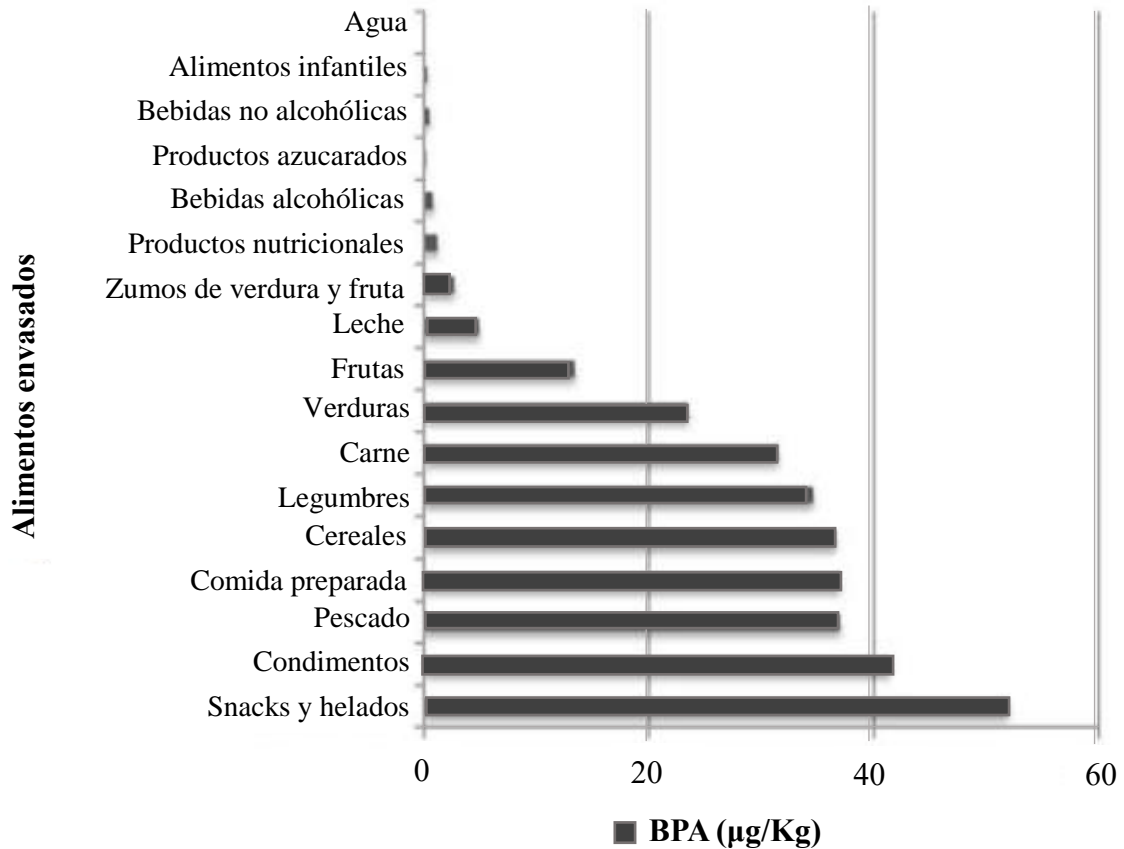


Figura 2. Concentraciones medias de BPA en alimentos envasados y no envasados. Se observa una mayor concentración de BPA en productos envasados como snacks y helados.

La evaluación de la exposición humana diaria al BPA en la población en general, mediante biomonitorización de la excreción orinaría de sus metabolitos, ha variado ampliamente desde 0.16 µg/kg de peso corporal (p.c.) en Estados Unidos y de 0.04 – 0.08 peso corporal µg/kg p.c. en Japón (Infosan, 2009). En Europa, la ingesta diaria de BPA según datos de 2015, fueron de aproximadamente 0.13 µg/kg p.c. al día (FAO, 2017). La ingesta diaria tolerable de BPA, según EFSA (2015), es de 4 µg/kg de p.c. al día.

En los casos de ingestión por el consumo de agua contaminada, es conocido que, en los medios acuáticos, el BPA ha sido detectado en aguas superficiales, aguas subterráneas,

aguas residuales, aguas de escorrentía y lixiviados de rellenos sanitarios (Vermeissen et al., 2017). Según distintas investigaciones, la concentración de BPA en diferentes fuentes de agua fue: agua de río (Portugal) 28.7–98.4 g/dm³ (Rocha et al., 2013); lodos de aguas residuales sin tratar (Canadá) 36.7 mg/kg, agua de grifo (Europa, Asia, Norte América) 0.099–0.317 g/dm³ (Arnold et al., 2013); agua embotellada (Francia) 0.07–4.21 g/dm³ (Colin et al., 2013).

Ciudades como Osaka, Japón mostró la presencia de BPA en la concentración media de 740 g/dm³ en aguas subterráneas; en Portugal, menos de la mitad de los ríos presentaron concentraciones 28.7 a 98.4 ng/dm³. En Alemania se encontraron altas concentraciones de BPA en el agua del río Elba en las concentraciones de 4–92 g/dm³ y en sus sedimentos 10–380 g/kg (Stachel et al., 2003; Kawagoshi et al., 2003; Rocha et al., 2013).

La exposición aérea al BPA ocurre por su emisión en la atmosfera (aire y polvo) por la actividad antropogénicas y un resultado de la destrucción térmica de los materiales que contienen BPA, con liberaciones anuales de cerca de 100 toneladas al año (Michalowicz, 2014). Los informes actuales sobre los niveles de BPA en el aire son limitados y se centran en el análisis de los efluentes y de las aguas superficiales (debido a la propensión del BPA a su distribución ambiental en el agua), además la presencia de BPA en la parte del mundo en desarrollo es especialmente preocupante debido a la falta de regulaciones y a las incineraciones incontroladas de residuos domésticos e importados (Vasiljevic y Harner, 2021).

2.3. Biodegradación y metabolización del Bisfenol A

El BPA encontrado en la naturaleza y animales una vez contaminados por distintas formas. Su biodegradación puede ocurrir por microorganismos (como bacterias y hongos) distribuidos en el medio ambiente, y su metabolización por enzimas existentes en plantas y animales (Kang et al., 2006; Michalowicz, 2014).

En el medioambiente acuático, las bacterias capaces de biodegradar BPA se distribuyen en el agua de los ríos. La vida media o el tiempo para la biodegradación del BPA tiene como promedio menos de 5 días, en condiciones aeróbicas (West et al., 2001; Kang et al., 2006). Aunque hay muchas bacterias capaces de degradar el BPA en las aguas de los ríos, las bacterias con alta biodegradabilidad del BPA son limitadas (*Pseudomonas sp.*,

Pseudomonas putida y *Streptomyces sp.* con aproximadamente 90% de efectividad) y no siempre son capaces de realizar la degradación completa del BPA (Kang et al., 2006; Zhang et al., 2007; Kamaraj et al., 2014). La biodegradación del BPA por los hongos puede ocurrir, pero tal como ocurre con la degradación bacteriana, los tipos de hongos con alta capacidad de degradabilidad del compuesto también son limitados (Yim et al., 2003; Chai et al., 2005).

El medio acuático también cuenta con las algas en el proceso de degradación de compuestos tóxicos. Las especies de algas verdes, *Chlorella fusca* var. *Vacuolata* y *Monoraphidium braunii*, por ejemplo, podrían biodegradar el BPA y eliminar su actividad estrogénica, dependiente de la concentración del compuesto en agua (Hirooka et al., 2005; Gattullo et al., 2012). También las plantas terrestres pueden actuar en degradación, filtración y eliminación de sustancias tóxicas. En la biodegradación del BPA por enzimas vegetales, el pH y la temperatura ejercen una influencia importante en la eliminación oxidativa de BPA (Xuan et al., 2002; Yoshida et al., 2002; Sakuyama et al., 2003; Kang et al., 2006). Los metabolitos de tal biodegradación no mostraron actividad estrogénica, lo que ha demostrado que la glicosilación del BPA en plantas ocurre de manera similar al metabolismo del BPA en las algas, llevando a la disminución del efecto tóxico de esta sustancia (Nakajima et al., 2002).

La metabolización del BPA en los animales también es una forma de biodegradación, una vez que ocurre su transformación en metabolitos más o menos tóxicos, o su eliminación de forma inalterada (Michalowicz, 2014). Los peces normalmente son muy sensibles a cualquier alteración en el medio acuático, de este modo, la contaminación por sustancias como el BPA puede llevar a alteraciones en la fisiología de estos animales en una o más generaciones. En peces cebra (*Danio rerio*), tras la exposición al BPA se identificaron dos metabolitos, el sulfato de BPA y ácido glucurónico de BPA. El metabolismo puede ocurrir en el intestino como evidenciado en carpas (*Cyprinus carpio*), donde se ha detectado un aumento de la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), y posterior transformación del bisfenol A en glucurónido de BPA, principalmente. Los niveles de metabolismo de BPA pueden variar con las especies de peces. Por ejemplo, el metabolismo del BPA fue más rápido en el hígado de pez cebra que en el hígado de trucha arco iris. Al transferir el pez cebra a un medio sin contaminación, la eliminación de 30% del compuesto puede realizarse en dos horas (Yokota et al., 2002; Kang et al., 2006).

En mamíferos, la metabolización del BPA en el organismo tras su ingestión, se hace el hígado con mucha rapidez, convirtiéndose en un metabolito muy soluble: BPA-glucuronido (BPA-GLU) (Völkel et al., 2002). Una parte se conjuga con sulfato (BPA-Sulfato), otra parte se queda libre y también se producen metabolitos (Geens et al., 2012). La parte conjugada normalmente es eliminada de forma eficiente por la orina, (Matthews et al., 2001). Tras la exposición oral, el BPA libre es muy poco biodisponible, lo que demuestra la eficacia del primer paso hepático del metabolismo del BPA (EFSA, 2008). A pesar de las diferentes vías de exposición y la dosis a que se expone los animales, en general, el BPA libre se excreta por las heces (entre 56 a 82%) y los metabolitos excretados en la orina (entre 13 y 28%) (Knaak y Sullivan, 1966; Yokota et al., 1999; Pottenger et al., 2000; Snyder et al., 2000; Michalowicz et al 2014).

2.4. Toxicidad y efectos tóxicos relacionados con el Bisfenol A

El BPA exhibe una toxicidad aguda moderada en la población general, debido principalmente a la forma de exposición que normalmente es por la contaminación ambiental, favoreciendo a una exposición a niveles más bajos de BPA por largos periodos de forma crónica (Serria et al., 2019). En casos donde pueda haber una exposición a altas dosis de BPA, las señales de toxicidad aguda descritas por Pant y Deshpande (2012) fueron bradicardia, hipotensión, paro respiratorio asociado a una posible depresión medular (centros respiratorios y vasomotor) por acción del BPA, con la disminución del tono simpático e hipercapnia. Estudios apuntan que la exposición dérmica al BPA en fábricas de resinas epoxi, puede llevar al surgimiento de síntomas de alergia y aumento de la temperatura en la piel en caso de contacto directo (Chu et al., 2006).

Debido a su capacidad de desempeñar efecto estrogénico (principalmente 17β -estradiol), androgénico, hormona tiroidea (afecta el desarrollo), prolactina e insulina, la inmunidad, entre otros, el BPA es considerado un DE sintético o xenoestrógeno (Goto et al., 2006; Michałowicz, 2014; Schug et al., 2011). Es decir, es capaz de actuar en el organismo animal alterando las funciones endocrinas, al imitar o bloquear las hormonas endógenas (Schug et al., 2011; Michalowicz et al 2014; Santos, 2016) (Figura 3). Es importante destacar que los efectos de los DE pueden producirse en dosis bajas, por debajo del rango capaz de provocar efectos tóxicos agudos en los adultos (Welshons et al., 2003, 2006; vom Saal et al., 2012).

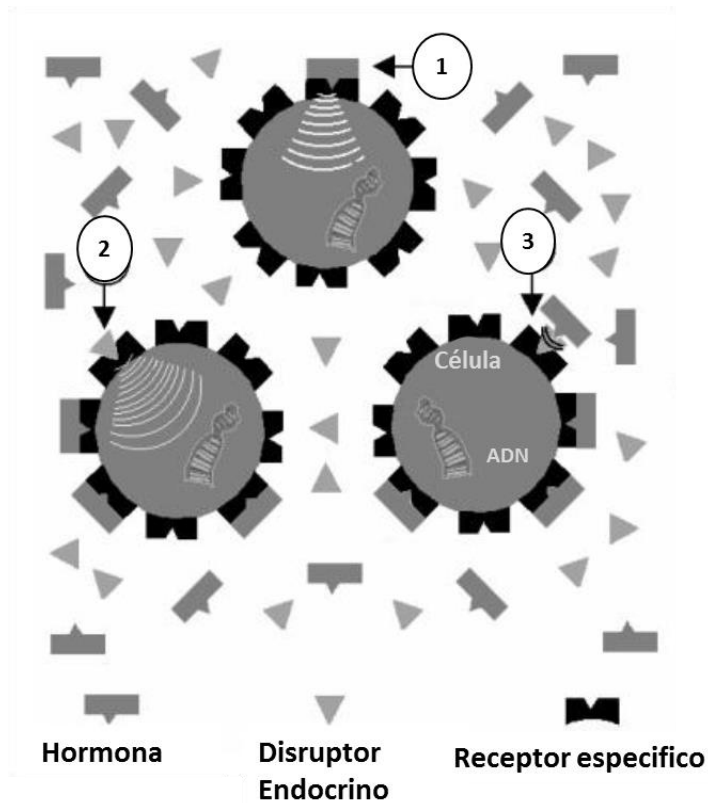


Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos. El nº 1 representa la acción normal de una hormona endógena que actúa en un receptor específico transmitiendo señales indispensables a la célula; el nº 2 representa la acción de un DE que envía otro tipo de señal alterando el funcionamiento normal del organismo; el nº 3 representa el bloqueo del receptor que permanece ocupado con la sustancia DE

La exposición crónica al BPA puede causar principalmente alteraciones hormonales en humanos y animales, debido a su clasificación como DE, además de estar asociado a la ocurrencia de obesidad, diabetes, enfermedades cardíacas, hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, teratogenicidad, efecto mutagénico y cáncer (Michalowicz et al, 2014; Chen et al., 2015; Akhter et al., 2018; Santangeli et al., 2019; EFSA, 2021). La exposición al BPA está asociada, según algunos autores a diversas enfermedades (Li et al., 2010; Wang et al., 2012; Michalowicz et al, 2014), tales como expuesto en la Tabla 1, adaptada de García et al., 2015). Los bisfenoles pueden acumularse en el tejido adiposo dando lugar a niveles séricos persistentes, aunque bajos (vom Saal y Welshons 2006).

Tabla 1. Efectos tóxicos relacionados con el Bisfenol A en la reproducción, desarrollo, metabolismo y otros.

	Tipo de alteración
Reproducción	Fertilidad Función sexual masculina Reducción de la calidad espermática Concentración de hormonas sexuales Síndrome de ovario poliquístico Cáncer de mama Aborto involuntario Nacimiento prematuro
Desarrollo	Peso de nacimiento Anormalidades en los genitales masculinos Alteraciones de comportamiento/neurodesarrollo Asma y problemas respiratorios en la infancia
Metabolismo	Diabetes tipo 2 Alteraciones cardiovasculares, hipertensión y niveles de colesterol Obesidad
Otros	Función tiroidea Función inmunológica Albuminuria Estrés oxidativo e inflamación Expresión genética

Su actividad estrogénica es potente y que actúan a concentraciones muy bajas a través de receptores extra nucleares (RE α , RE β) moviéndose al núcleo y actuando como factores de transcripción que se unen a los elementos de respuesta al estrógeno (Nadal et al., 2018). En un estudio hecho por Richter et al. (2007) ratas y ratones en fase de crecimiento y expuestos al BPA, presentaron alteraciones en la estructura y funciones cerebrales debido al efecto de este compuesto en los receptores de hormonas y neurohormonas. También se demostró que el BPA altera el desarrollo de los órganos reproductivos, la excreción de testosterona y la producción de espermatozoides en estos animales. Tales alteraciones ocurrieron por el efecto del BPA sobre la función del eje de las glándulas pituitarias y el cerebro, según los investigadores.

Evaluando los efectos en la tiroides, basándose en la similitud estructural del BPA con las hormonas tiroideas (TH) (debido a sus 2 anillos benzoicos), se ha propuesto que el BPA puede actuar como un antagonista o agonista de TH y causar la interrupción del sistema tiroideo, datos obtenidos en modelos de metamorfosis de anfibios (Zoeller et al. 2005; Hiroi et al. 2006; Jung et al. 2007). Iwamuro et al. (2006) también mostraron que BPA disminuyó la expresión de genes relacionado con la metamorfosis en un cultivo de células de la cola, lo que refuerza la hipótesis de que el BPA induce su efecto al unirse

directamente a los receptores de hormonas tiroideas (Iwamuro et al. 2003; Zoeller, 2005; Canesi y Fabbri, 2015).

Así como otros DE, el BPA puede estar contribuyendo al desarrollo de la obesidad más adelante en la vida, por el efecto inhibitor sobre el número de adipocitos y la lipogénesis (Welshons et al., 2006; vom Saal et al., 2012). Hay evidencias experimentales de que en ratones adultos el estrógeno endógeno más potente, el 17β -estradiol, actúa a través del RE α para tener un efecto inhibitor sobre el número de adipocitos y la lipogénesis (vom Saal et al., 2012). También fue relatado que esta asociación positiva entre el BPA y la diabetes estuvo presente entre pacientes de peso normal y con sobrepeso (obesidad), fumadores y no fumadores (Shankar y Teppala, 2011).

Estudios han apuntado una correlación entre la exposición al BPA e la estimulación e inhibir la actividad de las células del sistema inmune de los linfocitos T y B, interferencia en la producción de interleucinas, actuando de forma negativa en el sistema inmunológico, lo que puede predisponer a enfermedades inflamatorias (Rogers et al., 2013; Michalowicz et al, 2014). El BPA tiene la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que están implicadas en la apoptosis, la activación de las células de presentación de antígenos y la iniciación o amplificación de diversas reacciones inmunológicas que pueden estar implicadas en la patogenia de las enfermedades autoinmunes (tanto en la aparición como en la exacerbación de la autoinmunidad) (Namazi, 2009; Kharrazian, 2014).

También hay estudios que demuestran que el BPA puede provocar alteraciones a nivel neuronal. La morfología de las neuronas motoras primarias y secundarias, se ve afectada bajo una exposición de 15 μ M en embriones del pez cebra (*Danio rerio*) (Wang et al., 2013). El BPA también puede aumentar la excitabilidad de la neurona postsináptica, provocando una alteración en el comportamiento de ratones hembra, expuestas a 4 mg/kg peso corporal. Fue detectada la aparición de síntomas de ansiedad y el mecanismo por el cual se produce parece estar relacionado con una inhibición de la vía gabaérgica. Por lo que el BPA puede tener efectos relacionados con la ansiedad (Zhou et al., 2013).

El hígado es uno de los órganos donde se metaboliza el BPA y tal contacto directo puede llevar a la ocurrencia de alteraciones en su estructura. En estudios de Lang et al. (2008), se correlacionaron de forma significativa los niveles de BPA urinario más alto con las elevaciones en las enzimas hepáticas fosfatasa alcalina, gamma-glutamyltransferasa y

lactato deshidrogenasa. También tiene la capacidad de alterar las enzimas del citocromo P450, tal como las monooxigenasas (CYP) que actúan en la oxidación de sustancias orgánicas y la bioactivación de fármacos y xenoestrógenos (tal como el BPA) en el hígado y en otros tejidos llevando su conversión a metabolitos inactivos o activos con potencial tóxico (Wang et al., 2011; Kharrazian, 2014).

También se han identificado toxicidad y estrogenicidad en los metabolitos de BPA, tal como el 4-metil-2,4-bis (p-hidroxifenil) pent-1-eno (MBP) que potencializa la capacidad estrogénica del BPA de dos a cinco veces más en estudios con ratas (Yoshihara et al., 2001). El MBP en el medaka (*Oryzias latipes*), presenta mayor toxicidad en la edad temprana de desarrollo y capacidad estrogénica cerca de 250 veces más alta que el BPA (Ishibashi et al., 2005). Otro metabolito, el bisfenol-o-quinona, también presenta toxicidad, pudiendo unirse al ADN (Atkinson y Roy, 1995).

La capacidad del BPA en provocar cáncer fue descrita por diversos autores. La Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), en 2017. En ratas, incluso en cantidades bajas puede llevar al desarrollo de cánceres de seno, próstata y pezón (Soto et al., 2013, Seachrist et al., 2016), debido a estimulación excesiva de los receptores de andrógenos (Wetherill et al., 2005).

La dosis letal (DL₅₀) de BPA para Ratas es entre 3300 a 4240 mg/kg (vía oral), para ratones varía entre 2500 a 5200 mg/kg por vía oral y en peces (*Pimephales promelas*) es de 4.6 mg/L (Staples et al., 1998; Richer et al., 2007). Y según estudios de Pant y Deshpande (2012) en ratas, la dosis letal encontrada por vía intraperitoneal fue de 841 mg/Kg y la dosis letal intravenosa de 35.26 mg/Kg de peso corporal.

2.4.1 Alteraciones en la reproducción y efectos teratogénicos del Bisfenol A

Alteraciones reproductivas pueden ocurrir por interferencias de compuestos tóxicos, que pueden alterar la fisiología del organismo animal y consecuentemente afectar de forma directa o indirecta la reproducción de los animales. La influencia de sustancias tal como el BPA puede afectar negativamente la producción hormonal en los animales perjudicando la reproducción de una o más generaciones, como se describe en el pez cebra y en ratas (Anway et al., 2005; Akhter et al., 2018). Otro efecto transgeneracional provocado por el BPA sería la interrupción de la cardiogénesis en generaciones

posteriores en el pez cebra (Lombo et al., 2015). Diversos estudios en animales de laboratorio han sugerido que el BPA puede ser tóxico para la reproducción humana (Richter et al., 2007; Rochester, 2013; Akhter et al., 2018).

Akhter et al. (2018) concluyeron que los efectos del BPA, en pez cebra macho y hembra adulto provocan en hembras una retracción ovárica y reducción tanto de la fertilidad como de la tasa de supervivencia en la descendencia (F1). En estudios de Molina et al. (2013) la exposición de 14 días de tratamiento con BPA causó un aumento en los porcentajes de folículos atrésicos en hembras de pez cebra. La transmisión transgeneracional de la acción del BPA por vía materna en la fisiología reproductiva en hembras de pez cebra fue determinada por la disminución de la fertilidad observado en la generación F2 (Santangeli et al., 2019).

Otros autores como Laing et al. (2016), descubrieron que el BPA puede interferir con la reproducción del pez cebra al alterar la transcripción de varios genes involucrados en la regulación epigenética y al disminuir la metilación global del ADN. Además, se descubrió que la exposición continua a BPA (1 nM) durante dos generaciones en el pez cebra afecta la proporción de sexos y la cantidad y calidad de espermatozoides en adultos de la generación F1 y F2 que causan defectos reproductivos específicos de los machos (Chen et al., 2015).

A pesar de varios estudios acerca de las alteraciones reproductivas y transgeneracionales, se recomiendan más estudios acerca del tema.

2.5. Legislación relacionada con el Bisfenol A

En 2010 Canadá se convirtió en el primer país en declarar que el BPA es un compuesto tóxico y requirió su eliminación de todos los biberones de fórmula infantil. Antes de esto BPA había sido prohibido en biberones en Dinamarca, aunque no declarado un compuesto tóxico en ese momento. A partir de 2011 (Reglamento 321/2011 y en el Reglamento (UE) n° 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo) el BPA ha sido prohibido en la formulación de biberones de niños en toda Europa (Rogers et al., 2013). Esta restricción se aplicó a partir del 1 de mayo de 2011 en relación con su fabricación y a partir del 1 de junio de 2011 respecto a su comercialización e importación en la UE (Reglamento UE 321/2011, 2011; Reglamento UE n° 2018/213, 2018).

En la Unión Europea (UE) el BPA se considera un producto autorizado para la utilización como material de envases, recipientes destinados a entrar en contacto con los alimentos desde que respete el límite de migración específica (LME) (Reglamento UE 10/2011, 2011). En 2018 la comisión de 12 de febrero ha aprobado el Reglamento (UE) 2018/213 sobre el uso de bisfenol A en los barnices y revestimientos destinados a entrar en contacto con los alimentos, en modificación del Reglamento (UE) nº 10/2011. Se aprobó la reducción del LME aplicable a plásticos, recubrimientos y barnices para metales y otras fuentes de contacto del BPA de 0.6 mg/kg a 0.05 mg/kg. También se impuso una prohibición de la presencia de bisfenol A en botellas de plástico y envases que contengan alimentos para bebés y niños menores de tres años (Reglamento UE nº 2018/213, 2018). También fue establecido el límite de BPA que puede desprenderse de los juguetes para niños de hasta tres años, bajando el límite de migración de 0.1 mg/l de BPA para 0.04 mg/l.

En referencia a el aspecto legislativo en España, se ha modificado el Anexo II del Real Decreto 866/2008 (RD, 2008), por el cual se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos de plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo, mediante la Orden PRE/628/2011 (2011). Esta modificación se basa en la inclusión en la normativa en referencia al BPA de: “no utilizar en la fabricación de biberones de policarbonato para lactantes” (RD 866/2008).

En 2020, en cambio a la Directiva 98/83/CE, se establece su modificación con la Directiva (UE) 2020/2184, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. El BPA ha sido incluido en BPA entre las sustancias que tuvieron la disminución de los límites máximos aceptables en agua, pasando a la concentración 2.5 µg/L. Tal preocupación y la toma de medidas estuvieron basadas en los informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) de 2015.

Teniendo en cuenta la posible migración de BPA de policarbonatos a alimentos y agua, así como una toxicidad significativa de este compuesto, algunos países dejaron de producir biberones hechos con polímeros de BPA, tales como Canadá en 2010 que reemplazó el BPA por bisfenol S (BPS) (Morrissey, 2008) y luego China en 2011 también ha prohibido su uso en productos infantiles. En Francia se ha aprobado una proposición de ley que prohíbe la utilización del BPA en envases alimentarios, con aplicación desde 2015.

2.6. Pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie tropical de agua dulce originario del sur de Asia, y se distribuye ampliamente en partes de India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistán (Lawrence, 2007). Es una de aproximadamente 45 especies de *Danio* en todo el mundo (Fang, 2003). Regiones con estaciones lluviosas y secas pronunciadas, factores que tienen un profundo efecto en los parámetros del hábitat, incluida la química del agua y la abundancia de recursos (Spence et al., 2008; Graham et al., 2018).

Es un pez teleósteo de la familia *Cyprinidae*, ovíparo, que presenta alta tasa de fertilidad, de acuerdo con las condiciones ambientales a las cuales está expuesto (Segner, 2009). El sexo de los juveniles no se puede distinguir de manera confiable sin disección y mientras que las hembras antes de la puesta tienen una forma corporal más redondeada, la característica diagnóstica más confiable es la presencia de una pequeña papila genital frente al origen de la aleta anal (Laale, 1977, Spence et al., 2008; Graham et al., 2018).

El patrón de color comprende tres tipos de células de pigmento, melanóforos de color azul oscuro, xantóforos dorados e iridóforos iridiscentes (Parichy, 2006). Las hembras tienen un color un poco más dorado, abdomen más ancho (cuando llevan huevos), más robustas comparada a los machos. Los machos tienen un cuerpo más delgado con líneas azules longitudinales más pronunciadas y tienen una coloración más amarilla en la aleta anal (Figura 4) (Schilling, 2002; Ruhl et al 2009). Un pez cebra adulto suele tener menos de 5 cm de longitud, su forma corporal es fusiforme y comprimida lateralmente, con una boca oblicua terminal dirigida hacia arriba (Spence et al., 2008; Reed y Jennings, 2010).



Figura 4. Hembra (superior) y macho (inferior) de pez cebra (*Danio rerio*). Fuente: © Grupo ECOTicias S.L.

2.6.1. Mantenimiento del pez cebra

La investigación en ecología acuática requiere frecuentemente condiciones experimentales que permitan aislar factores que difícilmente pueden ser monitorizados o controlados in situ. El sistema debe ser fácil y muy bien controlado en el mantenimiento del pez cebra, para eso se utilizan dos tipos de sistemas, abiertos y cerrados (Lawrence 2012).

Los sistemas abiertos normalmente son utilizados en los grandes centros de experimentación animal, donde se puede controlar todos los acuarios de forma automática, regulando todos los parámetros para garantizar la permanencia de los peces en condiciones óptimas. La limpieza de los acuarios se realiza de forma regular para evitar el crecimiento de algas, así como la limpieza de los diferentes filtros que pueden ser utilizados, de carbón y/o filtros biológicos, que deben ser limpiados y/o cambiados (Avdesh et al., 2012; Lawrence, 2012).

En un sistema cerrado se realiza de forma manual, tanto el cambio de agua como el monitoreo de la calidad de agua. Es necesarios el uso de pruebas colorimétricas y/o de aparatos específicos para medir parámetros como pH, conductividad, residuos nitrogenados y etc. Cada acuario debe tener su propio filtro (con o sin carbón), un calentador (controle de temperatura manual de acuerdo con la evaluación diaria) y aireadores (Matthews et al. 2002).

El pez cebra es una especie que resiste a distintas condiciones ambientales, reflejo de la diversidad de su hábitat natural en condiciones fisicoquímicas del agua, flotaciones estacionales con alta frecuencia de lluvias (Lawrence, 2007). Sin embargo, a pesar de la gran resistencia de la especie, cuando no está en un medio en condiciones óptimas, el animal se gasta mucha energía para mantener las funciones normales en homeostasis, crecimiento, producción de gametos y la función del sistema inmune (Clark et al., 2011).

Los principales parámetros de calidad de agua son:

- **pH:** indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en el agua, que pueden ser aniones, de radical hidroxilo (HO⁻) o cationes, de Hidrógeno (H⁺). La concentración mayor o menor de cada uno de estos iones determinara el valor de pH del agua. En el caso de un pH muy extremo convertiría el agua en un medio corrosivo (con extrema acidez) o cáustico (con extrema alcalinidad) (Lawrence,

2007). El pH es un parámetro medido en el agua que influye profundamente sobre los procesos biológicos en los peces, tal como en la supervivencia de bacterias que actúan como biopelículas que metabolizan los desechos nitrogenados excretados por los peces (zebrafish.web.unc.edu). Lo ideal es mantener el pH más cerca del neutro o un poco más básico, en los rangos, según Avdesh et al. (2012) de 6.8-7.5 (6.0-8.5 tolerable), para Sanders (2009) entre 6-8 y para Masser et al. (1999), entre 7 y 8. En el documento de la OECD 229 la recomendación de rango ideal de pH de 6.5 a 8.5.

- **Conductividad:** La conductividad es una medida que indica la cantidad de sales disueltas en el medio, un parámetro importante a ser evaluado en el mantenimiento de peces de agua dulce que son hiperosmóticos para los medios en que viven (Buttner et al., 1993; Lawrence, 2007). Para mantener los niveles internos de agua y sal en concentraciones adecuadas, los peces normalmente eliminan la sal y agua por la orina, mientras otra parte retorna a la sangre (reabsorción por el epitelio branquial) en forma de cloruro (Lawrence, 2007). Los niveles ideales de conductividad según Lawrence (2007) son de 0.25 a 0.75 ppt y según Brand et al. (2002) 180 a 350 μS y según Sanders (2009) 300 a 1500 μS .

- **Temperatura:** El pez cebra es una especie ectotérmica, o sea, depende principalmente de fuentes de calor externas para mantener su temperatura corporal, así que puede cambiar de acuerdo con la temperatura del medio ambiente. Por lo tanto, la temperatura es un factor de extrema importancia en su mantenimiento (López-Olmeda y Sánchez-Vázquez, 2011). Temperaturas fuera del límite adecuado influyen negativamente en la salud de los peces al aumentar la tasa metabólica, el consumo de oxígeno y la invasión y virulencia de los patógenos, interrumpir la producción de enzimas esteroideogénicas que regulan la diferenciación sexual que y una variedad de trastornos fisiopatológicos que puede conducir a la muerte de peces (Uchida et al., 2004; Gordon, 2005; Dalvietal., 2009). Los peces adultos toleran a un amplio rango de temperatura del agua, que pueden variar de 16.5 a 33 °C (Spence et al., 2006), pero el rango óptimo de temperatura según Avdesh et al. (2012) es de 26-28.5 °C para peces adultos.

- **Residuos nitrogenados:** Presentes en el agua como consecuencia de la descomposición de materia orgánica (peces muertos, restos de alimentos, excreción por las branquias, heces) (Lawrence, 2007). El amoníaco (NH_3) es altamente tóxico, con lo cual sus niveles deben variar entre 0 y 0.02 ppm. Para su transformación en amonio (NH_4), su forma no tóxica, es necesario a presencia de bacterias nitrificantes y un pH en torno de 7 (Wilkie, 2002). Luego otra transformación importante es la oxidación del amoníaco generando nitritos (NO_2), sustancia altamente tóxica que puede producir necrosis puntuales del tejido branquial e incluso la muerte de los peces si se mantiene por largos periodos en niveles altos. La última conversión es del nitrito a nitrato (NO_3), sustancia generalmente no toxica, aunque exposiciones prolongadas pueden, a niveles altos, ser problemáticas (Camargo et al., 2005). El valor máximo aceptable por peces para la concentración de nitrito en el agua es de 1 ppm, bajos por su alta toxicidad (Buttner et al., 1993). Para nitrato el nivel máximo tolerable por el pez cebra es de 200 ppm (Camargo et al., 2005). Una parte de estas sustancias son absorbidos por plantas o bacterias, y en acuariofilia se puede reducir los niveles de los residuos nitrogenados con la limpieza del fondo de los acuarios tras alimentación y con cambios frecuentes de agua de los acuarios (Westerfield, 2007; Lawrence, 2007).
- **Alcalinidad:** mide la capacidad del agua en neutralizar ácidos. La alcalinidad total (KH) es una medida de partes por millón de todos los álcalis (todos los iones de carbonato, bicarbonato e hidróxido) presentes en el agua (zebrafish.web.unc.edu). Los valores ideales están entre 50 – 150 mg/L (Sanders, 2009) o 50 – 100 mg/l de CaCO_3 (Schneider et al., 2009).
- **Dureza:** Es una medida de la cantidad de iones divalentes, principalmente calcio, magnesio y en menor medida, hierro y selenio, en agua (Wurts, 2002). Los peces requieren estos iones para la función biológica (la osificación, la coagulación de la sangre), y se deben proporcionar a los peces en cautiverio en sus aguas y/o dieta (Wurts, 1993; Matthews et al., 2002; Spence et al., 2006). El grado de dureza también puede afectar la osmorregulación y algunas veces, la capacidad de amortiguación del agua (Lawrence, 2007). Para el pez cebra, el nivel ideal de

dureza debe ser superior a 100 mg/L de CaCO₃ (Brand et al., 2002) y según Sanders (2009) 80 a 300 mg/L.

Respecto a la alimentación del pez cebra, la especie es generalista y consume una amplia variedad de crustáceos bentónicos y planctónicos, además de gusanos y larvas de insectos (Dutta, 1993; Shrestha, 1990). En laboratorio la alimentación se basa en alimento seco, pienso comercial tipo escamas, que sirven como alimento completo para peces adultos. También se utiliza una suplementación proteica con incremento de alimento vivo, utilizando *Artemia*, un pequeño crustáceo, o *Paramecium*, un protozoario, principalmente para complementar el requerimiento energético para la reproducción (Matthews et al., 2002; Braunbeck y Lammer, 2006). En una frecuencia de dos a tres veces al día según en cantidad proporcional a la cantidad de comida que puedan comer en este periodo de tiempo, conocido como "la regla de los cinco minutos" o en cantidad máxima correspondiente a 1–10% del peso de los peces (Braunbeck y Lammer, 2006; Westerfield, 2007). Las larvas son típicamente alimentadas más veces al día que los peces adultos, recibiendo hasta 50-300% de su peso corporal de comida cada día (Lawrence, 2007).

2.6.2. Reproducción

Aunque el pez cebra alcanza la madurez sexual en 10-12 semanas, el pez reproductor debe tener entre 7 y 18 meses de edad para la producción máxima de embriones (Westerfield, 2007). El comportamiento de apareamiento del pez cebra parece estar influenciado por la exposición de machos y hembras (exposición femenina a las feromonas gonadales masculinas) durante las 24 horas antes de que comience el desove (al amanecer) (Delaney et al. 2002; Darrow y Harris, 2004; Spencer et al., 2008). Exhiben este patrón circadiano robusto de actividad diurna y descanso nocturno (Zhdanova 2005). La actividad de desove coincide con el primer pico de actividad y generalmente comienza dentro del primer minuto de exposición a la luz después de la oscuridad, continuando durante aproximadamente una hora (Darrow y Harris, 2004). La frecuencia de desove puede variar de 1 a 6 días, con una media de 1.5 días (Spencer et al., 2008).

Según Spencer et al. (2008), los huevos al entrar en contacto con el medio de desove se activan y luego sigue una ventana de oportunidad restringida (probablemente menos de 30 segundos, pero tal vez solo entre 5 y 10 segundos) para que los espermatozoides

fertilicen el óvulo. Según los mismos autores, la estrategia de tener poco tiempo para la fecundación espermática ayuda a garantizar que solo el espermatozoide del macho exitoso emparejado con la hembra pueda fertilizar sus óvulos, una ventaja evolutiva al pez cebra.

La producción de gametos en los machos, la espermatogénesis es un proceso organizado y coordinado donde las espermatogonias diploides se dividen y se diferencian en sucesivas etapas hasta formar el espermatozoide. Se puede clasificar las etapas de la espermatogénesis, según González et al. (2012) en:

- **Mitótica:** fase donde se desencadena una serie de divisiones celulares muy rápidas que producen un aumento de espermatogonias.
- **Meiótica:** diferenciación de las espermatogonias en espermatocitos por profases. Y tras la metafase, formación de células haploides o espermáticas.
- **Espermática:** se producen cambios morfológicos en las células espermáticas y las transforman en espermatozoides.
- **Maduración:** fase donde los espermatozoides adquieren la movilidad y la capacidad de fertilización.

Anatómicamente, los testículos del pez cebra son órganos laterales, en pares, que comprenden una serie de túbulos o sacos ciegos, que están revestidos con epitelio espermatogénico, túnica albugínea (Roberts y Ellis 2001). Está unido a la parte dorsal de la pared del cuerpo por el mesorquio y se conecta al exterior mediante un conducto deferente que se origina en su región dorsal y que abre al exterior en la papila urogenital (Figura 5) (González et al., 2012).

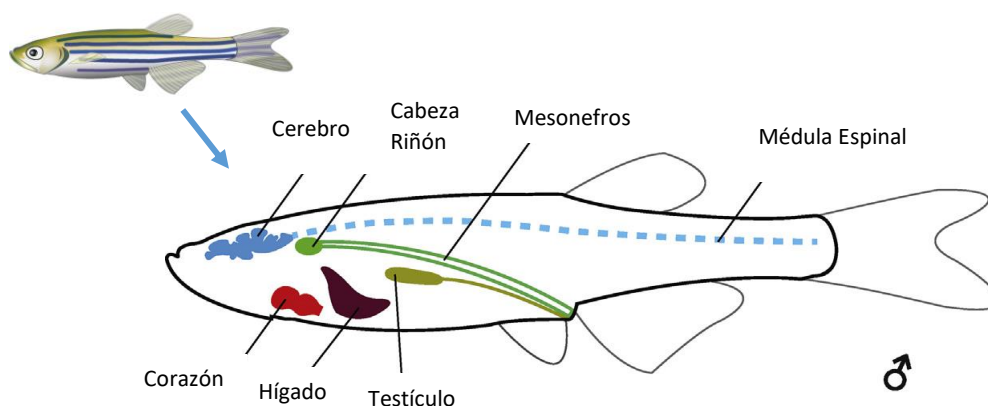


Figura 5. Anatomía del pez cebra macho. Adaptado de Tokarz et al., 2013

En las hembras, el proceso de oogénesis se ha dividido en cinco, seis u ocho etapas en la mayoría de los teleósteos, pero la mayoría de los autores coinciden en la clasificación de seis fases (Ünver y Saraydin 2004):

- **Oogonias:** El primer paso en la oogénesis es similar al desarrollo encontrado en la espermatogénesis, ya que las oogonias experimentan proliferación por divisiones mitóticas.
- **Cromatina nuclear:** durante esta fase la estructura citoplasmática llamada de núcleo o cuerpo vitelinos de Balbiani, inicia su desarrollo.
- **Fase perinuclear:** donde se inicia la migración de múltiples nucleolos hacia el nucleoplasma periférico, que será llamado de vesícula germinal.
- **Alvéolo cortical (vesícula vitelina):** formación de vesículas vitelinas alrededor de la vesícula germinal, que se inicia en la periferia del ooplasma y con el proceso de desarrollo va distribuyéndose por todo citoplasma. Las células foliculares son de apariencia escamosa en la fase temprana, transformándose en cuboidales en la fase tardía (Leino et al., 2005). En el pez cebra esta fase se puede iniciarse de forma conjunta con la vitelina (Nagahama 1983, Takashima y Hibiya 1995)
- **Vitelogénesis:** ocurre a principio un crecimiento citoplasmático, con incremento de organelos (mitocondrias, retículo endoplasmático, etc), además de transformaciones nucleares y neonucleares. Tras estas transformaciones, el oocito empieza a aumentar de tamaño de forma prolongada y sostenido. En los teleósteos el crecimiento, llamado de índice gonadosomático (IGS), puede ser desde 1 a 20% o más, de acuerdo con la especie. En esta fase se caracteriza la formación de vitelo fuera del oocito (vitelogénesis exógena) y la incorporación de materiales al oocito por micropinositosis, formando gránulos de vitelo. Estos gránulos inicialmente dispersos en el citoplasma periférico crecen y emigran hacia el interior celular, desplazando los alveolos corticales hacia la periferia (Nagahama 1983, Leino et al., 2005). La vitelogenina (Vtg) es una proteína compleja de alta masa molecular compuesta por azúcar, lípidos y fósforo y que presenta otros elementos como calcio, hierro y zinc; expresada específicamente en el suero sanguíneo femenino durante la vitelogénesis. La administración de estrógenos a peces machos o juveniles induce la producción de vitelogenina en plasma. Además, la Vtg es un precursor de las proteínas de la yema de huevo que reacciona con los anticuerpos

producidos contra los extractos de huevo (Sullivan y Yilmaz, 2018). La E₂ circulante induce a los hepatocitos en el hígado a sintetizar y secretar Vtgs, además de hacer la retroalimentación para actuar sobre el cerebro y la glándula pituitaria, proporcionando control homeostático de la vitelogenesis y los procesos de maduración posteriores (Sullivan y Yilmaz, 2018).

- **Maduración:** ocurre la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal, su ruptura y se produce la clarificación del vitelo, el aumento de tamaño por la hidratación. Es esta etapa de concluye la primera división meiótica con la expulsión del primer cuerpo polar, para volver a detenerse (en metafase de la segunda división), para luego ser ovulado y desovado (Patrifniani, 2014).

Los ovarios en los teleósteos son estructuras bilobuladas que se encuentran envueltos por una delgada túnica albugínea de tejido conectivo laxo, la cual presenta engrosamiento donde existen vasos sanguíneos que irrigan la gónada (Valdebenito et al., 2011; Tokarz et al., 2013). La unidad funcional del ovario es el folículo ovárico, donde está localizado el oocito, rodeado por una capa acelular denominada corion, la envuelta vitelina o zona radiata. Los ovarios están compuestos por un oviducto corto que conduce los huevos hacia el exterior, por la papila o poro genital (Figura 6) (Menke et al., 2011).

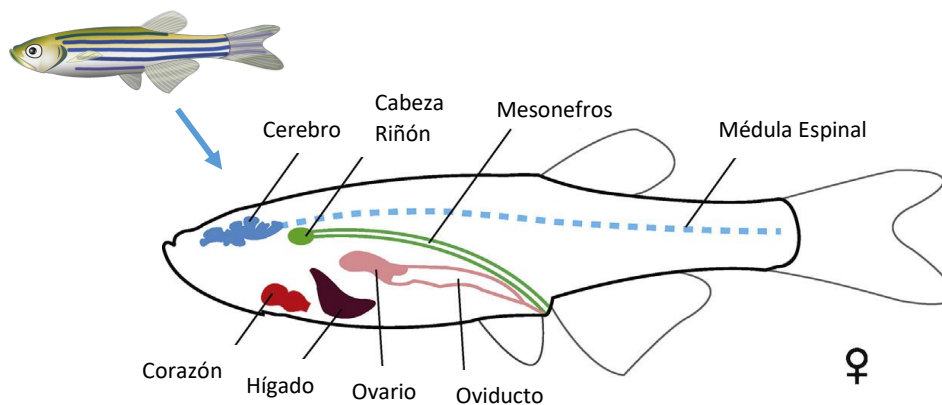


Figura 6. Anatomía del pez cebra hembra. Adaptado de Tokarz et al., 2013

El ovario, después de la ovulación y desove, se compone por folículos post ovulatorios, ovas no desovadas, oocitos adultos inmaduros, oogonias y en algunas especies de peces, oocitos en varias etapas de desarrollo (Takashima y Hibiya 1995, Ünver y Saraydin 2004;

Valdebenito et al., 2011). También se encuentran los folículos atrésicos, un proceso de degeneración que pueden sufrir algunos oocitos durante su desarrollo y es un proceso multifuncional (Nagahama 1994; Valdebenito et al., 2011).

La atresia folicular “normal” se presenta como un proceso estratégico establecido dentro del ciclo de desarrollo gonadal de diversas especies, el cual permite un reciclaje energético, bajo condiciones adversas. sin embargo, este proceso puede verse alterado en algunas especies. Y la atresia folicular “patológica” afecta a individuos con alto nivel de estrés, en los cuales debido a factores internos no pueden mantener una adecuada homeostasis de sus procesos fisiológicos, lo que altera la ovogénesis en cualquiera de sus etapas, pudiendo llevar a la muerte de la hembra si el proceso se detiene durante la etapa final de desarrollo del oocito (Valdebenito et al., 2011) (Tabla 2).

Tabla 2. Características generales de los tipos de atresia folicular en peces.

Parámetro evaluado	Atresia “normal”	Atresia “patológica”
Etapas del desarrollo	Cualquier etapa del desarrollo folicular	Etapas avanzadas (vitelogénesis en adelante)
Ovulación	Presente, aunque puede variar (atresia mayor)	Ausente, todos los folículos comprometidos
Tamaño ovárico	Normal	Aumento de volumen
Consistencia ovárica	Tejido normal, relativa laxitud	Duro, firme al corte, probablemente mineralizado
Condiciones ambientales	Tanto en vida silvestre, como en condiciones de cultivo	Condiciones de cultivo controlado
Ocurrencia	Generalmente al final del ciclo reproductivo	Cualquier momento del ciclo reproductivo
Prevalencia	Variable, según etapa de la estación reproductiva	Alta en algunas cohortes
Estado del vitelo	Licuefacto con presencia de vacuolas	Endurecido
Reabsorción	Activa por fagocitosis y/o apoptosis	Ausente
Factores causantes comprometidos	Extrínsecos, relacionados con estímulos ambientales	Extrínseco e intrínsecos

El control endocrino de la reproducción ocurre con una integración entre los sistemas sensoriales interno y externo (pareja potencial, temperatura, fotoperiodo, metabolismo,

reservas de energía, estado gonadal y entre otros estímulos ambientales) y la secreción de hormonas por el sistema hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) (Valdebenito et al., 2011). El hipotálamo, en respuesta a las condiciones ambientales y/o fisiológicas, sintetiza y libera neuropéptidos y monoaminas tales como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), dopamina (efecto negativo en la actividad HPG), kisspeptinas (regula la liberación de 17β -estradiol), neuroquinina B (NKB) (maduración final del ovocito), que son los principales involucrados en la reproducción de los peces (Biran y Levavi-Sivan, 2018).

Hay tres formas de GnRH en los teleósteos, pero el pez cebra posee apenas dos de ellos, el GnRH-2 localizados en el mesencéfalo donde puede actuar como neurotransmisor y/o neuromodulador, además de estar involucrado en la ingesta de alimentos y el comportamiento reproductivo y el GnRH-3 localizado en el nervio terminal y los bulbos olfatorios con función neuromoduladora (Biran y Levavi-Sivan, 2018).

La regulación de la reproducción implica en la síntesis y secreción de hormonas de la adenohipófisis incluyendo la hormona foliculoestimulante (FSH) (también conocidos en los peces como gonadotropina GTH-I) y hormona luteinizante (LH) (GTH-II) (Zanuy et al., 2009). El FSH (GTH I) induce la captura de vitelogenina y, dependiendo de la especie, puede estimular la esteroidogénesis y liberación de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), por lo cual se la denomina hormona vitelogénica mientras que la LH (GTH II) induce la maduración de los oocitos, la ovulación, además de estimular la formación de AMPC, denominándose hormona madurativa (Zanuy et al., 2009; Luckenbach et al., 2010). Al contrario de los mamíferos que poseen receptores específicos para las gonadotropinas, en varias especies de peces hay una promiscuidad ligando-receptor para los receptores de FSH y LH (FSHR y LHR, respectivamente), donde los FSHR pueden unirse tanto a hormonas FSH como LH, pero los LHR son altamente específicos a LH. Estos receptores se expresan en las células foliculares de la teca y granulosa y células intersticiales y nodrizas de los testículos (células de Leydig y Sertoli), transmitiendo de retroalimentación positiva o negativa para a síntesis de gonadotropinas. El FSH y LH estimula la producción de tres esteroides sexuales claves en la reproducción, son ellos: estrógeno (E_2) que estimula la proliferación y el crecimiento de células germinales y la vitelogénesis; 11-cetotestosterona (11-KT) que sirve como andrógeno central regulando la espermatogénesis y la espermiogénesis; $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), que regula la maduración final y la ovulación de los ovocitos e inicio de la meiosis de las

oogonias en el ovario, actuando también en los machos, en la maduración, la espermiación y motilidad de los espermatozoides (Nagahama 1983; Zanury et al., 2009; Scott et al., 2010).

En los machos, las hormonas esteroideas, progesterona, andrógenos y estrógenos son principalmente producidos en las gónadas, variando la concentración durante la maduración sexual (Miura, 2011. En los machos también se circulan los estrógenos (E₂) en concentraciones bajas en el suero sanguíneo (Amer et al., 2001; Chaves-Pozo et al., 2008). Los receptores de andrógenos son expresados en las células de Sertoli y en el tejido intersticial pero no en las células germinales (Ikeuchi et al., 2001), sugiriendo que los andrógenos desarrollan su actividad biológica a través de las células somáticas testiculares y son de gran importancia en todos los procesos de la espermatogénesis, actuando también en la pubertad (González et al., 2012).

El E₂ tiene efectos reguladores (directos e indirectos) en la expresión de genes importantes para la regulación de la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Así se ha comprobado que los estrógenos controlan la homeostasis del ácido retinoico en el testículo, el cual es requerido para la proliferación y diferenciación de las espermatogonias no diferenciadas en ratón (Zhou et al., 2008), aunque parece menos relevante en el pez cebra (Alsop et al., 2008).

La proliferación de espermatogonias hacia la meiosis es iniciada por 11-cetotestosterona (11-KT), producido por el FSH. La meiosis es inducida por la hormona 17 α , 20 β -DHP (DHP) a través de la acción de la tirosina. La estimulación gonadotrópica en las células de Leydig en los testículos lleva a síntesis y liberación del 11-KT que activa las células de Sertoli, resultando en la estimulación de la espermatogénesis. Con el avance de la espermiogénesis, disminuyen los niveles de 11-KT y aumentan los niveles de DHP para inducción de la espermiogénesis (Figura 7) (Biran y Levavi-Sivan, 2018).

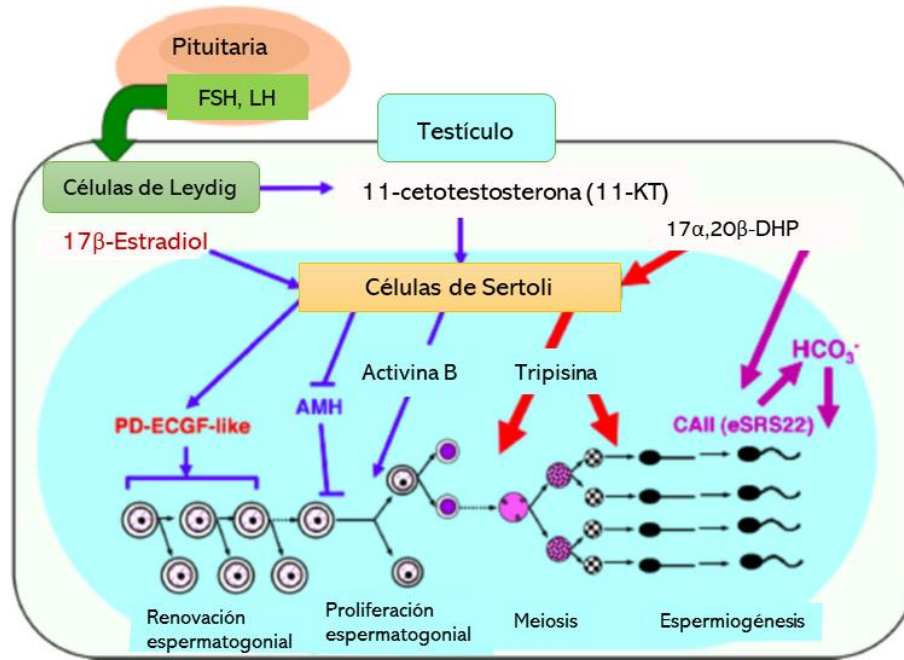


Figura 7. Diagrama esquemático de la espermiogénesis en peces. Adaptado de Biran y Levavi-Sivan, 2018.

En las hembras, los esteroides tienen funciones más complejas en la regulación por retroalimentación y desarrollo gonadal. Los estrógenos inducen la síntesis y liberación de vitelogenina (Vtg), la proteína de almacenamiento principal en los ovocitos en la yema. Durante la primera fase, luego después del crecimiento de los ovocitos vitelogénicos los folículos ováricos producen altas cantidades de estrógenos y poca progesterona, activando la vía inhibitoria de la maduración, mientras que, en la segunda fase, la vía estrogénica cambia a la producción de progestágenos y disminuyen los estrógenos suprimiendo la vía inhibitoria (Figura 8) (Zanuy et al., 2009; Luckenbach et al., 2010).

Los folículos postovulatorios recientes han sido caracterizados por un alto grado de vascularización de la capa tecal e hipertrofia de las células de la granulosa y al igual que en la granulosa de los folículos en crecimiento (Nagahama y Kagawa 1982; Nagahama 1983, Takashima y Hibiya 1995).

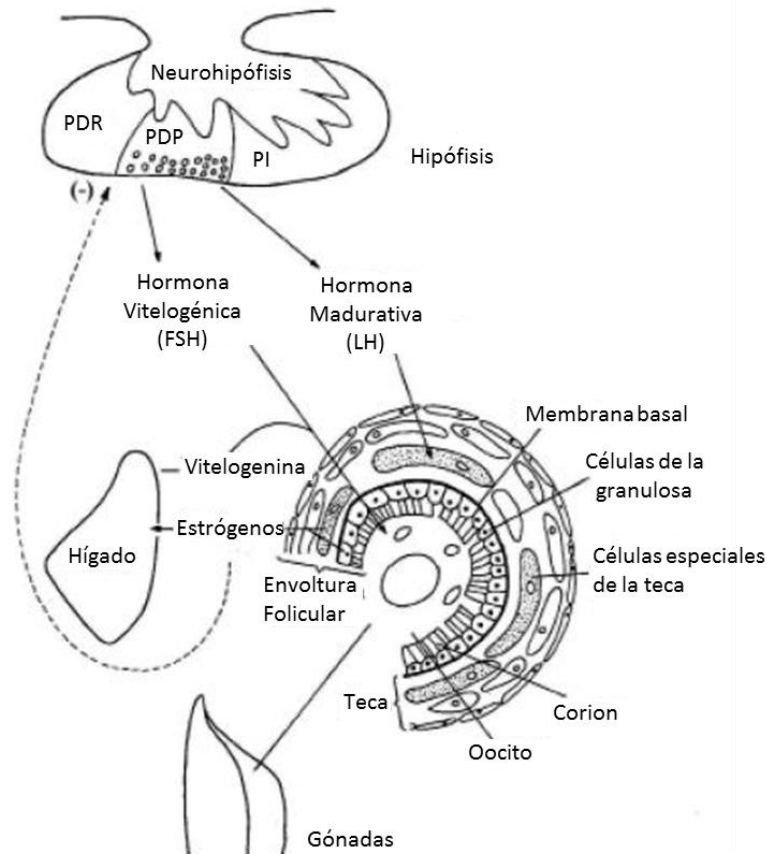


Figura 8. Esquema del mecanismo de control endocrino e interacción folicular en peces teleosteos. PDR pares distales rostrales; PDP pares distales proximales; PI pares intermedia (modificado de Zanuy y Carrillo 1987).

Los xenoestrógenos presentes en el medioambiente pueden interferir el eje HPG y actuar directamente sobre el hígado para inducir una vitelogénesis anormal en peces machos y juveniles, lo que a veces resulta en la aparición de machos 'intersexuales' con ovocitos previtelogénicos en sus testículos, generando insuficiencia reproductiva en machos (Sullivan y Yilmaz, 2018). La vitelogénesis es altamente sensible a los estrógenos sintéticos (tal como el BPA) y naturales, de este modo, las Vtg de peces se han adoptado a nivel mundial como biomarcadores de la presencia de contaminantes químicos estrogénicos en ambientes acuáticos, lo cual está indicado por niveles elevados de Vtg en la sangre o tejidos de peces machos y / o juveniles. (Dang, 2016; Adeel et al., 2017).

2.6.3. Embriogénesis

Tras la fecundación, los embriones de los óvulos recién fertilizados son llamados de cigoto hasta que se produzca la primera división celular (Kimmel et al., 1995). Una serie de estadios marcan el desarrollo de los embriones a partir de las primeras divisiones celulares y mismo perteneciendo a una misma puesta (mismos padres), los embriones de del pez cebra, presentan un desarrollo en tasas ligeramente diferentes. La asincronía surge en las primeras etapas de división celular, y se vuelve más pronunciada a medida que pasa el tiempo (Kimmel et al., 1995), pero al alcanzar la madurez reproductiva, suelen presentar tamaños similares (Spence et al, 2008).

La fase embrionaria empieza en el tiempo 0 y dura hasta las 72 hpf, aproximadamente. En este periodo lo ideal es que los embriones permanezcan en medio adecuado con temperaturas entre 26.5 – 28.5 °C, para su crecimiento óptimo (Brand et al., 2002; Westerfield, 2007; Avdesh et al., 2012). En condiciones laborales, los embriones pueden ser incubados en placas de Petri con agua del sistema o un medio embrionario (E3) preparado. La composición del medio E3 puede variar un poco en la concentración de cada mineral según distintos autores, pero básicamente está compuesto por: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.1 ppm de azul de metileno (Brand et al., 2002; Burgess y Granato, 2007; Best y Vijayan, 2018).

Durante el periodo embrionario se observan los estadios del desarrollo conocidos como: cigoto, estadio de división, de blástula, etapa gástrula, de segmentación, faríngrula y eclosión, que ocurren de forma rápida (Figura 9) (Kimmel et al, 1995; Aluro 2017).

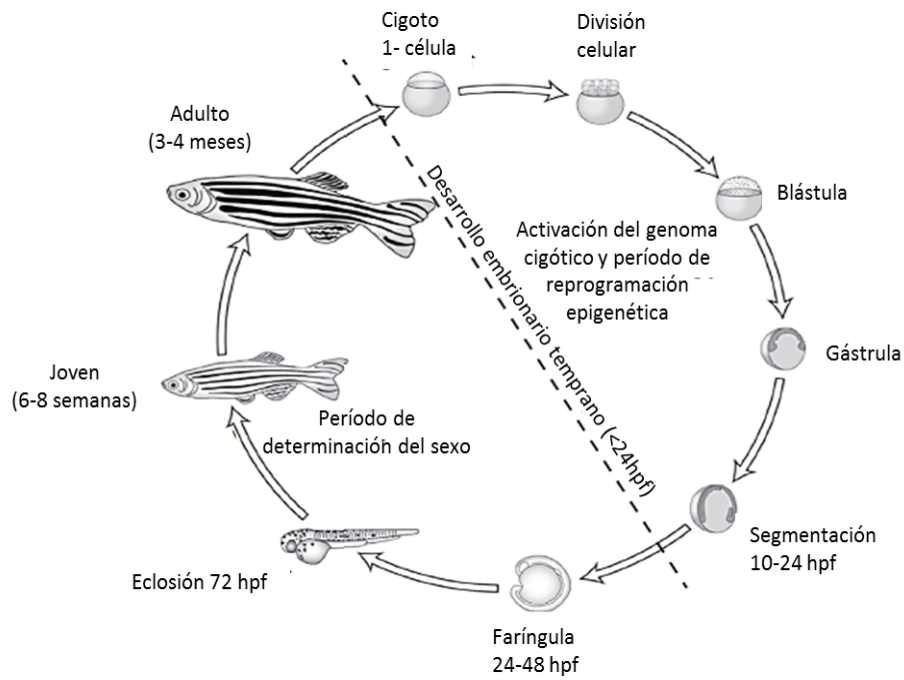


Figura 9. Desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) desde de la fecundación, (cigoto) hasta la edad adulta. Adaptado de Aluro 2017.

Las características de cada fase son:

- Cigoto: son formados luego después de la fertilización de los huevos (entre 0 – 45 minutos post fertilización), compuestos por apenas una célula (Kimmel et al, 1995). En el centro del embrión se reconoce una gran cantidad de vitelo en el polo vegetativo y en el lado opuesto, localizado sobre el vitelo, está el polo animal, por donde fluye el citoplasma formando el blastodisco. En la parte externa se observa el corión liso y transparente (Kimmel et al, 1995) (Figura 10).

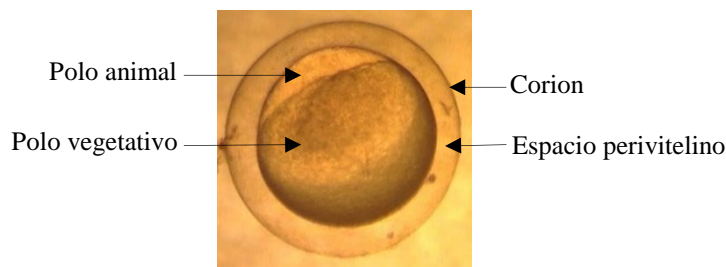


Figura 10. Cigoto 1 célula (0 – 45 min post fertilización)

- Estadio de división: En este periodo se activan los movimientos citoplasmáticos, con las primeras etapas de división, iniciada a los 45 minutos post fertilización.

Después de la primera división, las células, o blastómeros, se dividen a intervalos de aproximadamente 15 minutos, donde el embrión pasa de 2 a 64 células (de 45 min a 2 ¼ hpf) tras las divisiones que ocurren en este estadio (Figura 11) (Kimmel et al, 1995).

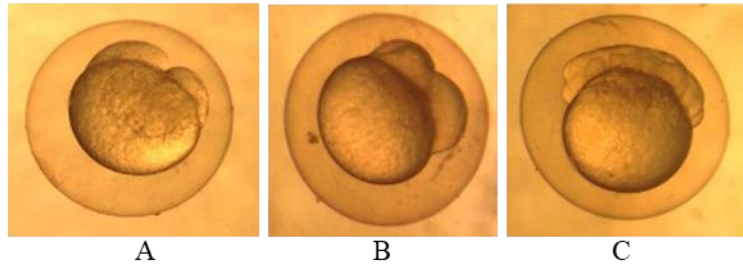


Figura 11. División celular de los embriones. En A y B se observan dos células y en C un embrión con múltiples células, en los tiempos de 45 min a 2¼ hpf.

- Estadio de Blástula: es una etapa que dura aproximadamente del periodo de 2 ¼ - 5 ¼ hpf. Esta etapa se refiere al período en el que el blastodisco comienza a verse como una bola y los ciclos celulares rápidos y metasincrónicos (inicialmente con 128 células) dan paso al alargamiento y una asincronía en el desarrollo y se inicia la epibolia (empieza a tomar forma el cuerpo del embrión, cerca de 30%) (Kimmel et al, 1995; He et al., 2014) (Figura 12).

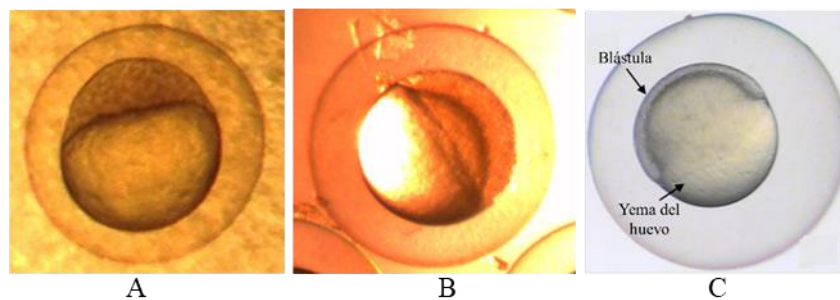


Figura 12. Fase de blástula embriones con 3 a 6 hpf (A, B y C en orden cronológico, de 2 ¼ - 5 ¼ hpf). Figura C adaptada de He et al., 2014.

- Etapa de Gástrula: es la etapa que ocurre entre las 5 ¼ - 10 hpf. Durante este proceso el embrión adquiere tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y adquiere una orientación axial. El proceso de gastrulación implica

un crecimiento embrionario, aumentando el tamaño. Formación del cerebro rudimental más espeso, brote de la cola prominente, rudimento de notocorda distinto de la quilla neural y formación del epibole al 100% (Figura 13) (Kimmel et al, 1995).

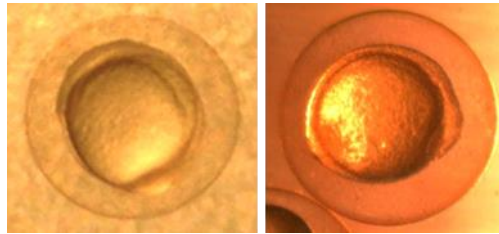


Figura 13. Fase de gástrula, 8 hpf.

- Estadio de segmentación: en este estadio, que ocurre entre 10 – 24 hpf, se produce una gran variedad de movimientos morfogénéticos, se desarrollan las somitas y se hacen visibles los rudimentos de los órganos primarios (primordios del arco faríngeo y neurómeros) (Figura 14). También hay la formación de la cola que se vuelve más prominente, el embrión se alarga, las primeras células se diferencian morfológicamente y aparecen los primeros movimientos corporales, espasmos musculares, flexiones de lado a lado, formación del cristalino, vesícula ótica y otolitos (Gilbert et al., 1994; Kimmel et al., 1995).

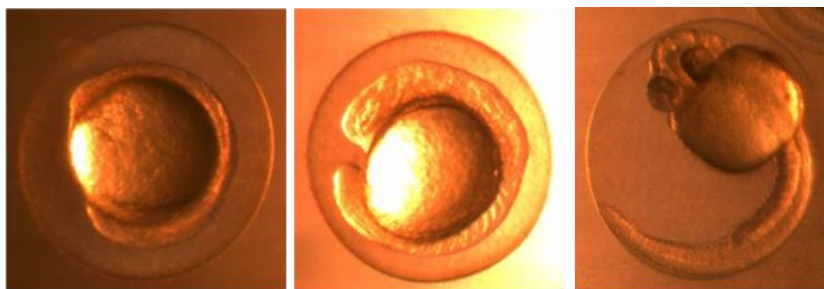


Figura 14. Fase de segmentación embriones de entre 10 y 24 hpf (figuras en orden cronológico).

- Estadio de Faríngrula: El embrión presenta su forma más evidente en etapa filotípica (entre las 24 – 48 hpf), comienzan a desarrollar el sistema circulatorio, los arcos faríngeos, la pigmentación y las aletas también comienzan a

desarrollarse (Figura 15). Es visible el latido cardiaco (48 hpf) y formación de cámaras bien delineadas, además del inicio de la circulación a través de un conjunto cerrado de canales. (Kimmel et al., 1995).



Figura 15. Fase de faríngrula, embriones de 48 hpf.

- **Estadio de Eclosión:** La eclosión puede ocurrir a partir de las 48 hpf, pero suele ocurrir más a las 72 hpf. En este estadio, ocurre la finalización de la morfogénesis rápida de los sistemas de órganos primarios, desarrollo de cartílago en la cabeza y estrión pectoral (Figura 16). La morfogénesis de muchos de los órganos es bastante completa y se ralentiza considerablemente, con algunas excepciones notables que incluyen el intestino y sus órganos asociados (Kimmel et al., 1995). La pigmentación (melanóforos) es prominente en los ojos, pero aún es lo suficientemente ligera como para poder visualizar fácilmente los núcleos celulares no pigmentados en este epitelio retiniano y los melanóforos también aparecen lateralmente en el tronco y la cola (Spencer et al., 2008).

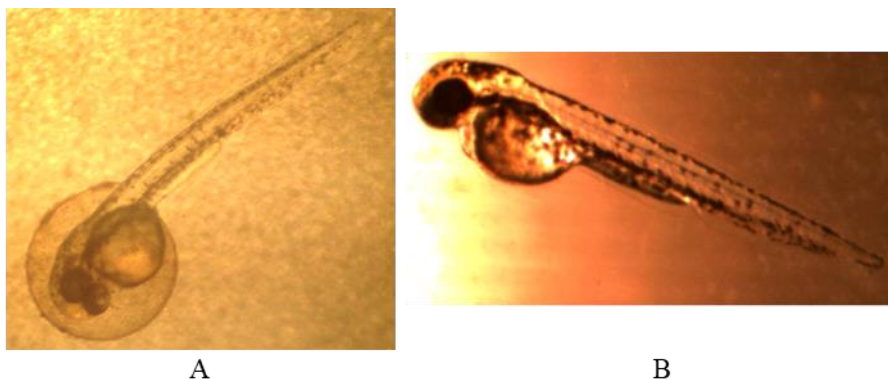


Figura 16. Proceso de eclosión de un embrión (A) y larva tras eclosión (B) a las 72 hpf.

Después de la eclosión el periodo en que se considera el pez cebra como larva se extiende hasta los 29 días post fertilización, cuando el embrión ha completado la mayor parte de su morfogénesis y continúa creciendo rápidamente. La tasa de crecimiento es más alta en los tres primeros meses y casi nula a los 18 meses (Spencer et al., 2008). Son consideradas larvas tempranas con edad entre 72 horas a 13 días después de la fertilización. En el quinto día, o justo antes de este día (generalmente relacionado con la temperatura del agua), las larvas inflan sus vejigas de gas al nadar y tragan aire en la superficie. Después de este punto, tienen una flotabilidad neutra y son capaces de nadar continuamente y mantener su posición dentro de la columna de agua (Figura 17) (Kimmel et al 1995; He et al. (2014). De los 30 días a 3 o 4 meses, son considerados peces juveniles, etapa en la cual se van definiendo el sexo fenotípico de los peces (Uchida et al. 2003)

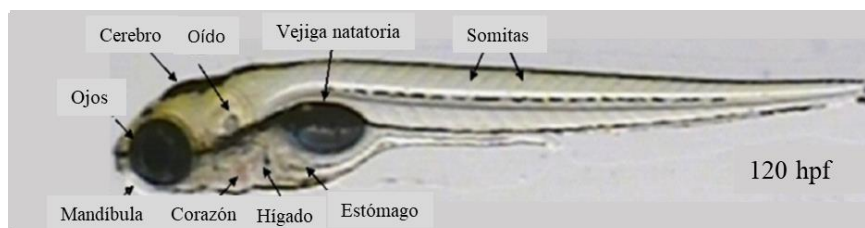


Figura 17. Larva de aproximadamente 120 hpf. (Adaptado de He et al., 2014).

El desarrollo de las gónadas para ambos sexos es precedido por una etapa de ovario juvenil, que luego se convierte en un ovario maduro en hembras, pero se degenera en los machos por medio de apoptosis (Rodríguez-Mari et al., 2010; Uchida et al. 2003). Esta etapa en el pez cebra es clasificada como etapa intersexual, que en los machos dura hasta las 5-7 semanas, periodo en lo cual el ovario juvenil comienza a diferenciarse, la gónada se reestructura para formar los testículos (Maack y Segner 2003; Nasiadka y Clark, 2012) y el desarrollo normal termina al tercer mes, dependiendo de la tensión y las condiciones de cría (Devlin y Nagahama, 2002; Maack y Segner, 2003).

Las primeras etapas de vida del pez cebra, son muy susceptibles a los efectos adversos, efectos de drogas y productos químicos en el medio acuático (von Hellfeld et al., 2020). El pez cebra ofrece varias ventajas para las pruebas de toxicidad, debido a características como alta fecundidad, rápido desarrollo externo, los huevos permanecen transparentes desde de la fertilización hasta la fase de faríngrula (poco antes de la eclosión) cuando se

forman los tejidos y ocurre a pigmentación (permiten ver los cambios morfológicos), además de un mantenimiento más económico y por cumplir las recomendaciones de las “3Rs” (Selderslaghs et al., 2009; He et al., 2014; von Hellfeld et al., 2020).

La utilización de los embriones en ensayos de embriotoxicidad es una alternativa para evaluación del riesgo de diversas sustancias químicas potencialmente perjudiciales a los humanos, animales y medio ambiente una vez que es capaz de predecir los resultados de la prueba estándar de mamíferos para la toxicidad prenatal del desarrollo (Stephens et al., 2019). Los embriones son considerados la alternativa más prometedora y desde una perspectiva regulatoria, ya han reemplazado el uso de peces juveniles/adultos para pruebas de toxicidad aguda de efluentes en Alemania, donde desde 2005 se exige la "prueba del huevo de pez cebra" (ISO, 2007, Busquet et al., 2014).

2.6.4. Pez cebra en estudios de ecotoxicología

Hace algunas décadas el pez cebra, fue introducido en investigación como modelo animal para estudios en genética, una vez que su genoma fue totalmente secuenciado y presenta gran similitud con el genoma humano. Se ha demostrado que aproximadamente el 70% de los genes que codifican proteínas y más del 80% de los genes de morbilidad relacionados con diversas enfermedades tienen al menos un ortólogo en el pez cebra, lo que los convierte en un modelo de vertebrado genéticamente manejable para la investigación de enfermedades humanas (Howe et al, 2013, Lakstygla et al., 2019).

Hoy se utiliza el pez cebra para investigación de enfermedades tales como cáncer (Feitsma y Cuppen, 2008; White et al., 2011), epilepsia y enfermedades neurológicas; en estudios comportamentales (Cachat et al., 2010), detección de drogas (Rubinstein, 2006) y xenotrasplante (White et al., 2008). Es un modelo perfecto para estudios en farmacología, toxicología y ecotoxicología (Braunbeck y Lammer, 2006; Scholz et al. 2008; Dai et al., 2014). Los peces actúan como centinelas a cualquier alteración en la calidad de las aguas de los medios acuáticos y desde el punto de vista emocional y político ayuda en la detección, monitoreo y control del exceso de contaminantes en el agua (Braunbeck y Lammer, 2006).

Para las condiciones laborales el pez cebra es un modelo experimental de fácil manejo por su tamaño pequeño que permite un número alto de peces en un espacio

reducido (Matthews et al., 2002). Tales características se encajan perfectamente en la idea de las 3R's (refinar, reducir, reemplazar) para la utilización racional de los animales en investigación, pensando también en su bienestar (OECD 171, 2012).

Estudios con etapas tempranas de la vida del pez cebra pueden predecir la toxicidad a largo plazo y reemplazar las pruebas de toxicidad aguda en peces adultos. Los embriones son más sensibles a sustancias con baja y alta toxicidad, presentando resultados fiables en la comparación con las pruebas en peces adultos (Nagel, 2002, Braunbeck et al., 2005; Braunbeck y Lammer, 2006; Noyes et al., 2018)

La actividad humana contribuye cada vez más para la polución ambiental, siendo el medio acuático unos de los más afectados. La contaminación del agua no solo afecta la supervivencia y reproducción de los organismos acuáticos, sino que también afecta negativamente la salud humana a través de la bioconcentración. Por la sensibilidad del pez cebra a la exposición a sustancias químicas en el agua, la capacidad de acumulación en diferentes tejidos, su utilización en los estudios en toxicología y farmacología son útiles en la investigar el poder teratogénico y la capacidad de DE presentado por algunas sustancias, tal como el BPA (Law, 2001; Parnig et al., 2002; Brannen et al., 2010; Dai et al., 2014; Noyes et al., 2018; Brundo y Salvaggio, 2018).

3. Objetivos

Debido a la gran problemática que envuelve a los disruptores endocrinos actualmente, tal como el BPA y sus efectos tóxicos a corto y a largo plazo en las siguientes generaciones, nuestro estudio tuvo los siguientes objetivos (principales y secundarios):

- **Principales**

1. Evaluar los efectos tóxicos del BPA en el desarrollo embrionario (embriotoxicidad) del pez cebra, tras la exposición de los padres a distintas concentraciones de BPA (500, 50 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BPA) durante 21 días.
2. Evaluar las posibles alteraciones histopatológicas en las gónadas de los peces adultos tras la exposición de 21 días al BPA.

- **Secundarios**

1. Determinar los valores estándares del medio acuático para los parámetros de calidad de agua en estudios con el pez cebra para promover el bienestar de los animales durante las subsecuentes investigaciones y obtención de resultados fiables.
2. Evaluar los parámetros reproductivos de fecundidad y fertilidad tras la realización de cruces del pez cebra en las condiciones laborales estandarizadas.
3. Evaluar la eficacia del azul de metileno y del medio embrionario E3 en la incubación de embriones de pez cebra.
4. Determinar la concentración de BPA en el cuerpo de los peces expuestos para evaluar la capacidad de absorción del producto por parte de los animales y su correlación con la concentración a la que fueron expuestos.

4. Material y Métodos

Todos los procedimientos contaban con el asesoramiento y autorización del Comité de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Córdoba (UCO) (04/05/2018/076). También estaban de acuerdo con las directrices de la Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD (OECD TG 229, 2012; OECD TG 236, 2013), y las directrices de la Directiva 2010/63/UE, siguiendo las recomendaciones europeas de bienestar animal. Los procedimientos experimentales se realizaron en Servicio de Experimentación Animal de la UCO, así como en los laboratorios del Área de Toxicología del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la UCO.

4.1. Estandarización del medio acuático, de la fertilidad la fecundidad y viabilidad embrionaria

El planteamiento de esta fase se hizo con la intención de regular los parámetros de calidad de agua para garantizar el bienestar de los peces, antes de cualquier prueba de toxicidad. Así como establecer los primeros parámetros reproductivos donde se realizaron cruces y se evaluó la fecundidad, fertilidad y viabilidad de la descendencia tras distintos tratamientos y utilización de medios embrionarios en la incubación.

4.1.1. Animales

Fueron utilizados pez cebra 44 peces cebra (20 machos y 24 hembras), clínicamente sanos, con aproximadamente 28 semanas de edad al inicio de la prueba, provenientes de un criadero idóneo y utilizados apenas en las pruebas de estandarización. Mantenidos en acuarios separados por sexo durante el periodo de estandarización de 12-13 meses para adaptación del sistema y regulación de los parámetros ideales de mantenimiento, retirados apenas para las pruebas de reproducción y evaluación embrionaria, que se realizaban en tanques de reproducción preparados para los cruces. Los peces fueron alimentados con comida seca comercial (Vitality e Color®) *ad libitum* dos veces al día con ayuda de

comederos automáticos (EHEIM®) complementada con *Artemia salina* (Ocean Nutrition™) almacenada de forma congelada.

4.1.2 - Instalaciones y evaluación del medio acuático

La sala de estabulación de los animales contaba con el control de la temperatura y humedad, el fotoperiodo fue de 14/10 (oscuridad/ luz), temperatura media del agua de $24.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$. Se ha utilizado el sistema tipo cerrado, donde los cambios de agua y los parámetros de calidad de agua se hacían manualmente.

Durante el periodo de estandarización, los peces fueron divididos por sexo en dos acuarios, A y B. El acuario A, compuesto por hembras, tenía una capacidad de 120 L (dimensiones de 40 x 30 x 100 cm) y el acuario B, compuesto por machos, tenía la capacidad de 100 L (dimensiones de 40 x 27 x 79 cm). Los dos acuarios fueron llenados hasta aproximadamente 60-62% de su capacidad total y el cambio de agua realizado a cada semana en un total de 25% de renovación de agua por acuario, en un sistema cerrado. Las condiciones adaptadas según las recomendaciones de distintos trabajos de referencia, considerando el tamaño del acuario y la cantidad de peces, así como las condiciones laborales disponibles (Lawrence 2007; Westerfield, 2007; OECD 234, 2011; Avdesh et al., 2012; OECD 229, 2012).

Para la reposición de los acuarios A y B se ha utilizado un acuario de Reposición, donde el agua, sin peces, permanecía con filtro, oxigenación y temperatura adecuada. El acuario R se llenaba con el agua proveniente del sistema de distribución general con un incremento de 10% de agua destilada, adición de anticloro y ocasionalmente la adición de antifúngico. El tanque de Reposición permanecía cerca de 48 h recirculando el agua antes de ser utilizado en la reposición de los acuarios A y B en cada cambio de agua. También se controlado la calidad de agua en el tanque de Reposición, con evaluaciones de dureza, pH, conductividad, alcalinidad, temperatura y residuos nitrogenados en la misma frecuencia en que se hizo en los tanques A y B.

En cada acuario (A, B y Reposición), se hizo el control del pH, temperatura interna de los acuarios y externa (sala), dureza, alcalinidad, nitrito, nitrato, amonio. Para medir las temperaturas (acuarios y sala) fueron utilizados termómetros de mercurio y otro digital

(Thermo-Hygrometer DC 105) (respectivamente), con registro de los datos diariamente. Se utilizó un medidor portátil de pH (PHMT-030-001 DE Lab box) y un conductímetro portátil (CD 310 DE EC Tester) para medir la conductividad, también realizados a diario en cada acuario. Para los demás parámetros se utilizaron kits de test rápido colorimétrico (NTLABS). Además, se utilizaron termorreguladores (EHEIM®), filtro (EHEIM®) y aireadores (Silent pump – SI200).

4.1.3 - Evaluación de la fecundidad y la fertilidad

Los tanques de reproducción tenían de proporción 17 x 26.5 x 13.5 cm, con capacidad de 6 L pero llenados hasta el volumen de 4.5 L. Dentro habían separaciones, que consistía en red fina al fondo, pero que permitía el pasaje de los huevos a la parte inferior de cada tanque y al mismo tiempo impedía que los adultos tuvieran acceso a los embriones. También había una separación intermedia para evitar el contacto físico entre machos y hembras durante la noche (Figura 18).



Figura 18. Acuario de reproducción utilizados en los ensayos con el pez cebra.

Se utilizaron cruces en la proporción de 6 hembras/5 machos en cuatro acuarios distintos, divididos en grupos de reproductores: R1, R2, R3 y R4. Los peces permanecieron en

acuarios de cruces por tres días seguidos, donde se evaluaba a la presencia de embriones y su retirada del acuario. Estos periodos de cruces se repitieron seis veces con intervalos de descanso entre ellos de aproximadamente una semana.

Se registraron los valores de fecundidad (FEC): número de huevos desovados sobre el número de hembras al día (incluyen los huevos con signos de coagulación y no fecundados) (OECD 229; OECD 240). También se registró la fertilidad (FER) de los peces: número de embriones fertilizados y viables sobre el número total de huevos desovados (OECD 240), para control también de la capacidad reproductiva de los peces en el sistema utilizado.

4.1.4. Evaluación de viabilidad embrionaria

Azul de metileno

En la recolecta de los embriones de los acuarios, normalmente los mismos pueden venir con suciedades (residuos de comida y heces de los peces adultos) lo que puede aumentar la carga de microorganismo nocivos a los embriones, provocando su inviabilidad.

El azul de metileno (3,7-bis (dimetilamino)-cloruro de fenazationio) fue utilizado como desinfectante (bactericida y fungicida) (Christou et al. 2020). Para su utilización, se hizo una solución base de azul de metileno (Scharlau®, C.I. 52015 extra pure) a 0.1% en agua destilada y luego se añadió 3 ml de tal solución para cada litro de agua del sistema (solución final - SF) para ser utilizado como medio base para los embriones durante la incubación (medio con concentración final de azul de metileno a 3×10^{-5} %).

Para la prueba, los embriones fueron divididos en distintos tratamientos (T1, T2, T3) y un control, según el lavado y medio base para incubación:

- T1 – embriones lavados en agua del sistema y puestos solución final de azul de metileno;
- T2 - embriones lavados con solución final de azul de metileno y puestos en agua del sistema;
- T3 - embriones lavados y puestos en solución final de azul de metileno;
- Control – embriones lavados y puestos en agua del sistema.

Fueron utilizadas placas de Petri (90 x15 mm, PS, con 3 compartimentos), en un total de cuatro placas y una media de 58.75 ± 1.74 embriones/placa, cerca de 20 embriones por compartimento (Figura 19). Los embriones fueron incubados en estufa a 27 °C y evaluados en los tiempos de 24, 48, 72 y 96 hpf para determinación del:

- Número de coagulados.
- Tasa de mortalidad (total de embriones muertos por tiempo dividido por el total de embriones viables incubados).
- Tasa de eclosión a partir de las 48 hpf (total de eclosiones dividido por el total de embriones viables).
- Posibles malformaciones (columna irregular, edemas de corazón y/o saco vitelino, embriones completamente deformes).

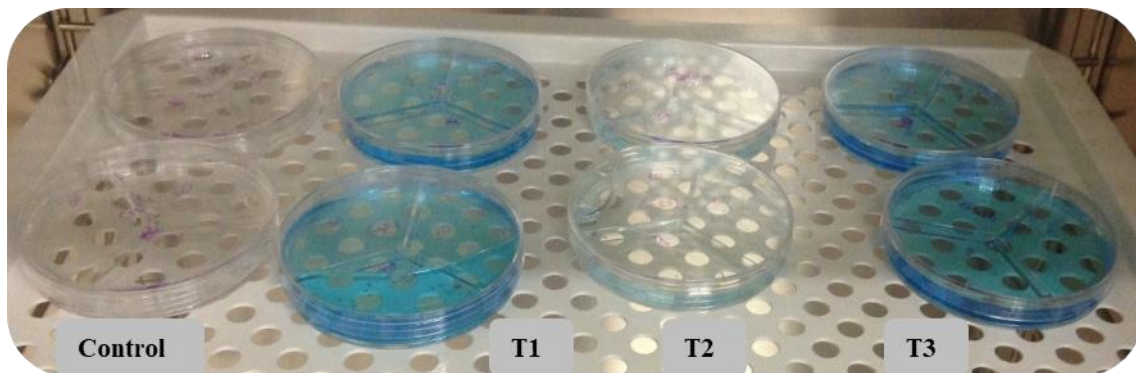


Figura 19. Placas de Petri separadas por grupos de tratamiento para la prueba del azul de metileno, incubadas en estufa a 27 °C.

Los parámetros fueron evaluados comparando las medias entre los grupos, de los resultados encontrados por placa.

Medio embrionario E3

Tras los resultados con azul metileno, fueron realizadas las pruebas con el medio embrionario E3. La composición del medio E3 utilizada fue: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, (PanReac Química SLU, España) (Brand et al., 2002, Burgess y Granato, 2007, Cold Spring Harb Protoc 2012, Best y Vijayan, 2018), como solución base 60x diluidos en 1 L de agua deionada y mantenida en nevera. Para la

preparación del E3 final, para servir de medio a los embriones, fueron diluidos 16 ml de la solución descrita anteriormente, en 1L de agua destilada, donde se podría añadir o no 100 µl de azul metileno 0.1 %, como antifúngico (1×10^{-6} % de concentración final del azul de metileno).

Realizamos pruebas para evaluar la eficacia del medio E3 en la viabilidad de los embriones separándolos en distintos grupos, con distintos medios (M):

- M1 – agua del sistema utilizada como medio.
- M2 – medio embrionario E3.
- M3 – medio embrionario E3 + 100 µl de azul metileno 0.1% (0.1 µl/L).

El pH de los medios M1, M2 y M3, fueron 7.84, 8.05 y 7.99 respectivamente y la conductividad de 790, 1030 y 1010 µS.

Hemos realizados dos pruebas distintas, una con cantidad más baja (carga baja de embriones por placa) de embriones por placa y otra con cantidad más alta (carga alta de embriones por placa):

- Carga baja: utilizados tres placas de Petri por grupo, con cerca de 45 embriones por placa, 15 embriones por compartimiento o sección de la placa.
- Carga alta: utilizados seis placas de Petri por grupo, con cerca de 60 embriones por placa, 20 embriones por compartimiento/sección.

Todos los embriones fueron incubados a 27 °C en placas de Petri (90 x 15 mm, PS, con 3 compartimentos) y evaluados a las 24, 48, 72 y 96 hpf. Igual que en la prueba del apartado anterior, del azul de metileno, se hizo la evaluación embrionaria por placas en cada grupo de prueba del medio y se contabilizó la media de huevos por placa en el tiempo cero, embriones viables a las 24 hpf, coagulados a las 24 hpf, tasa de mortalidad, tasa de eclosión a partir de las 48 hpf y posibles malformaciones.

4.2. Exposición de los peces adultos al BPA

4.2.1. Animales

Para la prueba de exposición, fueron utilizados otros 80 peces cebra (40 machos y 40 hembras), clínicamente sanos, con aproximadamente 28 semanas de edad, peso medio de 0.56 ± 0.14 g y una longitud furcal media de 4.57 ± 0.24 cm provenientes de un criadero idóneo. Para la reproducción, en cada acuario utilizado, los peces se mantuvieron separados hembras y machos durante todas las noches, ciclo de 14/10 (oscuridad/luz), para permitir la estimulación hormonal y reproducción del pez cebrá (OECD 229, 2012). Los tanques de reproducción tenían de proporción 17 x 26.5 x 13.5 cm, con capacidad de 6 L pero llenados hasta el volumen de 4.5 L, cada acuario tenía un termostato (EHEIM®), aireadores (Silent pump – SI200) y termómetro interno y digitales (Termohigrómetro DC105). Por las mañanas se quitaba la separación para permitir el cruce y posterior colecta de los embriones (que se quedaban al fondo de los acuarios de reproducción). En la sala de permanencia de los animales, hemos monitoreado a diario la temperatura y humedad. Los peces fueron alimentados con comida seca comercial (Vitality e Color®) *ad libitum* dos veces al día con ayuda de comederos automáticos (EHEIM®) complementada con *Artemia salina* (Ocean Nutrition™) almacenada de forma congelada.

4.2.2. Fase de aclimatación

Antes de la exposición de los animales al BPA, se realizó un periodo de aclimatación (preexposición) durante dos semanas (14 días) para ambientación de los animales al sistema, observación y obtención de datos referentes a la producción de huevos y viabilidad hasta 96 hpf, según recomendación de la OECD TG 229 (2012).

4.2.3. Evaluación del medio acuático

La medición del pH, conductividad, temperatura y humedad se realizó diariamente con ayuda de un pH metro (PHMT-030-001 DE Lab box), conductímetro (CD 310 DE EC

Tester), termómetros de mercurio y digitales (Thermo-Hygrometer DC 105) mientras que la dureza, alcalinidad, nitritos, nitratos y amonio, determinados una vez a la semana con la realización de test rápido (NTLABS). El mantenimiento de la calidad de agua se hizo a diario para el pH, temperatura y conductividad y cada seis días (justo antes de los cambios de agua) para el control de dureza, alcalinidad, nitrito, nitrato y amonio (Avdesh et al., 2012; OECD TG 229, 2012; Busquet et al., 2014; Tsang et al., 2017). Los cambios de agua en esta fase fueron de 25% del volumen total de agua y de 50 % durante la exposición al BPA a cada cinco días en la fase de. Se utilizó un sistema cerrado.

4.2.4. Reactivos

Para la fase de exposición el BPA (99%, 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano (Sigma® Aldrich, CO, USA) se diluyó previamente en etanol y se diluyó en agua destilada para la preparación de una solución base. A continuación, se añadió se añadió al agua de los acuarios de exposición a concentraciones de 500, 50 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (vom Saal y Welshons, 2006; Wetherill et al., 2007; Ji et al., 2013). Las disoluciones fueron preparadas justo antes de ser añadidas a los acuarios, incluyendo en los momentos de los cambios de agua, donde se añadieron cantidades de BPA proporcional al volumen a ser repuestos.

4.2.5. Determinación de Bisfenol A en agua y en los peces

Para la evaluación de la concentración de BPA durante el período de prueba, se tomaron muestras de 20 mL de agua en cada acuario una vez a la semana (días 7, 14 y 21 de la exposición). Las muestras se mantuvieron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la verificación analítica de las concentraciones mencionadas. Antes del análisis, las muestras se descongelaron y se procesaron para su acondicionamiento con hidróxido de amonio; después, se filtraron a través de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ y se evaluaron en un sistema LC-MS/MS de ionización negativa con un límite de detección de $0.2\text{-}0.3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

También se evaluó la concentración de BPA en los peces tras 21 días de exposición mediante el homogeneizado individual de los cuerpos de tres hembras y tres machos, que fueron seleccionados al azar de cada grupo experimental. Las muestras de peces se

homogenizaron a 10.000 G en tubos de 1 mL, en una proporción de 1:2 del peso corporal, en una solución tampón (50 mM Tris-HCl pH 7.4). Las muestras fueron posteriormente procesadas para su extracción y purificación y finalmente transferidas a viales, utilizando para ello una modificación de la técnica empleada por Schmidt et al. (2008). A continuación, se inyectaron 20 μ l en un sistema LC-MS/MS de triple cuadrupolo con detector 1200 L para la cuantificación final del BPA. Las condiciones del sistema HPLC fueron las mismas que las descritas anteriormente por nuestro grupo de investigación (Molina et al., 2018).

4.2.6. Grupos experimentales

En la fase de estandarización, los peces fueron mantenidos en acuarios de reproducción durante todo el periodo de aclimatación. El total de peces fue dividido de forma aleatoria entre cuatro grupos GP1, GP2, GP3 y GP4, cada grupo se realizó en duplicado (8 acuarios en total) (mismos grupos de reproductores utilizados posteriormente en la exposición). El total de peces adultos, la división de los grupos experimentales, la recolecta y evaluación de embriones, el mantenimiento diario de los acuarios ha seguido la misma dinámica realizada a posteriori en la exposición de los animales al BPA, descritas en el siguiente apartado. En esta fase se observó el comportamiento de los peces durante la adaptación al sistema, mirando cambios como agresividad, hiperventilación (por la calidad de agua). Se ha evaluado la reproducción de los peces contabilizando el número de puestas efectivas en el periodo, calculando la fecundidad (FEC), la fertilidad (FER), número de coagulados y embriones viables a las 24hpf, para verificar se tenían condiciones reproductivas adecuadas para la obtención de los embriones viables.

Tras la adaptación de los peces a las condiciones del sistema, se procedió la exposición de los animales al BPA en distintas concentraciones por grupo: 500, 50 y 5 μ g L⁻¹, grupos G1, G2 y G3 respectivamente, además de un grupo Control (sin contacto con el BPA). Para el ensayo, los peces permanecieron en acuarios de reproducción (con separaciones internas para evitar la depredación de los huevos) durante todo el periodo de exposición, que fue de 21 días. Se realizó un duplicado de cada grupo. Se utilizaron ocho acuarios (dos por grupo), con un total de 10 peces por acuario (n=20 por grupo) (Figura 20).

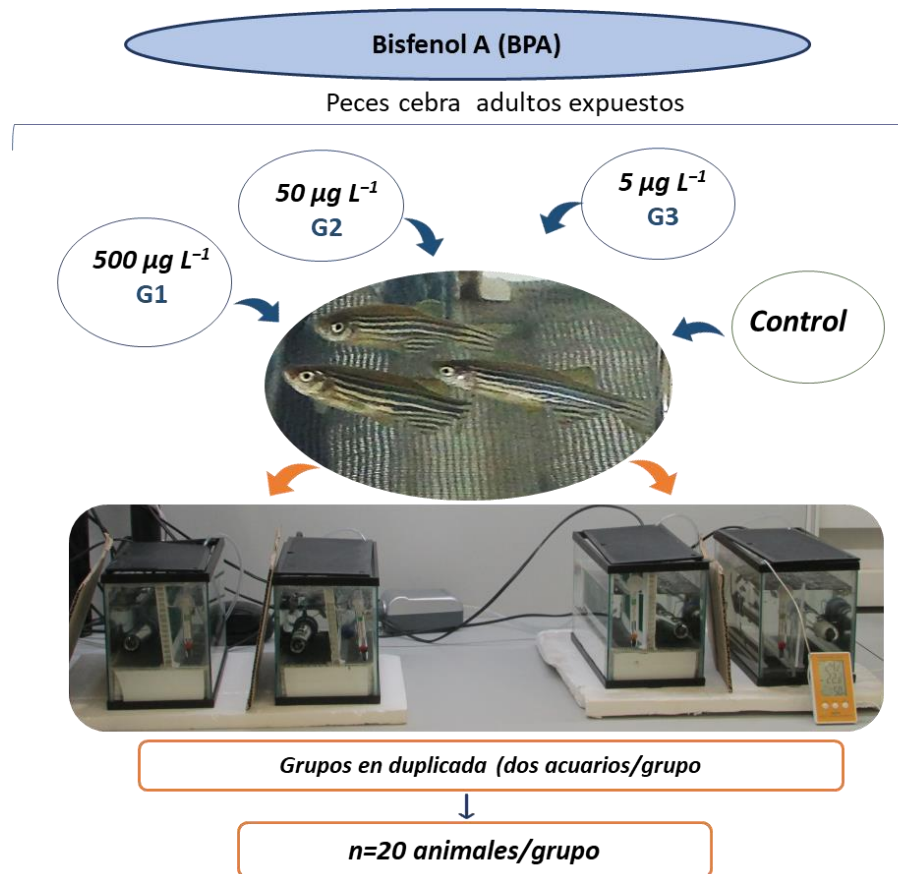


Figura 20. Esquema de la distribución de los grupos experimentales y distribución de los animales en el sistema.

4.2.7. Evaluación de los peces adultos (reproductores): Signos de toxicidad, Fecundidad y Fertilidad

Los peces fueron observados durante el ensayo para observación de cualquier comportamiento anormal (relativo a los controles), signos de toxicidad general, como hiperventilación, natación descoordinada, pérdida de equilibrio e inactividad o alimentación atípica. Además, de la observación de anomalías externas (como hemorragia, decoloración). Dichos signos de toxicidad son importantes para la interpretación de los datos. Observación del pez cebrado en el comportamiento característico de apareamiento y desove después del inicio de la luz en el amanecer, si se ve reducido u obstaculizado por la exposición estrogénica o anti-androgénica. Algunos aspectos de la apariencia (principalmente el color) también fueron evaluados para determinación de posibles efectos tóxicos del químico durante el curso de la prueba. Características externas observadas en el color del cuerpo (claro u oscuro), patrones de coloración (presencia de bandas verticales) y forma del cuerpo (cabeza y región pectoral).

Fueron contabilizados los huevos producidos en cada acuario de réplica en los grupos para la evaluación de la capacidad reproductiva de los peces adultos (fecundidad y fertilidad). La fecundidad y fertilidad se evaluaron durante la preexposición y tras la exposición a los 21 días en cada replica de cruce expuestos a las distintas concentraciones de BPA además del grupo control (OECD 229; OECD 236, OECD 240). Para evaluar la fecundidad también se consideran huevo coagulados y no fecundados, mientras que la fertilidad considera apenas los embriones viables. Además, se evaluaron la viabilidad de los embriones hasta las 96 hpf (descritos en el apartado sobre la evaluación embrionaria).

4.2.8. Evaluación de los embriones (F1)

La recolecta y observación de los embriones tuvo la misma metodología tanto en la fase de preexposición como en la fase de exposición, donde se observaron las alteraciones caracterizadas como embriotoxicidad.

Los embriones obtenidos durante el periodo de prueba fueron recolectados por la filtración del agua de los acuarios a través de un colador y lavados (medio E3 sin adición de BPA). Para la recolecta, los padres fueron desplazados a un vaso de precipitado de 3 litros (con parte del agua del propio tanque de reproducción) y luego se realizó la filtración del agua del acuario con ayuda de un colador. Los embriones atrapados en el colador fueron transferidos a un vaso de precipitado de 200 ml con medio embrionario E3 y luego a otro vaso también con medio E3 para la limpieza y retiro de suciedades mezcladas con los embriones (Figura 21) (OECD TG 236, 2013). Luego los embriones fueron puestos en una placa de Petri para evaluación de las señales de fertilización (4 - 32 células en división) y descarte de aquellos que presentaban señales prematuras de coagulación, formación de burbujas en los polos y asimetría alrededor del corion. Por último, los embriones en proceso de desarrollo fueron puestos en placas de Petri (de tres secciones) con medio E3 en la proporción de aproximadamente 45 embriones por placa (15 por sección). Tales procedimientos fueron realizados en cada acuario a cada dos días y los lavados tenían como objetivo la retirada de las suciedades y residuos de BPA en el medio.

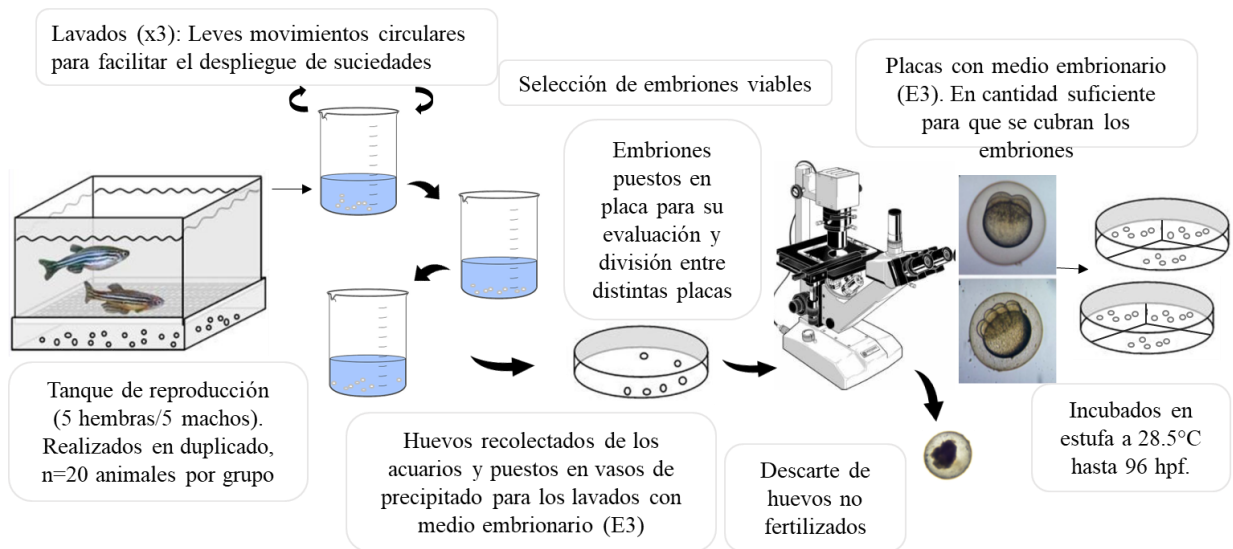


Figura 21. Representación esquemática de la reproducción, colecta, evaluación y almacenamiento de los embriones de pez cebra (Adaptado de OECD TG 236, 2013).

Todos los embriones fueron inspeccionados visualmente bajo un microscopio estereoscópico a las 24, 48, 72 y 96 horas post fertilización (hpf) (Hallare y Kohler, 2004; Selderslaghs et al., 2009; van den Bulck et al., 2011). Se evaluó: el total de embriones, porcentaje de coagulados, la tasa de mortalidad y de eclosión. Igualmente, se evaluó el desarrollo embrionario, determinando la tasa de deformidades (número de embriones anormales frente al número total de embriones), relacionada con la presencia de posibles alteraciones de embriotoxicidad y malformaciones. Para la evaluación de embriotoxicidad fueron observados características generales del desarrollo embrionario que no estaban presentes, tales como: desprendimiento de cola, formación de somitas, desarrollo ocular y/o oídos y pigmentación del cuerpo a partir de las 24 hpf y latido cardíaco, circulación sanguínea y movimientos a partir de 48 hpf. Para las alteraciones teratogénicas, los puntos finales observados entre 24 y 96 hpf, fueron: malformaciones en la cabeza (falta de estructuras como ojos, mandíbula u ojos de tamaños desiguales), malformación del corazón (edema, irregularidad de forma y latido), forma del cuerpo irregular (escoliosis, raquisquisis) y edema del saco vitelínico (OECD TG 236, Selderslaghs et al., 2009; J.-H. He et al, 2014; Beekhuijzen et al., 2015).

4.2.9. Eutanasia

Transcurridas las 3 semanas de prueba, los reproductores de los distintos grupos de estudio fueron eutanasiados utilizando metanosulfonato de tricaina (MS-222) en dosis de 500 mg/L adicionado en el agua, en combinación con bicarbonato de sodio para neutralizar el pH (Directiva 2010/63/UE, 2010). Posteriormente se procedió la medición de la longitud del cuerpo (desde el hocico hasta el punto de la horquilla de la aleta caudal). Se realizó la necropsia de los reproductores para extracción de las gónadas y peces enteros para posterior evaluación histopatológica y de las concentraciones de BPA en los animales.

4.2.10. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural

Tras la eutanasia y necropsia de los peces adultos, fueron colectados muestras de las gónadas (ovarios y testículos), de 56 animales (siete hembras y siete machos) de cada uno de los distintos grupos expuestos al BPA y grupo control. Posteriormente, para la histología, los fragmentos fueron almacenados en formol (*Sigma® Aldrich*, CO, USA) tamponado a 10% y deshidratados posteriormente en escala ascendente de etanol para el procesamiento en parafina (*Sigma® Aldrich*, CO, USA). Las secciones de cada bloque fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE), para observación y toma de fotos a través de fotomicroscopio *Leitz Ortholux (ORTHOLUX microscope. Ernst Leitz GMBH Wetzlar)*.

Para la microscopía electrónica, los fragmentos fueron conservados en glutaraldehído a 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 1% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4) durante 30 minutos. Después de la deshidratación en escala ascendente de etanol e inclusión en Araldita, los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB (*Ultratome Nova LKB Bromma*) (Servicios Centrales de Investigación, SCAI, Universidad de Córdoba). Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina (*Sigma® Aldrich*, CO, USA), 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 JEM 1400 (TEM; JEOL, Ltd. Freising, Alemania).

4.3. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías por el programa GraphPadPrism versión 9.0.0, (San Diego, CA, USA). Los parámetros que seguían distribución normal fueron evaluados por la prueba de Tukey, los no paramétricos aplicando la prueba de Kruskal-Wallis y los estudios de correlación entre variables se ha utilizado la prueba de Pearson r y en las comparaciones. Para comparaciones entre dos grupos hemos utilizado la prueba t de Student. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

Todas las alteraciones de embriotoxicidad se recopilaron en plantillas de Excel para el análisis cuantitativo, con un cálculo de sus porcentajes en los diferentes grupos de evaluación (Selderslaghs et al., 2009). El porcentaje de embriotoxicidad, en cada hora post fecundación, se calculó por la proporción de embriones y larvas alterados sobre el número de embriones vivos a las 24 h. Igualmente, el porcentaje de embriones coagulados se calculó tomando la proporción de estos últimos sobre el total de embriones recogidos en cada grupo antes de las 24 hpf. Además, se evaluaron los porcentajes de mortalidad y eclosión en cada tiempo de observación, calculándolos en base al número total de embriones y/o larvas en cada uno. Para la evaluación de los indicadores de embriotoxicidad se utilizó el programa GraphPadPrism versión 9.0.0, aplicando la prueba de Kruskal-Wallis una vez que los datos no siguieron una distribución normal, considerando las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados con un valor de $p < 0.05$.

Para los análisis cuantitativos y estadísticos de las principales alteraciones histopatológicas, los hallazgos se tipificaron en diferentes categorías en función de la variable analizada. Se utilizó el test de Chi-cuadrado para verificar el grado de correlación entre las lesiones encontradas y las dosis de BPA administradas. También se aplicó la comparación de proporciones entre dosis para determinar las diferencias significativas entre los distintos grupos, considerando $p < 0.05$ como valor significativo.

5. Resultados

5.1. Estandarización del medio acuático, de la fertilidad, la fecundidad viabilidad embrionaria

5.1.1. Evaluación del medio acuático

Los valores obtenidos tras la evaluación del pH, alcalinidad, temperatura del agua, conductividad, dureza y residuos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato), están descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar general de los parámetros de calidad de agua, pH, temperatura, conductividad, dureza y alcalinidad, en los acuarios A, B y Reposición

Parámetro	Acuarios		
	A (♀)	B (♂)	Reposición
pH	7.67±0.39 ^a	7.70±0.41 ^a	7.93±0.49 ^b
Temperatura (°C)	26.34±0.80 ^a	26.67±0.81 ^b	26.62±1.37 ^b
Conductividad (µS)	703.10±101.10 ^a	624.10±88.70 ^b	245.30±15.00 ^c
Dureza (ppm)	236.50±60.68 ^a	223.00±53.86 ^a	66.39±10.82 ^b
Alcalinidad (ppm)	46.29±21.20 ^a	51.18±21.84 ^a	52.16±9.82 ^a
Nitrato (mg/L)	63.80±25.47 ^a	42.60±25.53 ^b	4.27±2.30 ^c
Nitrito (mg/L)	0.23±0.39 ^a	0.23±0.24 ^a	0.15±0.14 ^a
Amonio (ppm)	0.07±0.15 ^a	0.02±0.06 ^b	0.00±0.00 ^b

^{a, b, c} Medias con letra iguales, en cada fila, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Se observa que en las comparaciones entre los promedios de los acuarios A y B, no hubo diferencias significativas para el pH, dureza, alcalinidad y nitrito. Mientras que, para los parámetros, temperatura (media más alta en B, 26.67±0.81 °C), conductividad (media más alta en A, 703.10±101.10 µS), nitrato (media más alta en A, 63.80±25.47 mg/L) y amonio (media más alta en A, 0.07±0.15 ppm) hubo diferencias ($p < 0.05$).

En las comparaciones de medias entre el acuario de Reposición y los acuarios con peces (A y B), solo la alcalinidad y los residuos de nitrito, no presentaron diferencia entre los

tanques. Para las demás variables, hubo diferencias entre el acuario de Reposición con uno o con los A y B.

Evaluando las medias de los cada uno de los parámetros de calidad por meses, se ha observado una diferencia significativa $p < 0.0001$ en A, B y Reposición para pH (Figura 22), temperatura (Figura 23), conductividad (Figura 24), dureza (Figura 25), alcalinidad (Figura 26) y nitrato (Figura 27). Una diferencia de las medias de nitrito (Figura 28) entre los meses de $p < 0.05$ y sin diferencia estadística para los valores de amonio (Figura 29) entre los meses en ninguno de los acuarios. Las comparaciones realizadas por la prueba t.

En ninguno de los acuarios hubo variaciones de más de 1.5 del pH. En la evaluación mensual de los acuarios, fue observado los valores más bajos o más neutros de pH (más próximo a 7), en los meses de agosto y septiembre (Figura 22). Al evaluar la correlacionar del pH con los demás parámetros de calidad de agua en los acuarios con peces, A y B, no se ha observado ninguna correlación significativa. Los cambios en el pH fueron muy bajos y no se vieron afectados por las pequeñas variaciones del medio acuático.

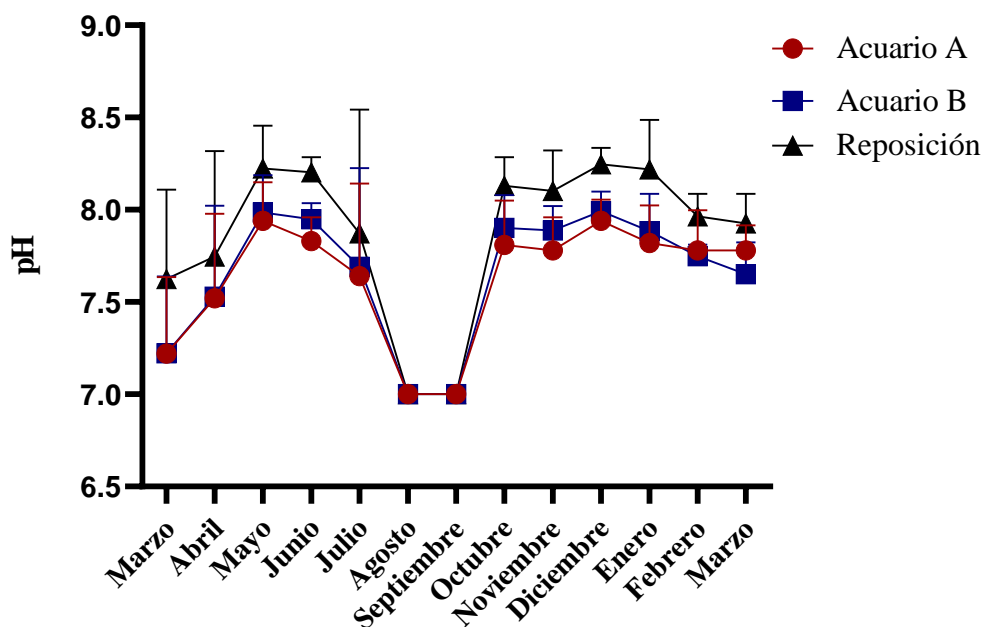


Figura 22. Promedio de los valores mensuales de pH en los acuarios A, B, Reposición.

La temperatura de los acuarios evaluados no ha sufrido variaciones altas (menos de 1°C en los acuarios con peces) (Figura 23). En un análisis correlativo de la temperatura con los demás parámetros en el acuario A, no se ha observado relación de la temperatura con ninguno de ellos. La temperatura del acuario B si tuvo una correlación significativa con la conductividad ($p = 0.047$), pero ninguna interacción con el pH, dureza, alcalinidad o con los residuos nitrogenados.

La temperatura de la sala (Figura 23), en la comparación entre las medias de cada mes, también ha presentado significancia por la prueba t ($p < 0.0001$).

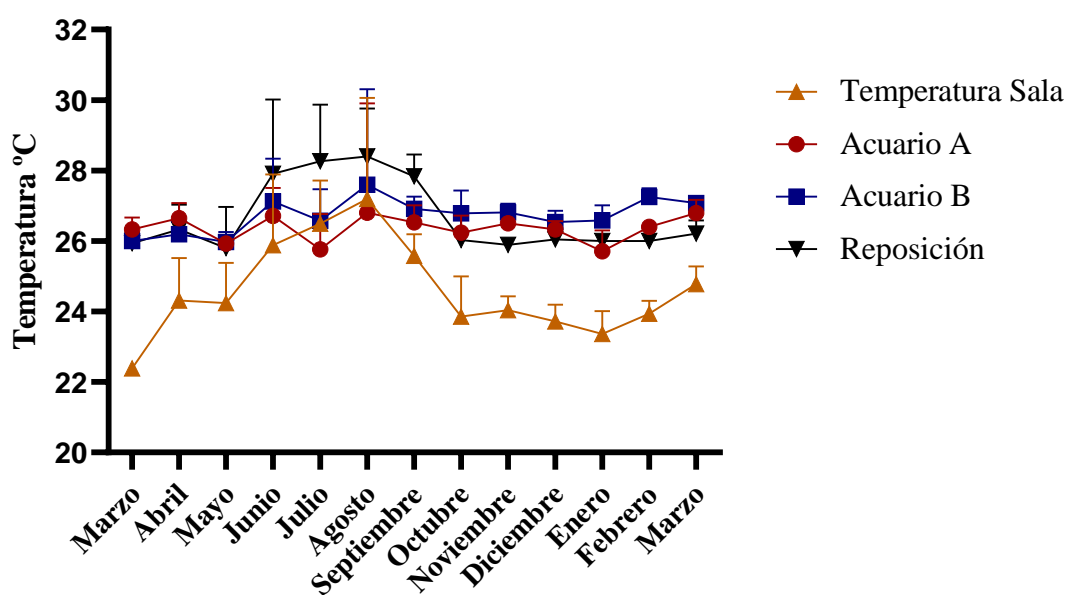


Figura 23. Promedio de los valores mensuales de Temperatura (°C) en los acuarios A, B, Reposición.

Los valores medios mensuales para la conductividad pueden ser visualizados en la Figura 24, donde se observa una constancia de cada acuario entre sus propias medias. Haciendo la correlación de la conductividad con las medidas de pH y nitrato, no se ha observado significancia con tales parámetros. Pero hubo correlación significativa al comparar con la temperatura en B (como comentado anteriormente), con la dureza en A ($p = 0.0023$) y B ($p = 0.139$), la alcalinidad en A ($p = 0.0096$), nitrito en A ($p = 0.0010$) y residuos de amonio en A ($p = 0.0003$) y B ($p = 0.0306$).

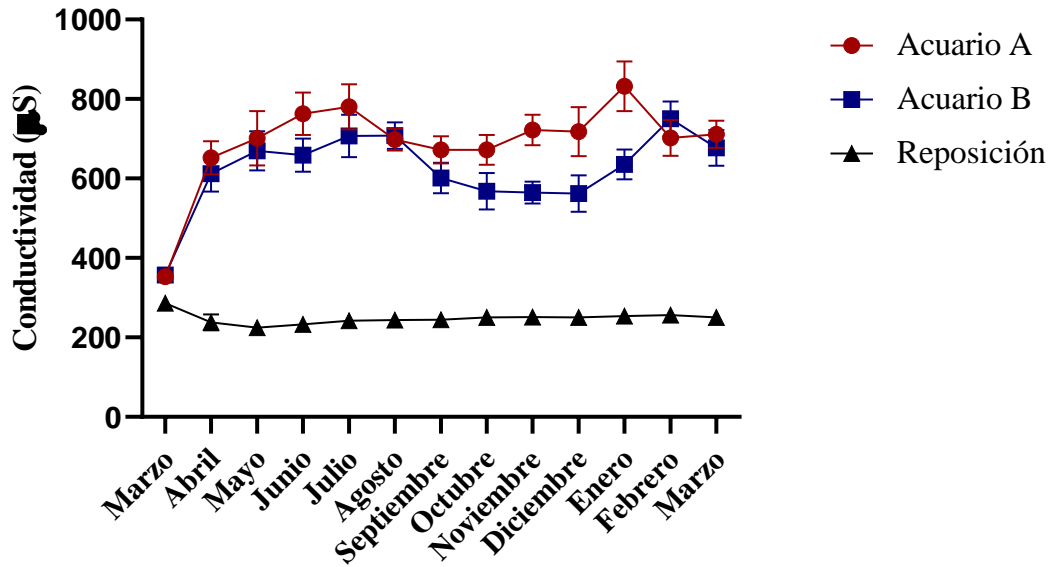


Figura 24. Promedio de los valores mensuales de conductividad (μS) en los acuarios A, B, Reposición.

A pesar de las medias de dureza (Figura 25) más altas estén concentradas en los meses de verano en los acuarios A y B, no se ha observado correlación de la dureza con la temperatura. Las correlaciones significativas encontradas, fueron además de la conductividad en A y B (mencionada anteriormente), con los residuos de nitrito en A ($p = 0.0009$) y B ($p = 0.0253$) y residuos de amonio en el acuario A ($p = 0.0414$). Con los demás parámetros no se ha observado correlación entre ellos y la dureza.

A lo largo de los meses la media de alcalinidad fue bajando en todos los acuarios, principalmente en A y B (Figura 26). En la evaluación de la correlación con los demás parámetros, se ha correlacionado con la conductividad en el acuario A, con el nitrato en el acuario B ($p = 0.0010$) y con residuos de amonio en A ($p = 0.0081$) y B ($p = 0.0171$).

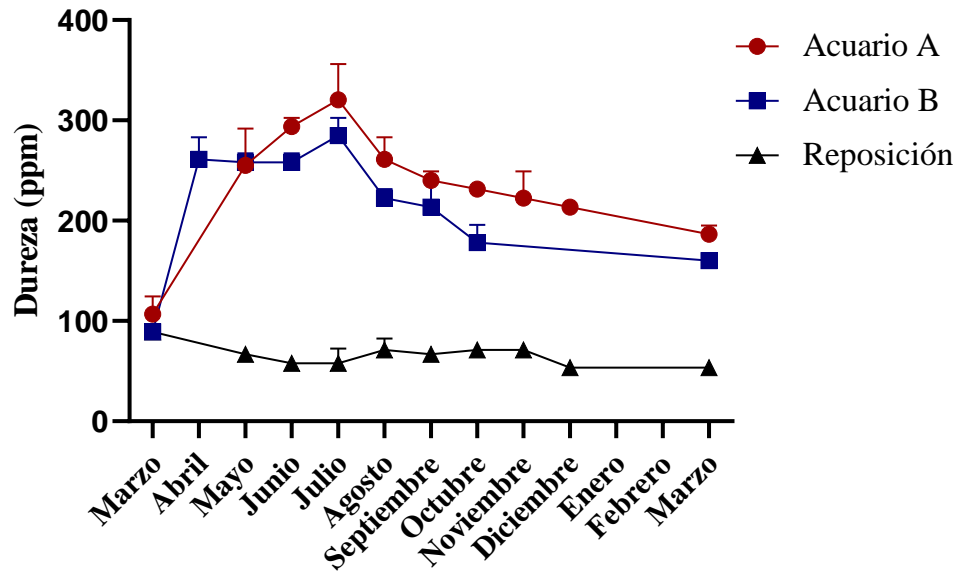


Figura 25. Promedio de los valores mensuales de dureza (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.

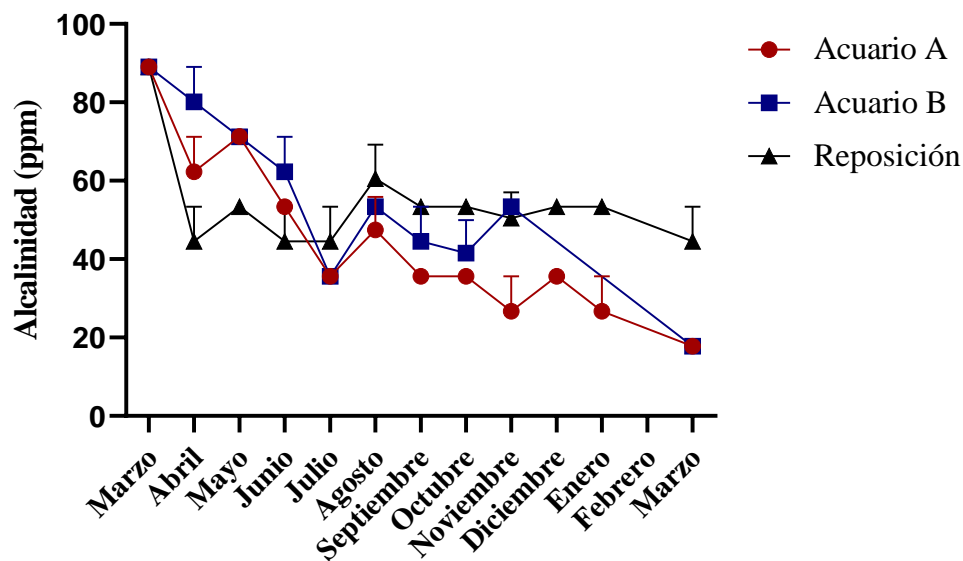


Figura 26. Promedio de los valores mensuales de alcalinidad (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.

Las variaciones a lo largo de los meses no han seguido un padrón lineal (Figura 27). En la correlación de los residuos de nitrato (NO_3) con los demás parámetros, se ha observado significancia con la alcalinidad en el acuario B (mencionada anteriormente) y con el amonio en A ($p = 0007$) y B ($p = 0.0273$).

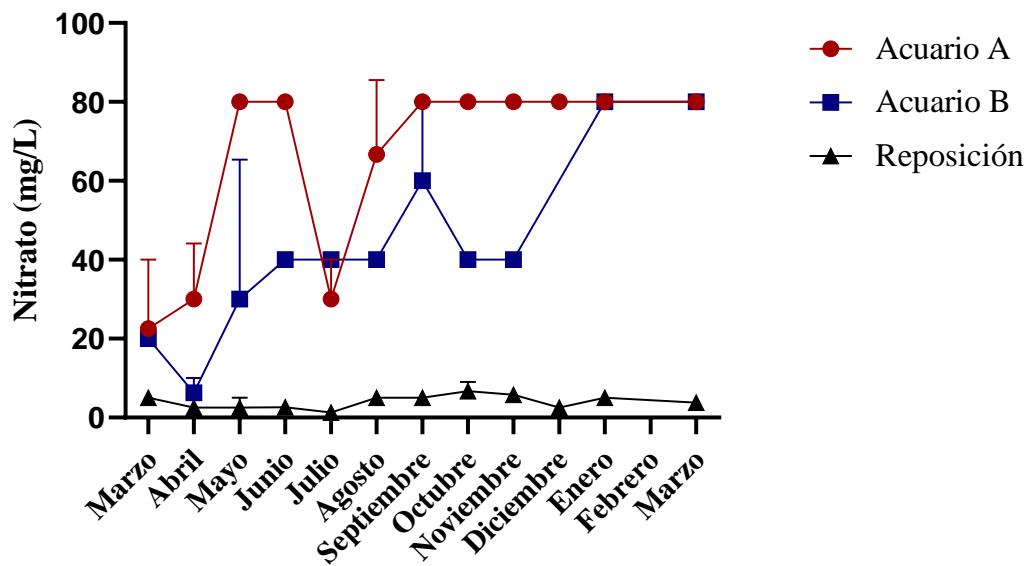


Figura 27. Promedio de los valores mensuales de nitrato (mg/L) en los acuarios A, B, Reposición.

Los residuos de nitrito (NO_2) en el acuario A, en el primer mes los niveles de nitrito presentaron una media más alta, pero con la regularización del mantenimiento los siguientes meses y se mantuvieron en todos los acuarios en el rango aceptable (Figura 28). En el análisis de correlación hubo una correlación significativa con la dureza en A y B, con la conductividad en A y amonio, también en A ($p = 0.0015$).

Se observa que el acuario A presenta una más alta variabilidad en la medida de amonio (NH_3), como se puede observar en la Figura 29, donde los niveles de amonio en los últimos meses se mantuvieron alrededor de cero. Otro punto importante fue la correlación que los niveles de amonio tuvieron con los casi todos los parámetros, siendo significativo con la conductividad, alcalinidad y nitrato en A y B y con la dureza y nitrito en A.

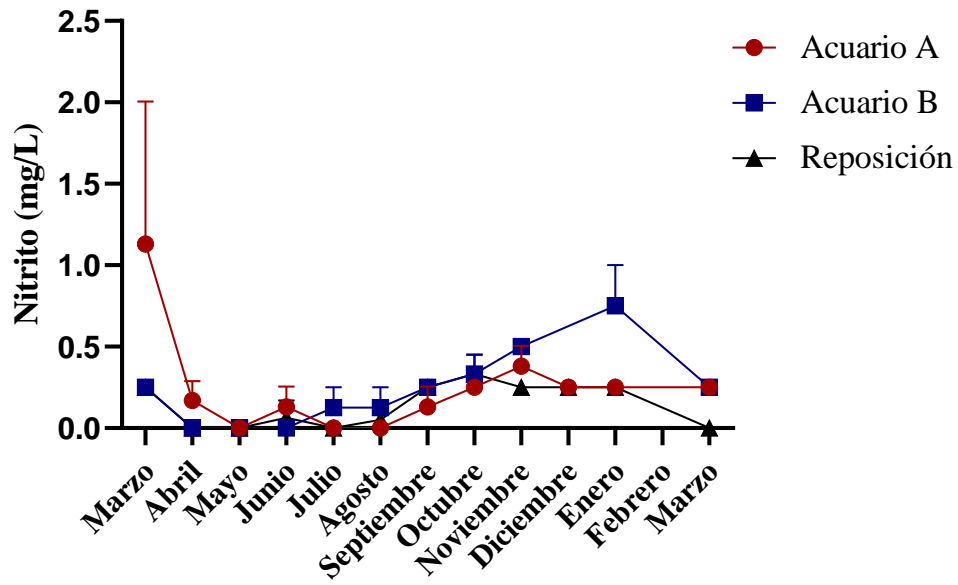


Figura 28. Promedio de los valores mensuales de nitrito (mg/L) en los acuarios A, B, Reposición.

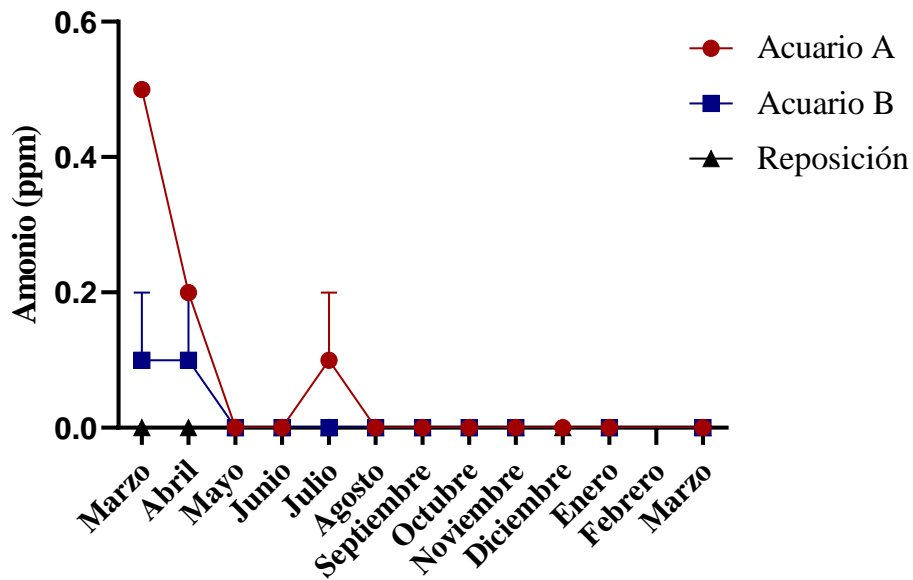


Figura 29. Promedio de los valores mensuales de amonio (ppm) en los acuarios A, B, Reposición.

En agosto, el mes más cálido en la ciudad, ha presentado la humedad más baja y la media de temperatura más alta, correlacionando de forma significativa entre las dos variables (Figura 30).

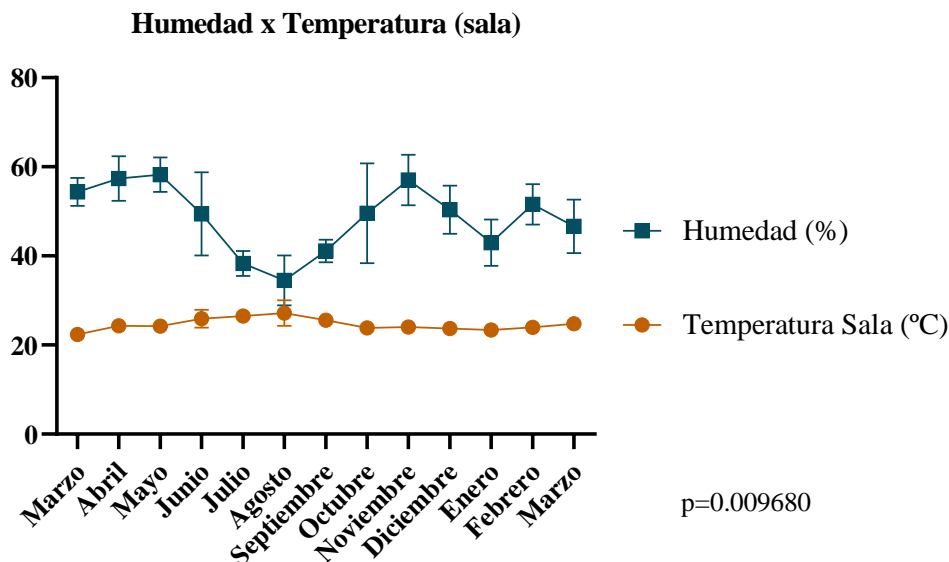


Figura 30. Valores medios de temperatura y humedad de la sala donde estaban instalados los acuarios. Correlación prueba de Pearson r ($p < 0.05$).

Correlacionando la temperatura de la sala con la de los acuarios, no hubo interacción con el acuario A pero si hubo significancia en la comparación con B ($p = 0.0311$). Para la humedad, también solo hubo correlación con la temperatura del acuario B ($p = 0.0341$).

5.1.2. Evaluación de fecundidad y fertilidad

En los grupos de reproductores, el porcentaje de desova efectiva sobre el total de cruces fue de 66.7% (cuatro desoves/seis cruces) en el grupo R1 y de 83.3 % (cinco desoves/seis cruces) en los demás grupos (R2, R3 y R4).

Hubo una gran variabilidad en el número absoluto de huevos por puestas en los grupos, llegando a un desove de apenas dos huevos en R3 a 978 huevos en R1, a pesar de sometidos a las mismas condiciones de mantenimiento y número de reproductores. La comparación entre las desovas totales de los grupos no ha demostrado ninguna diferencia

significativa, tras la realización de prueba no paramétrica, por no seguir una distribución normal.

La presencia de huevos coagulados a las 2 hpf, también ha demostrado gran variabilidad, desde cero coagulados en puestas de los grupos R1, R3 y R4 a puestas donde todos los embriones coagularon como observado en puestas de pequeño número de huevos, como el grupo R1 (4 coagulados de un total de 4 huevos), grupo R2 (seis coagulados de seis) y grupo R3 (dos coagulados de dos huevos totales). En las puestas con números más considerables de huevos se ha observado un porcentaje de coagulados de 0.2% en el grupo R1 (un coagulado de 458 huevos) a 30% en el grupo R2 (259 coagulados de 852 huevos). En las comparaciones del número de coagulados entre los grupos no se ha observado diferencia estadística.

En la evaluación de la FEC y la FER tampoco se ha observado diferencia significativa entre los grupos de reproductores. El más alto número para la fecundidad fue encontrado en el grupo R1 en un desove con media de 163 huevos/ hembra, también ha sido el grupo con mayor media general de huevos por hembra al día con valor de 64.71, pero fue el grupo con baja fertilidad a las 2 hpf con 71% de huevos fertilizados (variando entre 100% de fertilidad a 84%). En cambio, el grupo R4 ha presentado media general de fecundidad más baja entre los grupos, de 19.13 huevos/hembra/puesta pero una fertilidad, en media, más eficiente, de 92% (ha variado de 84 a 100%) (Tabla 4).

A las 24 hpf se ha observado una gran pérdida de huevos, con alto porcentaje de coagulados, con valores más altos en el grupo R4, con media de 58% de coagulados (variando de 24 a 98%). El porcentaje medio más bajo fue en el grupo R3, con 31% (variando de 15 a 34%). La comparación entre los grupos no ha presentado diferencia estadística.

La viabilidad evidenciada a las 24 hpf ha resultado, más baja, teniendo en cuenta el aumento de coagulados en el periodo. Alcanzando la mayor media en el grupo R3, con fertilidad de 57%, seguida del grupo R2 con 46%, grupo R4 con 41% y grupo R1 con el valor más bajo, 35%. Estadísticamente no hubo diferencia entre los grupos a pesar de la diferencia en el porcentaje (Tabla 5).

Tabla 4. Huevos por cruce, embriones, coagulados y embriones viables a las 2 hpf, además del cálculo de la fecundidad y fertilidad de los desoves efectivos en cuatro grupos de reproductores (R1, R2, R3 y R4) puestos en cruces en seis momentos distintos.

Grupo	Huevos/cruce	Coagulados 2hpf	Embriones viables en 2hpf	FEC	FER (%)
R1	458	1	457	76.33	100
	0	0	0	-	-
	4	4	0	0.67	0
	113	0	113	18.83	100
	0	0	0	-	-
	978	158	820	163.00	84
Total	1553	163	1390		
Promedio	388.3±43.2	40.75±78.2	347.50±370.1	64.71±73.0	71
R2	136	1	135	22.67	99
	0	0	0	-	-
	6	6	0	1.00	0
	172	1	171	28.67	99
	372	15	357	62.00	96
	852	259	593	142.00	70
Total	1538.00	282.00	1256.00		
Promedio	307.60±331.4	56.40±113.4	251.20±229.7	51.27±55.2	73
R3	0	0	0	-	-
	157	3	154	26.17	98
	2	2	0	0.33	0
	142	0	142	23.67	100
	421	6	415	70.17	99
	350	39	311	58.33	89
Total	1072	50	1022		
Promedio	214.40±169.4	10.00±16.4	204.40±161.2	35.73±28.2	77
R4	0	0	0	-	-
	57	0	57	9.50	100
	171	5	166	28.50	97
	171	28	143	28.50	84
	132	13	119	22.00	90
	43	5	38	7.17	88
Total	574	51	523		
Promedio	114.80±61.46	10.20±11	104.60±55.1	19.13±10.2	92

*promedios solo de las puestas efectivas

Tabla 5. Evaluación a las 24 hpf, con el número de coagulados, embriones viables y la fertilidad comparada con los embriones viables a las 2 hpf, en los cuatro grupos de reproductores (R1, R2, R3 y R4)

Grupos	Coagulados 24 hpf†	Embriones viables en 24 hpf	Viabilidad 24 hpf*(%)
R1	386 (84%)	71	16
	0	0	0
	59 (52%)	54	48
	185 (23%)	635	77
Total	630	760	
Promedio	157.50±170.8 (45%)	190.0±298.2	35
R2	53 (39%)	82	61
	0	0	0
	22 (13%)	149	87
	321 (90%)	36	10
	163 (27%)	430	73
Total	559,00	697,00	
Promedio	111.80±132.7 (45%)	139.4±171.7	46
R3	52 (34%)	102	66
	0	0	0
	21 (15%)	121	85
	141 (34%)	274	66
	102 (33%)	209	67
Total	316	706	
Promedio	63.20±58 (31%)	141.2±105	57
R4	56 (98%)	1	2
	79 (48%)	87	52
	63 (44%)	80	56
	94 (79%)	25	21
	9 (24%)	29	76
Total	301	222	
Promedio	60.20±32.2 (58%)	44.4±37.4	41

† (%) coagulados = n° de coagulados a 24 hpf/total de embriones viables a las 2 hpf x 100.

*Viabilidad= n° embriones viables a las 24 hpf/total de embriones x 100

Hubo un cambio en la viabilidad de las puestas por grupo en la evaluación en 24 hpf comparada a las 2 hpf. Anteriormente el grupo 4 tenía la fertilidad más alta, pero los altos niveles de coagulados a las 24 hpf hicieron con ese cuadro cambiara. A pesar de los cambios, de posición, los cruces mantuvieron alteraciones similares en todos los grupos. El medio y tratamiento de los embriones fue igual en todos los grupos, lo que demuestra la sensibilidad de los embriones en las primeras de vida.

5.1.3. Evaluación de viabilidad embrionaria

Azul de metileno

En la evaluación del azul de metileno, los embriones fueron divididos en cuatro placas con una variación media de 57.25 ± 5.50 (T3) a 60.50 ± 1.00 (Control). El total absoluto de embriones evaluados en cada uno de los tratamientos fue de 242, 240, 229 y 229 embriones en los grupos Control, T1, T2 y T3 respectivamente. Los resultados de la comparación de embriones incubados tras distinto tratamientos están expuestos en la Tabla 6.

Tabla 6. Medias y desvíos del total de embriones viables por placas y tasas de muertes en 48 horas post fertilización en los distintos grupos

Medio utilizado	Embriones por placa	Embriones viables (24 hpf)	Coagulados (hasta 24 hpf)	Tasa de muerte (48 hpf)
Control	60.50 ± 1.00^a	21.00 ± 10.10^a	39.50 ± 9.75^a	0.02 ± 0.02^a
T1	60.00 ± 0.00^a	18.75 ± 10.21^a	41.25 ± 10.21^a	0.02 ± 0.02^a
T2	57.25 ± 5.50^a	14.75 ± 9.03^a	42.50 ± 11.00^a	0.17 ± 0.12^a
T3	57.25 ± 5.50^a	19.25 ± 9.46^a	38.00 ± 11.52^a	0.29 ± 0.42^a

^{a, b, c} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En las primeras 24 hpf el número de coagulados ha llegado a más de la mitad de los embriones por placa. Con menor media en el control, 39.50 ± 9.75 embriones coagulados (cerca de 65.3% de coagulados en relación con el promedio de embriones viables puesto por placa) y más alto en T2, con media de 42.50 ± 11.0 embriones coagulados (cerca de 74.2% de coagulados) (Tabla 6). De este modo, la viabilidad en 24 hpf ha variado 14.75 ± 9.03 embriones en T2 y 21.0 ± 10.1 en el control.

La mortalidad en 48 hpf ha sido más baja en los grupos Control y T1 (media de 0.02 ± 0.02 embriones muertos sobre el total de viables en el periodo), con un promedio de muertes por placa de 0.5 ± 0.6 embriones en 48 hpf, y más alta tasa de mortalidad fue encontrada

en T3, con media de 0.29 ± 0.42 embriones muertos/total viables y un promedio de muertes por placa de 5.8 ± 7.8 .

Los grupos tratados con azul de metileno no presentaron mejoras con relación al grupo sin contacto con el producto. La comparación entre las medias de los grupos de tratamiento para número de embriones por placa, la viabilidad de los embriones, coagulados y muertes a las 24 hpf, no presentaron diferencias entre las múltiples comparaciones.

Respecto a las tasas de eclosión, se ha observado las primeras larvas en 48 hpf, con media de eclosiones de 3% (T3) hasta 8% (control y T1). A las 72 hpf se alcanzaron porcentajes de eclosiones de 49 % en T2 hasta el máximo de 78% en T1. Los niveles máximos de eclosionados se han observados a las 96 hpf, con tasa de eclosión más alta en T1 con media 0.97 ± 0.03 (97%) de eclosionados en relación al total de individuos en 96 hpf, una media que fue diferente significativamente ($p < 0.05$) del tratamiento T2 que obtuvo la baja tasa de eclosión entre los tratamientos, con media de 0.77 ± 0.13 (77%) de eclosiones/total individuos. En contrapartida, no hubo diferencia entre el T1 y los grupos Control (96% de eclosionados) y T3 (92% de eclosionados) a las 96 hpf (Tabla 7).

Tabla 7. Medias y desvíos de la tasa de eclosión a las 48, 72 y 96 hpf y de malformaciones en los distintos grupos.

Medio utilizado	Tasa de eclosión (48 hpf)	Tasa de eclosión (72 hpf)	Tasa de eclosión (96 hpf)	Tasa de Malformaciones
Control	0.08 ± 0.16^a	0.64 ± 0.13^a	0.96 ± 0.05^{abc}	0.03 ± 0.03^a
T1	0.08 ± 0.16^a	0.78 ± 0.20^a	0.97 ± 0.03^{ab}	0.02 ± 0.05^a
T2	0.04 ± 0.05^a	0.49 ± 0.14^a	0.77 ± 0.13^{ac}	0.04 ± 0.05^a
T3	0.03 ± 0.07^a	0.79 ± 0.23^a	0.92 ± 0.11^{abc}	0.00 ± 0.00^a

^{a, b, c} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

También se ha evaluado la presencia de alteraciones en el desarrollo embrionario en los distintos tiempos post fertilización. El único grupo que no ha presentado malformaciones fue el T3 y el grupo con más alteraciones fue el T2 con tasa media de malformaciones de

0.04±0.05 (4% de individuos alterados/total de viables, en valores absolutos representa un total de dos embriones alterados), aun así, no se observó diferencia estadísticamente entre ninguno de los tratamientos aplicados (Tabla 7). El total absoluto de embriones alterados en los demás grupos fue de tres alterados en T1 y dos alterados en el control. Las alteraciones encontradas fueron de edema de saco vitelino y en ocasionalmente en la columna (lordosis, escoliosis o cifosis).

Medio embrionario E3

- **Placas con carga baja de embriones**

En un primer momento se probó la carga embrionaria baja, que ha variado de 42.33±4.62 a 46.33±2.31 embriones/placa entre los distintos medios utilizados (Tabla 8) en tres placas.

Tabla 8. Prueba con una carga baja de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, coagulados en 24 hpf y tasas de eclosión a las 72 y 96 hpf en los distintos grupos

Medio utilizado	Embriones por placa	Embriones viables (24 hpf)	Coagulados (24 hpf)
M1	45.33±0.58 ^a	12.00±3.61 ^a	33.00±3.61 ^a
M2	46.33±2.31 ^a	10.67±4.04 ^a	35.67±2.08 ^a
M3	42.33±4.62 ^a	9.00±2.65 ^a	33.33±6.66 ^a

^{a, b} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

La media de coagulados en las primeras 24 hpf fue similar estadísticamente entre los grupos, con medias variando de 33.00±3.61 (el equivalente a 72.8% del total de individuos) coagulados en M1, 35.67±2.08 (cerca de 77.2% de coagulados) en M2 y 33.33±6.66 (cerca de 78.3% de coagulados) en M3. Consecuentemente la media de embriones viables fue reducida como se puede observar en la Tabla 8. En ningunas de las variables, coagulados y embriones viables, se ha observado diferencia entre los grupos en la prueba estadística. No hubo muertes después de las 24 hpf en ninguno de los tratamientos.

Las eclosiones empezaron en todos los grupos a partir de las 72 hpf. La tasa de eclosión entre los tratamientos a las 72 hpf fue más elevada el M2 con 0.68 ± 0.07 (68%) de eclosiones/total de individuos viables, presentando una diferencia estadística ($p = 0.0002$) al M1 que tenía una tasa de eclosión de 0.03 ± 0.04 (3%). El M3 tenía una tasa de eclosión de 0.61 ± 0.11 (61%) eclosiones/total individuos viables y también ha presentado diferencia ($p = 0.0003$) comparado al M1 (Tabla 9).

Las eclosiones a las 96 hpf llegaron al 100% de embriones eclosionados en los grupos M2 y M3, lo que han diferido de forma significativa ($p = 0.0019$ y $p = 0.0019$, respectivamente) del grupo M1 que ha presentado cerca de 24% de embriones eclosionados en 96 hpf) (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba con una carga baja de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, coagulados en 24 hpf y tasas de eclosión a las 72 y 96 hpf en los distintos grupos

Medio utilizado	Tasa de eclosión (72 hpf)	Tasa de eclosión (96 hpf)	Tasa de Malformaciones
M1	0.03 ± 0.04^a	0.24 ± 0.26^a	0.048 ± 0.042^a
M2	0.68 ± 0.07^b	1.00 ± 0.00^b	0.044 ± 0.077^a
M3	0.61 ± 0.11^b	1.00 ± 0.00^b	0.030 ± 0.052^a

^{a, b} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Respecto a las malformaciones, se ha observado una tasa muy similar entre los grupos, donde M1 ha presentado 0.048 ± 0.042 malformaciones/total de individuos viables (un total absoluto de dos individuos alterados en este grupo); M2 presentó una tasa de malformaciones de 0.044 ± 0.077 (total absoluto de dos individuos alterados en este grupo); M3 con media de 0.030 ± 0.052 (total absoluto de un individuo alterado (Tabla 9).

- **Placas con carga alta de embriones**

En un segundo momento, utilizando una carga más alta de embriones por placas, donde fueron evaluadas seis placas con una media entre 59.33 ± 1.63 (M1 y M3) y 60.17 ± 0.41 (M2) embriones/placa por grupo de tratamiento (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba con una carga alta de embriones por placa. Medias y desvíos del total de embriones recogidos y viables, tasa de muertes en 24 y 48 hpf en los distintos grupos

Medio utilizado	Embriones por placa	Embriones viables (24 hpf)	Coagulados (24 hpf)	Tasa de muerte (48 hpf)
M1	59.33 ± 1.63^a	21.00 ± 3.29^a	38.50 ± 3.21^a	0.00 ± 0.00^a
M2	60.17 ± 0.41^a	22.33 ± 3.56^a	37.67 ± 3.78^a	0.016 ± 0.03^b
M3	59.33 ± 1.63^a	20.33 ± 4.59^a	37.67 ± 6.83^a	0.018 ± 0.05^b

^{a, b, c} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

El promedio de coagulados a las 24 hpf todavía ha ultrapasado más de la mitad de los embriones. Se encontró el mayor número de coagulados en M1 con una media de 38.50 ± 3.21 embriones coagulados (lo que equivale a 64.9% de coagulados sobre el total de embriones por placas) y la media más baja en M2, con 37.67 ± 3.78 embriones coagulados (62.6% de coagulados/total embriones por placa) (Tabla 10). El porcentaje de coagulados en esta prueba ha presentado mejores resultados al comparar con la prueba de carga embrionaria por placa más baja.

La mortalidad en 48 hpf ocurrió en M2 y M3, con tasa de mortalidad de 0.016 ± 0.03 y 0.018 ± 0.05 muertes/total de individuos, respectivamente entre los grupos (Tabla 11). En M1 no hubo mortalidad a las 48 hpf pero aun así, las medias encontrada entre los grupo no difieren entre ellas.

Tabla 11. Carga alta. Medias y desvíos de la tasa de eclosión en 48, 72 y 96 hpf y malformaciones en los distintos grupos

Medio utilizado	Tasa de eclosión (48 hpf)	Tasa de eclosión (72 hpf)	Tasa de eclosión (96 hpf)	Tasa de malformaciones
M1	0.03±0.04 ^a	0.40±0.20 ^a	0.73±0.11 ^a	0.022±0.025 ^a
M2	0.00±0.00 ^a	0.52±0.15 ^{ab}	0.93±0.05 ^b	0.016±0.025 ^a
M3	0.03±0.05 ^a	0.73±0.17 ^b	0.93±0.09 ^b	0.029±0.057 ^a

^{a, b, c} Medias con letra iguales, en cada columna, no difieren estadísticamente. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según ANOVA, en múltiples comparaciones por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En 48 hpf, empezaron las eclosiones en M1 y M3, con tasas de 0.03±0.04 y 0.03±0.05 eclosionados/total individuos, respectivamente, mientras que el M2 no ha presentado eclosiones en este tiempo de evaluación. A las 72 hpf, las eclosiones fueron más elevadas en M3 con 73% de eclosiones (tasa de 0.73±0.17 eclosionados/total individuos viables), tasa que ha diferido de forma significativa ($p = 0.0112$) de M1 que ha alcanzado un porcentaje de 40% de eclosionados (tasa de 0.40±0.20), pero no hubo diferencia en la comparación con M2 que llegó a 52% de eclosiones (tasa de 0.52±0.15) (Tabla 11).

A las eclosiones a las 96 hpf en M2 y M3 iguales estadísticamente con porcentaje de 93 % de eclosiones/total de individuos viables, pero con relación a M1 los dos grupos difieren ($p = 0.0027$ en la comparación con M2 y $p = 0.0038$ con M3), la tasa media de eclosiones en M1 fue de 0.73±0.11 (73%) (Tabla 11).

Las malformaciones encontradas en esta etapa fueron similares, con tasa medias en M1, M2 y M3 de 0.022±0.025, 0.016±0.025, 0.029±0.057 embriones alterados/total de individuos viables, respectivamente (Tabla 11). Igualmente, el número absoluto de individuos con malformaciones fueron de tres en M1 y M3 y de dos en M2. Las alteraciones fueron en el saco vitelino (edema) y en algunos también alteraciones en la columna (lordosis, cifosis o escoliosis) en las pruebas (carga baja y alta de embriones) con los medios embrionarios.

5.2. Exposición de los peces adultos al Bisfenol A

5.2.1. Evaluación del medio acuático

La temperatura de la sala durante el periodo de prueba fue en media de 24.33 ± 1.72 y la humedad 45.42% (variando entre 38 a 56%). La temperatura media de la sala durante el periodo de exposición tuvo una media de 25.99 ± 1.77 °C y la media de humedad en torno de 43.32%, con variación de 39 a 52 %.

En la comparación entre las medias de grupos de la preexposición, el GP1 que ha presentado un pH medio de 8.24 ± 0.08 tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) del GP2 (media de 8.10 ± 0.06) y G3 (8.15 ± 0.06). El grupo GP4, con media de pH de 8.18 ± 0.06 solo ha presentado diferencia significativa ($p < 0.05$) al GP3 (Tabla 12). Las demás comparaciones no fueron diferentes según la prueba de Tukey en múltiples comparaciones.

En la evaluación del pH durante la fase de exposición las medias en los grupos fueron: 8.13 ± 0.15 ; 8.13 ± 0.19 ; 8.12 ± 0.21 y 8.10 ± 0.09 en G1, G2, G3 y Control, respectivamente (Tabla 12). En las comparaciones de las medias no hubo diferencia estadística entre los grupos de prueba. Tampoco hubo diferencia significativa para el pH entre las dos fases de prueba.

Tabla 12. Promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad de agua en la preexposición (GP1, GP2, GP3 y GP4) y en la exposición al BPA (G1, G2, G3 y Control)

Parámetro	Acuarios - preexposición y Exposición al BPA							
	GP1	G1 (BPA)	GP2	G2 (BPA)	GP3	G3 (BPA)	GP4	Control
pH	8.24±0.08	8.13±0.15	8.10±0.06	8.13±0.19	8.15±0.06	8.12±0.21	8.18±0.06	8.10±0.09
Temperatura (°C)	25.90±0.59	26.58±0.80	25.87±0.42	26.50±0.73	25.90±0.36	26.52±0.64	25.06±0.55	26.16±0.69
Conductividad (µS)	382.9±41.37	291.1±18.51	375.6±40.78	285.0±15.89	376.3±39.88	288.0±17.30	375.6±39.46	292.3±18.43
Dureza (ppm)	112.7±13.59	89.0±5.63	106.8±15.42	86.03±4.60	103.7±13.46	86.03±9.19	106.8±8.90	86.02±4.60
Alcalinidad (ppm)	62.30±0.0	56.37±19.23	62.30±0.0	56.37±16.57	68.23±5.14	53.40±17.80	65.27±10.28	50.43±17.50
Nitrato (mg/L)	40.0±0.0	27.50±20.92	40.0±0.0	32.08±24.41	40.0±0.0	43.33±32.66	40.0±0.0	36.50±21.48
Nitrito (mg/L)	1.50±0.50	2.60±2.20	1.25±0.66	2.67±2.14	1.25±0.66	3.88±3.45	1.08±0.52	2.67±2.35
Amonio (ppm)	1.0±0.0	0.45±0.48	0.92±0.14	0.23±0.18	1.17±0.29	0.31±00.47	1.08±0.38	0.28±0.48

La temperatura de los acuarios ha variado de 25.06 ± 0.55 en grupo GP4, 25.90 ± 0.59 °C en el GP1, 25.87 ± 0.42 °C en GP2 y 25.90 ± 0.36 °C en GP3, durante la preexposición. Hubo diferencia estadística en GP4 y todos los demás grupos ($p < 0.05$), pero sin diferencia significativa en las demás comparaciones entre grupos. Durante la fase de exposición, la temperatura también se mantuvo en el rango ideal para el pez cebra. Las medias encontradas fueron: 26.58 ± 0.80 ; 26.50 ± 0.73 ; 26.52 ± 0.64 y 26.16 ± 0.70 °C en G1, G2, G3 y Control, respectivamente (Tabla 12). Tampoco se ha observado diferencia estadística entre los grupos.

Los valores medios de dureza, alcalinidad y conductividad no han presentado diferencias significativas entre los grupos experimentales. Las medias mínimas y máximas para estos parámetros fueron: en dureza de 103.70 ± 13.46 ppm en GP3 y 112.70 ± 13.59 ppm en GP1; para alcalinidad de 62.30 (sin variaciones) en GP1 y GP2 y 68.23 ± 5.14 en GP3; para la conductividad de 382.90 ± 41.37 en GP1 y 375.60 ± 40.78 en GP2, 375.60 ± 39.46 en el grupo GP4 (Tabla 12).

Evaluando los valores de dureza, alcalinidad y conductividad tampoco se ha observado diferencias estadísticas entre los grupos en la fase de exposición. Las medias de dureza encontradas para dureza fueron: 86.03 ± 4.50 , 86.03 ± 9.19 , 86.03 ± 9.19 ppm (G2, G3, Control) y 89.00 ± 5.63 ppm (G1). Para la alcalinidad la media mínima fue presentado por el grupo Control (50.43 ± 17.50 ppm) y máxima en los grupos G1 y G2 (56.37 ± 19.23 y 56.37 ± 16.57 ppm). La conductividad mínima se ha encontrado en G2 con media de 285.00 ± 15.89 (μ S) y la máxima en el Control 292.30 ± 18.43 (μ S) (Tabla 12).

Para los residuos nitrogenados, por la concentración de animales por acuario, los niveles de nitrito, nitrato y de amonio se mantuvieron en el nivel muy similar en los acuarios de prueba, sin diferencia estadística en las múltiples comparaciones. El nitrato se mantuvo a 40.0 (mg/L), sin variaciones durante el periodo de prueba. Los valores de nitrito (mínimo de 1.25 ± 0.66 mg/L en GP2 y GP3 y máximo de 1.50 ± 0.52 mg/L en GP1). Mientras que los valores para el amonio, mínimo de 0.92 ± 0.14 mg/L en GP2 y 1.17 ± 0.29 mg/L en GP3. Para controlar los niveles de amonio los cambios de agua que serían de intervalos de seis días pasaron a cinco días y el volumen de cambio de agua de 25 a 50% del volumen total (Tabla 12).

Durante la fase de exposición, se ha utilizado una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal Wallis y no se ha observado diferencia estadística entre los grupos. La media de

los niveles de nitrato, mínimo y máximo, encontrados fueron 27.50 ± 20.92 (mg/L) en G1 y 43.33 ± 32.66 (mg/L) en G3. Para nitrito, los niveles mínimo y máximo fueron: 2.60 ± 2.19 (mg/L) en G1 y 3.88 ± 3.45 (mg/L) en G3. El amonio tuvo como media mínima y máxima de 0.23 ± 0.18 en G2 (mg/L) y 0.45 ± 0.48 (mg/L) en G1 (Tabla 12).

5.2.2. Evaluación de los peces adultos (reproductores)

Preexposición

En las semanas de preexposición el número de puestas ha variado de una a máximo de 4 entre las réplicas de reproductores de los grupos. El valor medio de huevos totales desovados fue más alto en grupo GP3 con un total medio 1067 ± 299.1 huevos y más bajo en el grupo GP2 con una desova media total de 818 ± 77.78 huevos, pero sin diferencia estadística entre los grupos (Tabla 13).

Tabla 13. Promedio del total de huevos desovados, los embriones viables, la fecundidad (FEC) y fertilidad (FER) en cada grupo de la preexposición

Grupos	Promedio huevos	Embriones viables	Puestas efectivas	FEC	FER (%)
GP1	830 ± 568.50	415 ± 152.0	1-3	83.87 ± 2.45	57
GP2	818 ± 77.78	541 ± 176.80	1-3	105.40 ± 66.75	65
GP3	1067 ± 299.1	389 ± 24.04	2-3	92.40 ± 50.06	38
GP4	1005 ± 49.50	413 ± 154.10	4-3	54.08 ± 14.73	42

Sin diferencia significativa entre las medias de las distintas variables según evaluación no paramétrica con test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

En las primeras 24 hpf fueron descartados los huevos con señales de coagulación. El valor medio de coagulados entre los grupos fue: 415.5 ± 416.5 en GP1, lo que representa 50.1% de la media de huevos producidos; en GP2 de 277.0 ± 98.99 lo equivalente a 33.9% de coagulados también respecto al total de huevos producidos; 677.5 ± 323.1 en GP3, cerca de 63.5% del total desovado y 592.0 ± 203.6 en GP4, que representa 58,9% de coagulados.

En la comparación estadística, no paramétrica debido a la ausencia de normalidad en la distribución de los datos, no se ha observado diferencia significativa para la media de coagulados en los grupos.

Los embriones viables a las 24 hpf fueron en media de 389 ± 24.04 embriones en el GP3 como valor mínimo y máximo de 415 ± 152.0 en GP1. Así como en los datos anteriores, no hubo diferencia entre los grupos cuanto a la media de embriones viables.

La FEC ha variado entre los grupos, llegando a valores medios de 54.08 ± 14.73 huevos/hembra/puesta en GP4 a 105.40 ± 66.75 huevos/hembra/puesta en GP2. A pesar de la variación, estadísticamente no se ha observado diferencias significativas entre los grupos. La FEC más baja coincide con el mayor número de puestas, en el caso de observa en el GP4, como se pude observar en la Tabla 13. El hecho de tener más puestas parece una adaptación para eliminar los huevos de forma más gradual.

La FER de huevos que significa la eficiencia reproductiva de los peces ha demostrado que, a pesar de presentar elevada media de huevos desovados, muchas veces la fecundación no es efectiva y se pierden muchos posibles embriones. En GP2, se nota una más alta eficiencia reproductiva de los peces, una vez que ha tenido mayor FEC y mayor fertilidad, llegando a los 65% de FER. El GP3 por ejemplo que obtuvo la segunda mayor media de FEC ha presentado la más baja fertilidad en comparación con los demás grupos, con un porcentaje de 38%. El GP4, que tuvo mayor número de puestas y menor FEC ha presentado una media de fertilidad de 42%. Y por fin el GP1 ha presentado una FER media de 57% (Tabla 13).

Exposición al Bisfenol A

Durante la exposición al BPA, no se ha observado ninguna señal de toxicidad, tales como descoordinación, hiperventilación, inactividad, hemorragias o despigmentación, tampoco hubo mortalidad en los acuarios, en ninguna de las concentraciones de BPA utilizada y grupo Control.

La media total de embriones viables por grupo, en la fase de exposición, a las 24 hpf fue de 300.0 ± 113.1 embriones en el G1; 301.5 ± 242.5 en el G2; 294.0 ± 31.1 en el G3 y

302.0 ± 113.1 en el grupo control (Tabla 14). Con medias sin diferencia estadística entre los grupos.

Tabla 14. Promedio del total de huevos desovados, los embriones viables, la fecundidad (FEC) y fertilidad (FER) entre las réplicas de cada grupo en la fase de exposición de los peces adultos

Grupos	Promedio		Puestas efectivas*	FEC	FER (%)
	embriones / desove	Embriones viables			
G1	702.0±328.1	300.0±113,1	3-4	39.02±10.87	43,7
G2	679.5±494.3	301.5±242,5	2-6	33.65±0.92	42.7
G3	679.0±7.1	294.0±31,1	2-6	45.10±31.54	43.3
Control	776.5±194.5	302.0±113,1	3-5	39.58±4.27	38.3

*rango de puesta de por lo menos un embrión.

Sin diferencia significativa entre las medias de las distintas variables según evaluación no paramétrica con test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

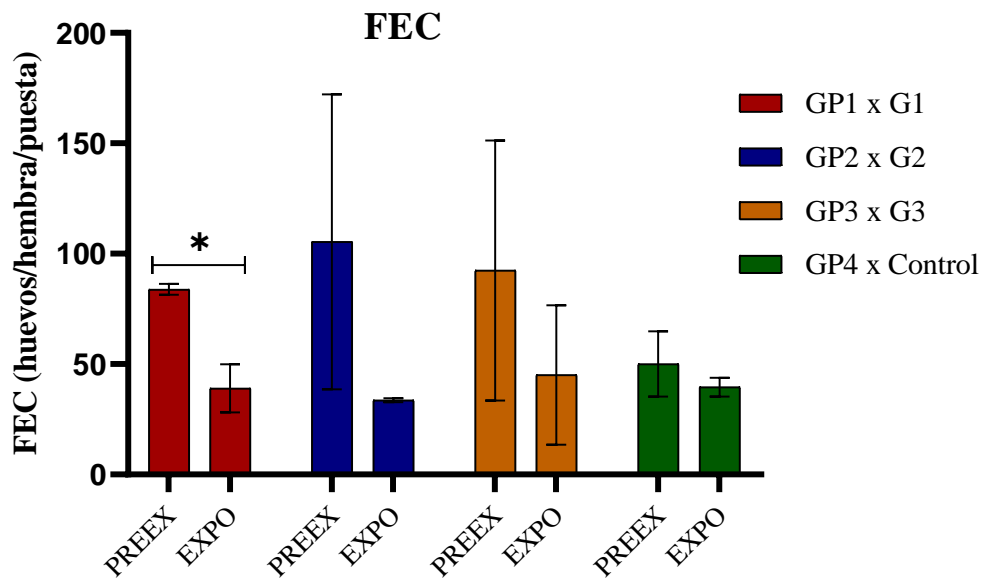
La FEC media más alta fue encontrada en el G3, 45.10±31.54 huevos/hembra/puesta y la más baja en el G2, 33.65±0.92 huevos/hembra/puesta. La comparación de la media ha mostrado una igualdad entre todas. El número medio de puestas entre los grupos fue de 3.5 a 4 puestas por grupo, con una variabilidad entre las réplicas (la variabilidad entre las réplicas en cada grupo está expuesto en la Tabla 14).

Los resultados de la FER presentaron valores muy similares entre los grupos, sin significancia estadística. La mayor media fue de 43.7% en G1 y 43.3% en G3, mientras que en el Control ha presentado la menor media, 38.3% huevos fertilizados/total huevos.

Comparando entre los resultados obtenidos antes de la exposición (preexposición) el número de embriones viables ha disminuido en todos los grupos. Se observa una disminución en media de la FEC en todos los grupos correspondientes. En la comparación de cada grupo con los valores de FEC antes de la exposición y tras la exposición, ha demostrado diferencia significativa ($p < 0.05$) apenas en el G1 entre las dos fases de la prueba. La diferencia en la FEC en GP1 y en G1 fue de 44.85±7.88 embriones/hembra/puesta (Figura 31).

Para la FER, se nota una disminución en los grupos G1 (preexposición GP1), G2 (preexposición GP2) y Control (preexposición GP4) y un aumento, aunque ligero, en la

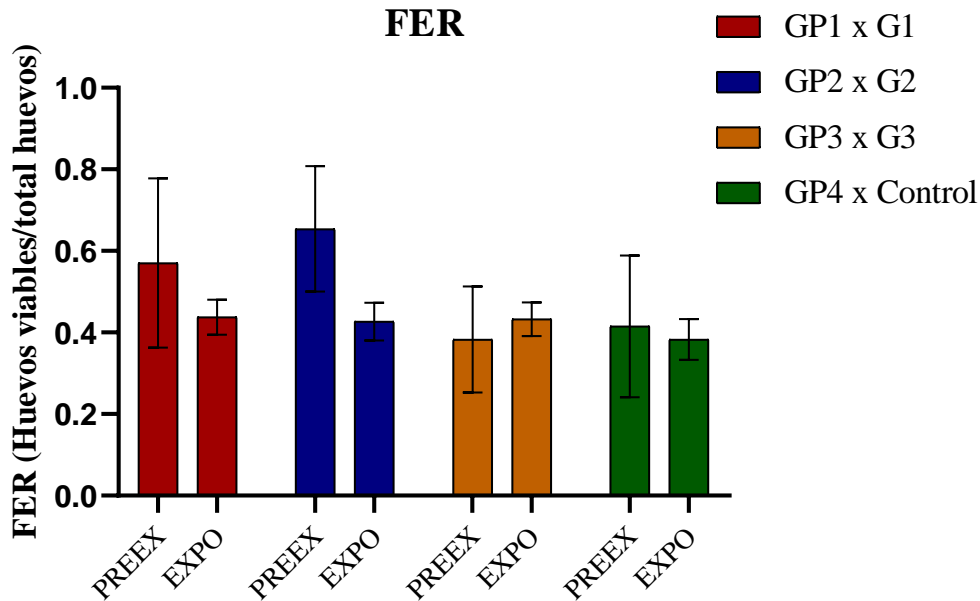
FER del G3, pero se observa diferencia significativa entre las medias anteriores y posteriores (Figura 32).



Grupos en la preexposición (PREEX) y tras la exposición al BPA (EXPO)

Figura 31. Promedio de la fecundación (FEC) de cada grupo de reproductores en dos momentos, en la preexposición y exposición. (*) medias entre cada momento son diferentes según la prueba t no pareada ($p < 0.05$).

Hay que destacar que a pesar de la gran variabilidad entre las distintas fases de pruebas (Pre y exposición), el grupo Control fue el que presentó mayor homogeneidad tanto para FEC cuanto para FER.



Fertilidad en la preexposición (PREEX) y tras la exposición (EXPO)

Figura 32. Promedio de la fertilidad (FER) de cada grupo de reproductores en dos momentos, en la preexposición y exposición. Las medias entre cada momento son iguales según test t no pareada ($p < 0.05$).

5.2.3. Evaluación de los embriones (F1)

Preexposición

Los embriones viables a las 24 hpf y puesto para incubar en medio E3, fueron evaluados cuanto, al porcentaje de muertes, eclosiones y alteraciones en el desarrollo, en los tiempos de 24, 48, 72 y 96 hpf (Tabla 15).

En la evaluación de los grupos a las 24 hpf, no se observaron muertes o embriones con alteraciones en el desarrollo. Una vez que ya se habían descartados los huevos coagulados. Las eclosiones en 24 hpf normalmente no ocurren por la etapa de desarrollo del embrión, por eso tampoco se ha observado en los embriones incubados.

Tabla 15. Promedio del total de embriones y larvas por tiempo, alteraciones encontradas en cada tiempo de evaluación, tasas de muertes y de eclosión en los grupos GP1, GP2, GP3 y GP4

Tiempo (hpf)	Grupos	Embriones y/o larvas	Muertes (%)	Eclosión (%)	Embriones y/o larvas alteradas (%)
24	GP1	414.5±152.0	-	-	0
	GP2	541.0±176.8	-	-	0
	GP3	389.0±24.0	-	-	0
	GP4	413.0±154.2	-	-	0
48	GP1	414.5±152.0	0	14.25	0
	GP2	541.0±176.8	0.18	14.79	0.28
	GP3	389.0±24.0	0.51	11.57	0
	GP4	413.0±154.2	0.73	9.93	0
72	GP1	414.5±152.0	0	72.95	0.12
	GP2	539.5±25.46	0.19	60.00	0.28
	GP3	387.0±10.6	0.52	68.09	0.78
	GP4	410.0±98.9	0.49	53.90	0.49
96	GP1	414.5±152.0	0	99.03	0.12
	GP2	539.5±25.5	0	95.74	0
	GP3	385.0±2.8	0.39	97.01	0.78
	GP4	408.0±90.51	0.74	80.88	0.49

En 48 hpf la tasa de mortalidad entre los grupos ha variado de cero en GP1 a 0.73% (media de tres embriones muertos) en GP4. El porcentaje de eclosión en el mismo tiempo de evaluación ha llegado a 9.93 en GP4 y 14.79% en GP2. Para alteraciones en el desarrollo solo se ha observado alteración en GP2 con media de 1.5 embriones alterados, 0.28%.

A las 72 hpf, también hubo algunos embriones muertos en porcentajes que no alcanzaban el uno por ciento, con media mínima de cero en GP1, 0.19% (un embrión muerto) en el GP1 y máxima de 0.52% (dos embriones muertos) en GP3. También se ha observado que el porcentaje de eclosiones ultrapasaba el 50% con media mínima de 53.9% de eclosión en GP4 y máxima en GP1, con 72.95%. Se ha observados alteraciones en el desarrollo en todos los grupos con media de 0.12 (media de 0.5 individuos alterados), 0.28 (media de 1.5 individuos alterados), 0.78% (media de 3 individuos) y 0.49% (media de 2 alterados) en GP1, GP2, GP3 y GP4 respectivamente.

En el último tiempo evaluado, a las 96 hpf, la mortalidad sigue baja, con media mínima de cero en GP1 y GP2, 0.39% (media de 1.5 individuos muertos) y máximo de 0.74%

(tres muertes) en GP4. Las eclosiones alcanzaron sus niveles máximos en esta última evaluación, llegando a porcentajes mínimas de 80.88% en GP4, 95.74% en GP2 y máxima de 99.03% en GP1. Y, por último, la evaluación de las alteraciones en el desarrollo de embriones y/o larvas fue de cero en GP2, 0.12% (media de 0.5 individuos alterados) en GP1, 0.8% (media de dos individuos) en GP4 y 0.9% (media de tres individuos) en GP3.

La evaluación estadística de muertes, eclosiones y alteraciones en el desarrollo no ha presentado diferencia entre los grupos para cada una de las variables, tanto en las comparaciones por tiempo como en la evaluación general. Se hizo la evaluación no paramétrica con test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

Evaluación de los embriones (F1)

Durante las primeras 24 hpf, se descartaron los embriones con signos de coagulación (Figura 33). La media de los coagulados había variado de 378.0 ± 251.7 (58% del total) huevos en G2 y 418.0 ± 161.2 (56% del total) en el grupo de control. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

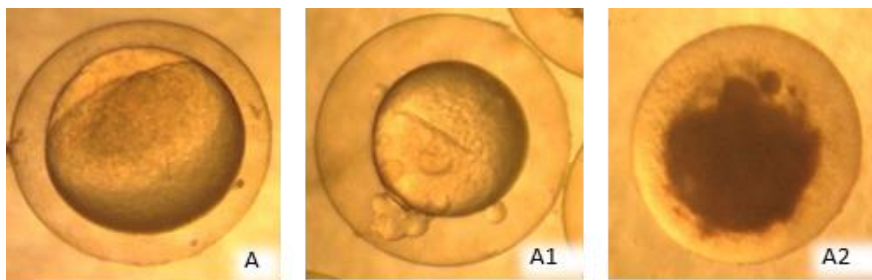


Figura 33. Huevo de pez cebra aparentemente normal (A), y huevos con indicios de coagulación (A1 y A2).

Los embriones viables a las 24 hpf en cada uno de los grupos se evaluaron para detectar signos de embriotoxicidad, como la mortalidad, la eclosión y las alteraciones específicas de malformación. La media total de embriones viables por grupo a las 24 hpf fue de 300 ± 113.1 embriones en el G1; 301.5 ± 242.5 en el G2; 294 ± 31.1 en el G3 y 302 ± 113.1 en el grupo control (Figura 34 y Tabla 16).

Tabla 16. Promedio del total de embriones y larvas por tiempo, alteraciones encontradas en cada tiempo de evaluación, tasas de muertes y de eclosión en los grupos expuestos a distintas concentraciones de BPA más el grupo control

Tiempo (hpf)	Grupos	Promedio de embriones y/o larvas	Promedio de Embriotoxicidad	Muertes (%)	Tasa de eclosión (%)
24	G1	300±113.1	16 ±8.5 (5.3%)	-	-
	G2	301.5±242.5	1±0 (0.3%)	-	-
	G3	294±31.1	7± 7.1 (2.4%)	-	-
	Control	302±113.1	0	-	-
48	G1	300±113.1	38±11.3 (12.7%)	5.3	9.7
	G2	301.5±242.5	31.5±14.8 (10.4%)	0	22.7
	G3	294±31.1	19± 15.6 (6.5%)	0.9	7.3
	Control	301.5±113.1	1.5± 0.7 (0.2%)	0.1	6.6
72	G1	284±132.9	32±31.1 (11.3%)	0.9	84
	G2	301.5±242.5	36.5± 17.7 (12.1%)	0.3	72.1
	G3	291.5±33.2	19 ±15.6 (6.5%)	0.7	86.4
	Control	300.5±112.4	2.5 ±0.7 (0.8%)	0.3	68.8
96	G1	281.5±136.5	14 ±19.8 (5.0%)	2.5	93.1
	G2	300.5±242.5	7.5 ±0.7 (2.5%)	0.3	94.7
	G3	289.5±36.1	13.5±17.7 (4.7%)	0.7	96.7
	Control	298±109.6	1.5± 0.7 (0.3%)	0.2	95.9

G1 = grupo de padres expuesto a 500 µg L⁻¹; G2 = grupo de padres expuesto a 50 µg L⁻¹; G3 = grupo de padres expuesto a 5 µg L⁻¹; grupo control.

En la evaluación de la mortalidad se observó la ausencia de latidos, el establecimiento incorrecto de la corriente sanguínea y la falta de movimientos. El porcentaje de mortalidad (mortalidad embrionaria sobre el total de embriones viables evaluados) fue generalmente bajo a partir de las 24 hpf. Sin embargo, al comparar los diferentes grupos de exposición, la mortalidad fue mayor en los embriones del G1 (500 µg L⁻¹) en todos los momentos evaluados (Figura 35), con una mortalidad media de 0.02±0.02 (entre todos los tiempos evaluados) y alcanzando el valor más alto a las 48 hpf con un porcentaje de

mortalidad de alrededor del 5.3% (Tabla 16). El mismo grupo a las 72 y 96 hpf ha presentado 0.9 y 2.5% de mortalidad. El segundo grupo con más mortalidad fue el G3 con porcentajes de 0.9, 0.7 y 0.7 en 48, 72 y 96 hpf. A pesar de la de G1 presentar media más alta de mortalidad, no hubo diferencia significativa para las medias de los demás grupos.

Otro punto de evaluación fue la eclosión de los embriones que también ayudó a interpretar los signos de toxicidad del BPA. La eclosión, en todos los grupos de exposición, comenzó a las 48 hpf, siendo el porcentaje de eclosión (número total de larvas sobre el total de embriones) en este momento, mayor en los embriones procedentes del grupo expuesto a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (G2), con un porcentaje correspondiente del 22.7% de eclosión. Sin embargo, a las 72 y 96 hpf, el porcentaje de eclosión fue mayor (86.4 y 96.7%, respectivamente) en el grupo expuesto a la concentración más baja (G3), con una eclosión media de $0,63 \pm 0.49$, siendo ésta muy cercana a la del grupo G2 (0.63 ± 0.37). Además, los grupos control y G1 tuvieron una eclosión media de 0.56 ± 0.44 y 0.62 ± 0.46 , respectivamente, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos evaluados (Figura 34).

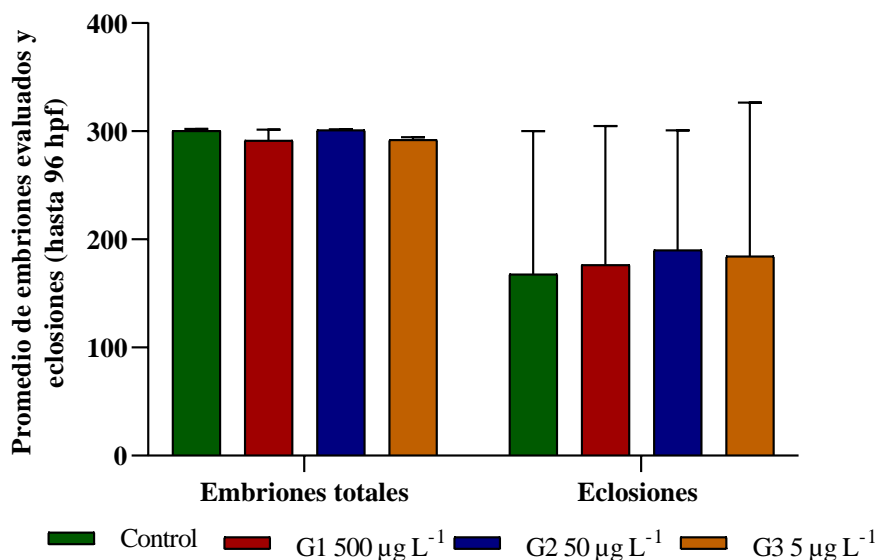


Figura 34. Promedio del total de embriones y/o larvas viables y eclosiones hasta 96 hpf.

En la evaluación de los embriones en cuanto a los indicadores de embriotoxicidad, además de los vínculos con las malformaciones (no desprendimiento de la cola, falta de somitas, ausencia de latidos, malformaciones esqueléticas y cardíacas, edema en el saco vitelino), los grupos expuestos fueron los más afectados. En una evaluación general, el G1 dio, en todos los tiempos de observación, los mayores porcentajes de embriotoxicidad (total de embriones y/o larvas con indicadores de embriotoxicidad sobre el total de embriones evaluados), en relación con el resto de los grupos expuestos. La media de embriotoxicidad en el G1 fue mayor, 0.09 ± 0.04 , que las medias de los demás grupos, y fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de control, que dio una media de embriotoxicidad de 0.004 ± 0.003 (Figura 35).

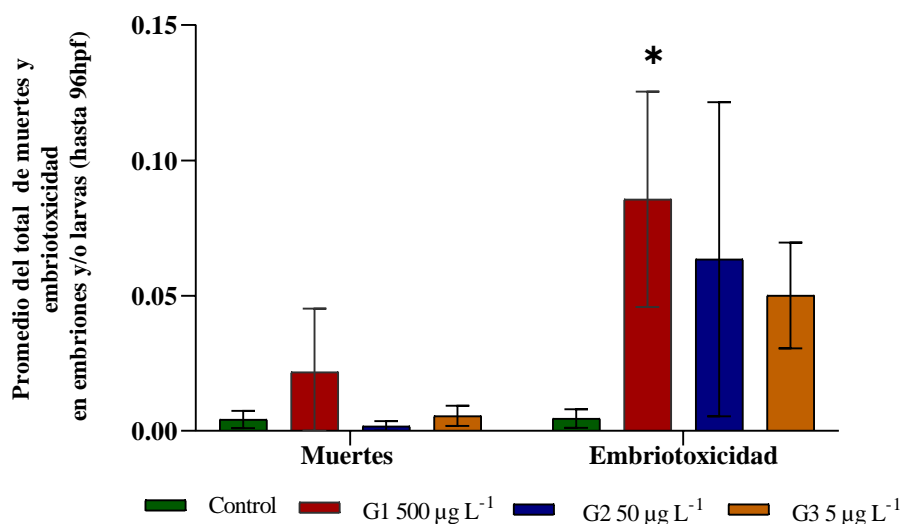


Figura 35. Promedio de las tasas de mortalidad e individuos con señales de embriotoxicidad hasta 96 hpf.

Los porcentajes de embriotoxicidad descritos en más detalles por tiempo de evaluación y por grupos se encuentran en la Tabla 16. En el G1 se observa que, en 24, 48 y 96 hpf, los mayores valores medio de individuos alterados fueron respectivamente, 16 ± 8.5 (5.3%), 38 ± 11.3 (12.7%), 14 ± 19.8 (5.0%) embriones y/o larvas con signos de embriotoxicidad con relación al total de embriones y/o larvas viables en cada tiempo post fertilización. En 72 hpf, el mayor número ha sido en el grupo G2 con 36.5 ± 17.7 (12.1%) de individuos alterados.

Con respecto a los indicadores de embriotoxicidad, en una evaluación separada de cada alteración encontrada, las que se refieren a la no formación de somitas o el no desprendimiento de la cola (Figura 36 (B1, B2)) fueron predominantes en G1, con 50% (media de 8 embriones) de sus embriones con signos de embriotoxicidad, con tal alteración a las 24 hpf y con un 21 % (media de 8 embriones) de embriones afectados a las 48 hpf (Tabla 17). En los grupos G2 y G3, la variación de individuos afectados fue entre cero y dos individuos entre 24 y 48 hpf. El grupo control no presentó ninguna de estas alteraciones.

Tabla 17. Número medio entre las réplicas, en cada grupo, referente a las alteraciones de embriotoxicidad en embriones y/o larvas en los distintos tiempos de evaluación post fertilización

Tiempo (hpf)*	Grupos	No desprendimiento de cola	No desarrollo de somitas	Malformaciones			Edema saco vitelino
				Cabeza	Corazón	Columna	
24	G1	8	8	0	0	1	8
	G2	1	1	0	0	0	0
	G3	1.5	1	0	0	1	6
	Control	0	0	0	0	0	0
48	G1	8	1	1	9.5	17.5	20
	G2	1	0.5	0	1	3.5	29
	G3	0.5	0.5	1	4	7	18
	Control	0	0	0	0	0.5	0.5
72	G1	-	-	0	22	13	18.5
	G2	-	-	1	2.5	6	30
	G3	-	-	0	8	6.5	17.5
	Control	-	-	0	1	1	1
96	G1	-	-	4	11	3	13
	G2	-	-	1.5	1	4	5.5
	G3	-	-	1	9.5	5.5	11.5
	Control	-	-	0	1	1	1

(-) destaca que tales alteraciones normalmente no se observan al tiempo post fertilización señalado. Obs. La tabla refleja el número de individuos que presentaron cada una de las alteraciones, pero cabe resaltar que un mismo individuo puede tener más de un tipo de malformación. El número de total de individuos con señales de embriotoxicidad esta descrita en la Tabla 16.

Se encontraron malformaciones cefálicas en todos los grupos tratados, a excepción del control, con un mayor porcentaje en el G1 a las 96 hpf cuando el 29% (media de 4 larvas), del total de embriones con malformaciones, estaban alterados (Figura 36 (C1, C5)). El

G2, presentó en segundo número más alto de individuos con malformaciones de la cabeza, con 20% (media de 1.5 larvas) de sus individuos alterados, con esa malformación a las 96 hpf. En el grupo G3, a las 96 hpf, solo un individuo ha presentado malformaciones cefálicas (Tabla 17).

Con relación a las alteraciones cardíacas (Figura 36 (C2, C4, C5, C6), éstas se observaron con mayor frecuencia en los individuos del grupo G1 a partir de las 48 hpf, siendo más evidentes a las 72 hpf, cuando se observaron en 69%, (media de 22 individuos) del total de individuos alterados. En el mismo grupo a las 96 hpf se ha observado el edema en 79% del total de alterados (media de 11 individuos). En el G3 fue el segundo con mayor número individuos con malformaciones en el corazón, con cerca de 42% (media de 8 individuos) y 67% (media de 9 individuos), en 72 y 96 hpf respectivamente, calculado sobre el total de individuos con signos de embriotoxicidad en el grupo (Tabla 17). En el grupo control no se ha observado tal alteración.

Las anomalías a nivel esquelético (Figura 36 (C1-C6)) se evidenciaron en los individuos de todos los grupos de exposición, con una mayor incidencia en el G1 a las 48 y 72 hpf (46% y 41%, respectivamente, del total de individuos con malformaciones), a los que siguió el G3 a las 96 hpf (41% del total de embriones con malformaciones). Fueron visualizadas alteraciones como escoliosis, cifosis y lordosis en distintos grados. En el grupo control, se ha encontrado alteraciones en la columna en un rango de cero a un individuo (Tabla 17).

Cabe destacar la alta incidencia de la presencia de edemas en el saco vitelino encontrado (Figura 1(C3-C6)). Esta anomalía apareció con mayor frecuencia en G1 a las 96 hpf, cuando el 93% (media de 13 individuos), y los valores a las 48 y 72 hpf fueron de 53% (media de 20 individuos) y 58% (media de 18.5 individuos) del total de alterados. Asimismo, en G2, a las 48 y 72 hpf, esta alteración se observó en el 92% (media de 29 individuos) y el 82% (media de 30 individuos), respectivamente, de los embriones con malformaciones registrados. En el grupo control ocurrió como alteración al acaso en un rango de cero a dos individuos afectados entre los tiempos de evaluación (Tabla 17).

Ninguno de los grupos evaluados demostró falta de pigmentación corporal ni ausencia de la esfera ocular o de los oídos.

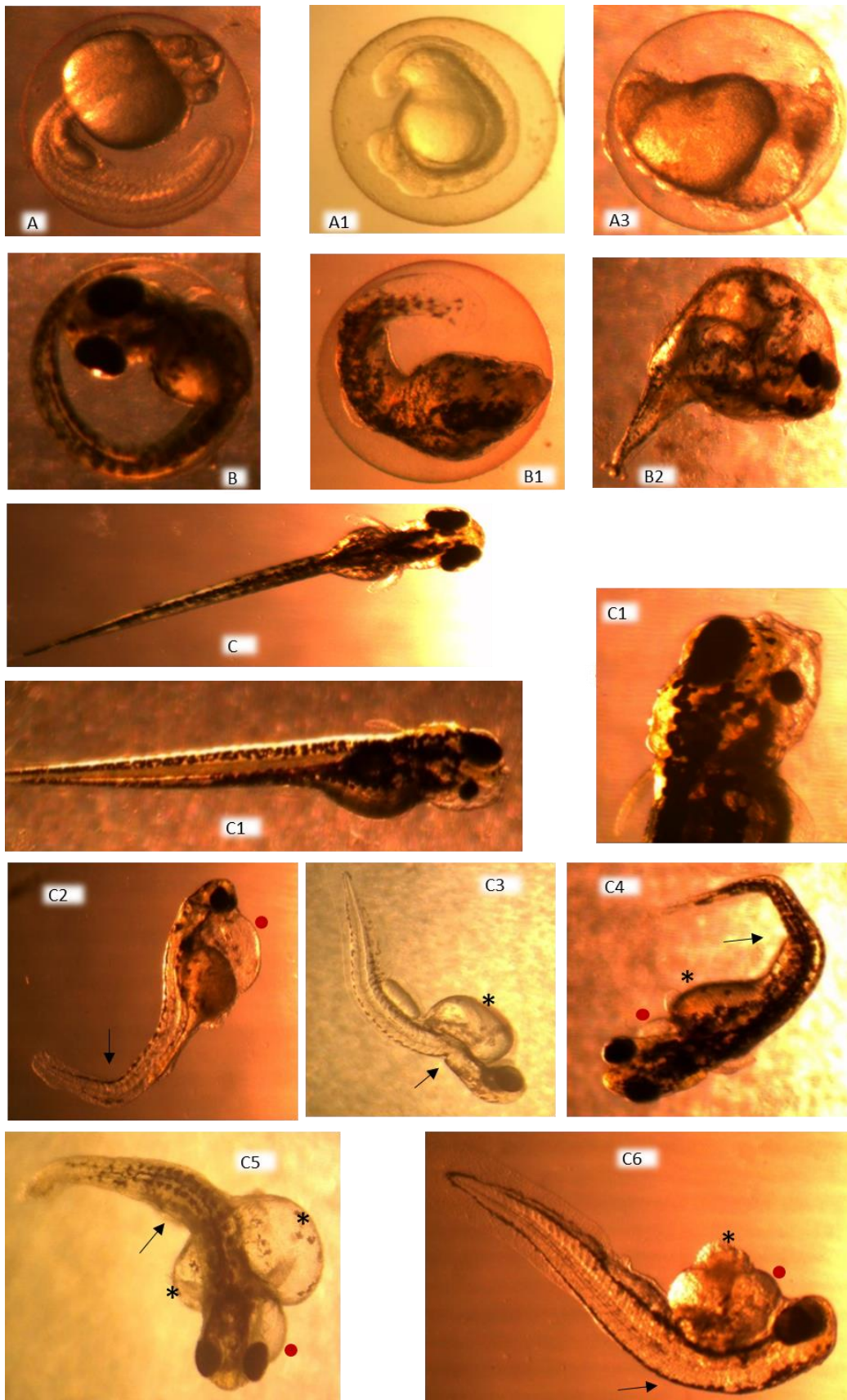


Figura 36. Embriones y larvas normales (grupo de Control) y con indicadores característicos de embriotoxicidad, procedentes de grupos tratados con BPA. Embriones (A) (24 hpf), (B) (48 hpf), y larva (C) (72 hpf) normales (grupo Control); Embrión de G3

(A1) sin desprendimiento de cola (24 hpf); Embrión de G2 (A2) con malformación musculoesquelética y sin formación de somitas (24 hpf); Embriones (B1) de G2 y (B2) de G1 con malformaciones musculoesqueléticas, edema en el saco vitelino, corazón y malformaciones cefálicas (entre 48 y 72 hpf); Larvas de G1 (C1,C5) con malformaciones cefálicas (entre 72 y 96 hpf), donde la larva de la imagen C1 (dos fotos) muestra la formación discrepante de los ojos; Larvas (C2) de G2, (C4,C5) de G1 y G3 (C6) con edema subendocárdico (punto rojo) (entre 72 y 96 hpf); Larvas de G2 (C3), G1 (C4,C5) y G3 (C6) con edema en el saco vitelino (*) (entre 72 y 96 hpf); Larvas (C2 -C6) con alteraciones musculoesqueléticas (flecha) (lordosis en C2, escoliosis en C4 y C5, leve cifosis en C6, una especie de fractura en C3) entre 72 y 96 hpf.

Comparando entre los resultados obtenidos en los grupos experimentales en la fase de preexposición, periodo necesario para adaptación y conocimiento de los parámetros normales tanto de comportamiento como reproductivo de los peces, los resultados de la fase de exposición al BPA, evaluamos las medias generales de alteraciones en el desarrollo embrionario. Al comparar cada grupo en las distintas fases fue observado un aumento del valor medio en todos los grupos, pero en niveles considerables en los grupos expuestos al BPA.

La diferencia media entre el promedio de embriones y/o larvas con alteraciones en el desarrollo (hasta 96 hpf) encontradas en el GP1 (preexposición) y el G1 (padres expuestos a $500 \mu\text{gL}^{-1}$ de BPA) fue de 85%, con diferencia estadística significativa en múltiples comparaciones por el test de Bonferroni ($p < 0.05$). La comparación del GP2 (preexposición) y el G2 (padres expuestos a $50 \mu\text{gL}^{-1}$ de BPA) mostro un porcentaje medio de la diferencia entre las fases de 62%, también con significancia estadística por la misma prueba, ($p < 0.05$). Mientras que las comparaciones entre GP3 y G3, GP4 y control, presentaron diferencias medias entre las fases de 46 y 2% respectivamente, no presentando diferencia significativa en ninguno de los dos grupos (Figura 37).

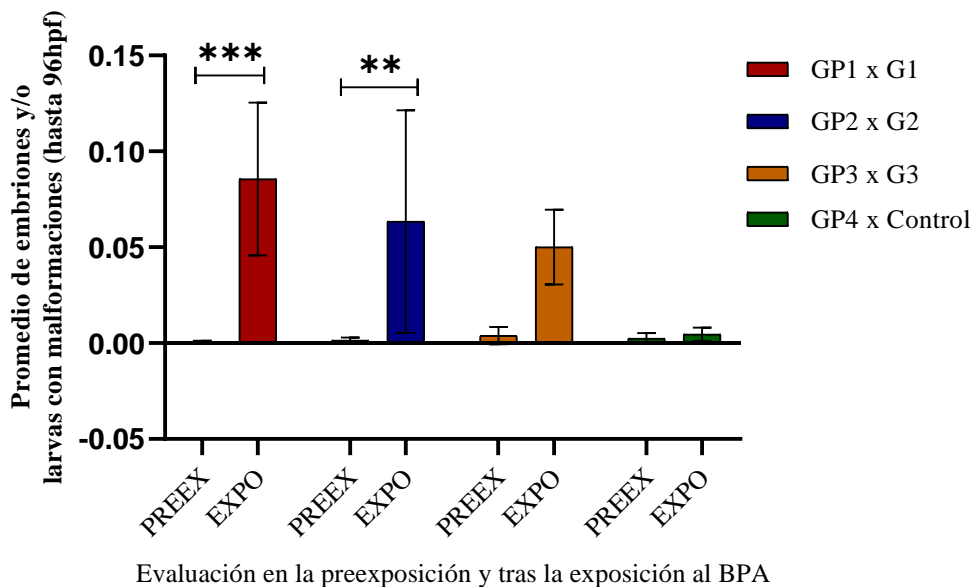


Figura 37. Comparación entre el promedio de alteraciones en el desarrollo embrionario en la fase de preexposición (PPEEX) y después de la exposición (EXPO) de los peces adultos al BPA en distintas concentraciones. Diferencia significativa en la comparación GP1 x G1 (***) ($p=0.0004$) y en la comparación GP2 x G2 (**) ($p=0.0097$) en múltiples comparaciones por la prueba de Bonferroni

5.2.4. Estudio Histopatológico

En las observaciones macroscópicas de las gónadas realizadas en la necropsia de los peces, no se observan alteraciones y muestran un aspecto aparentemente normal, tanto en el grupo control como en los grupos tratados. Todos los hallazgos en el estudio estructural y ultraestructural están descritos a continuación, en cada grupo experimental:

Ovarios

En el estudio histopatológico micro y ultraestructural de los ovarios evaluados del grupo Control, no se observan alteraciones en el parénquima del ovario. Se observó un amplio desarrollo de sus folículos, exhibiendo una distribución correcta de todos sus elementos (Figura 38. A). El folículo primordial (Figura 38.B) es la primera fase de la evolución folicular y está integrado por el ovocito recubierto por una capa de células foliculares planas, que establecen un epitelio simple plano. El ovocito integrante del folículo

primordial tiene un núcleo esférico de gran tamaño y un citoplasma con una basofilia muy intensa. El inicio del desarrollo del folículo en transformación (Figura 38.C) viene marcado por un notable aumento en el tamaño del ovocito. En las zonas periféricas de su citoplasma, aparecen las vesículas vitelinas lo que hace que el núcleo se comprima en la zona central, siendo este núcleo de un tamaño aún más evidente que en los folículos primordiales.

Los folículos en crecimiento (Figura 38 D) están formados por el ovocito rodeado por una gruesa membrana pelúcida acidófila que lo rodea totalmente, manteniéndose los núcleos en el centro del ovocito. Los folículos maduros (Figura 38 D) representan los ovocitos que en su fase final serán liberados al exterior. En estos folículos se produce un enmascaramiento del núcleo, por lo que podemos destacar sobre todo el citoplasma, de gran proporción ocupado prácticamente en su totalidad por grandes gránulos de vitelo y vacuolas lipídicas. En la fase de atresia (Figura 38 D) se produce la fagocitosis e invasión por parte de las células foliculares de los restos citoplasmáticos del ovocito, produciéndose la atresia y reabsorción de los folículos ováricos. Al microscopio electrónico podemos observar en detalles los folículos primordiales, en crecimiento (detalle de una membrana pelúcida en un folículo en crecimiento) y los maduros (detalle de los gránulos de vitelo y todos los componentes aparentemente normales).

En el G3 ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 38.B) se encontraron los mismos tipos de folículos descritos previamente en el grupo control (Tabla 18). Todos ellos mantenían la composición y el tipo de células de revestimiento, escasos folículos atrésicos y sin evidencias de lesiones. Tampoco fue evidenciado lesiones mediante microscopía electrónica.

En el G2 ($50 \mu\text{g. L}^{-1}$) (Figura 38.C), fueron observadas vacuolizaciones en el citoplasma de los folículos primordiales. En los folículos en crecimiento se observaron que la membrana de los núcleos presentaba bordes anfractuosos y un aumento moderado (en 71,4% de las muestras) en la proporción de vesículas y gotas lipídicas, alteración con diferencia significativa comparada a los grupos control y G3 ($p < 0.05$). También había un aumento moderado de folículos atrésicos (57,1% de las hembras evaluadas) pero sin diferencia a los demás grupos, y moderada desintegración de los componentes foliculares (71,4% de las muestras, también visualizada en microscopio electrónico), con diferencia significativa para los otros grupos expuestos a concentraciones menores ($p < 0.05$) (Tabla 18).

En el grupo expuesto a la concentración más alta, G1 (500 $\mu\text{g. L}^{-1}$), (Figura 38 D, E) tanto los folículos en crecimiento como los maduros presentan un gran desarrollo, con abundantes gránulos y gotas lipídicas, elevada proporción de folículos atrésicos y grave degradación de todos los componentes del folículo ovárico. Estas alteraciones presentaron una elevada gravedad con diferencias estadísticas significativas con relación a los otros grupos ($p < 0,05$). En el G1 también se destacó una fibrosis intersticial caracterizada por la presencia de tejido conectivo fibroso en el interior del estroma ovárico, con infiltraciones granulomatosas. Por tanto, se observan alteraciones en el estroma conectivo, granulocitos eosinofílicos evidenciadas apenas en G1, en todas las muestras, presentando diferencia significativa con el resto de los grupos ($p < 0.05$) (Tabla 18). Además, fue observado al microscopio electrónico en el G1, un aumento significativamente alto de vacuolizaciones en el citoplasma, núcleos muy desestructurados y extensos procesos degenerativos, en los que había abundantes folículos atrésicos con una severa degradación de todos sus componentes ($p < 0.05$) (Figura 38.E).

Tabla 18. Clasificación de las alteraciones en los ovarios de peces cebras en los distintos grupos experimentales, valorados según la gravedad de lesión histopatológica y el porcentaje de animales que las presentaron.

Alteraciones	Control	G3 (50 $\mu\text{g. L}^{-1}$)	G2 (50 $\mu\text{g. L}^{-1}$)	G1 (50 $\mu\text{g. L}^{-1}$)
Degradación del parénquima ovárico	- (100%)	- (100%)	- (100%)	+++ (100%)
Aumento de gránulos y gotas lipídicas	- (100%)	- (100%)	++ (71.4%)	+++ (85.7%)
Degradación de los componentes foliculares	- (100%)	- (100%)	++ (85.7%)	+++ (100%)
Aumento de la proporción de folículos atrésicos	- (100%)	- (100%)	++ (57.1%)	+++ (57.1%)

(-) sin alteraciones; (+) leve/baja; (++) moderada; (+++) grave/alta

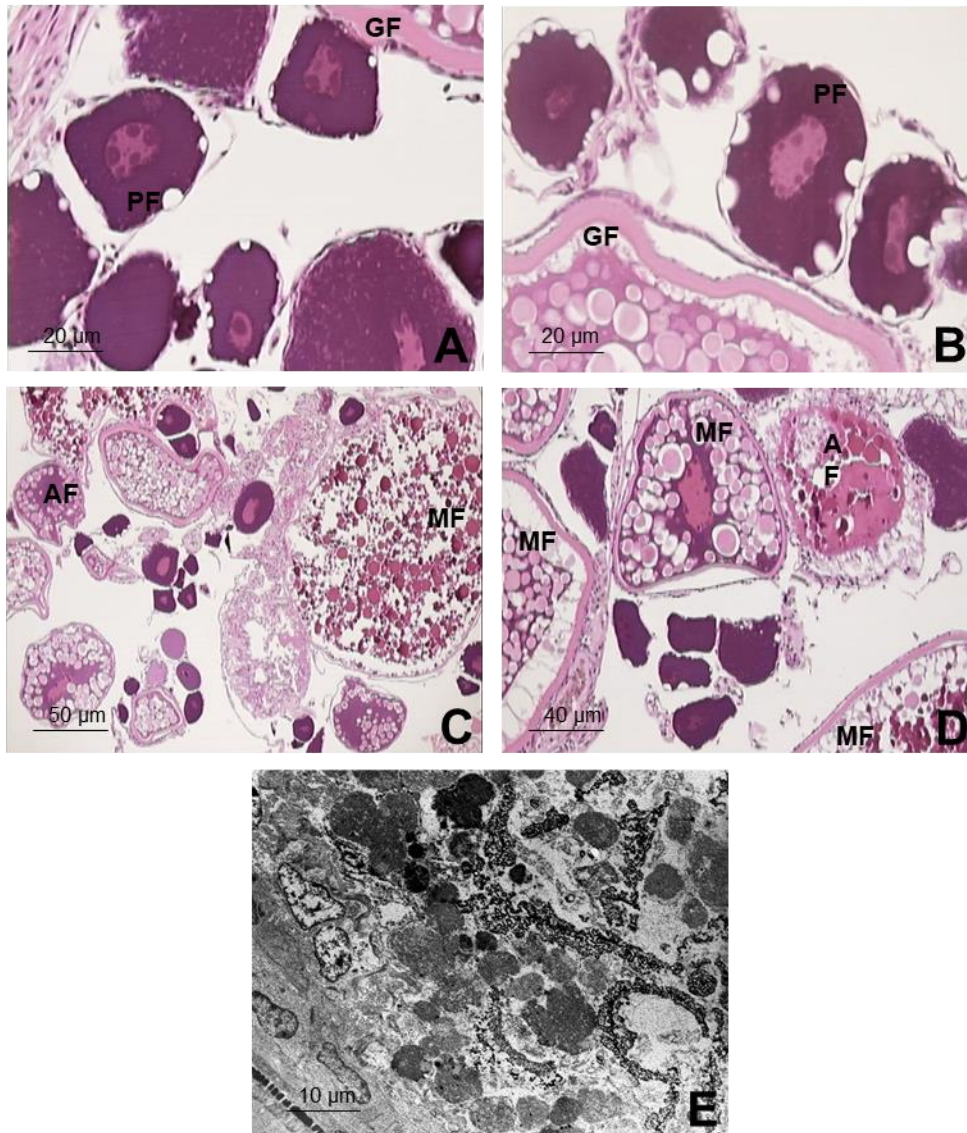


Figura 38. Parénquima ovárico en el pez cebra expuesto durante 21 días al BPA, más el grupo de control, evaluado con microscopio óptico y electrónico: (A) Grupo de control: Parénquima ovárico normal, con numerosos folículos primordiales. Detalle del folículo primario (FP) y del folículo en crecimiento (GF); (B) Grupo 3 ($5 \mu\text{g L}^{-1}$): Folículos ováricos diversos; folículo primario (FP) con citoplasma muy vacuolizado; folículos en crecimiento (GF) con un núcleo con bordes rugosos; (C) Grupo 2 ($50 \mu\text{g L}^{-1}$): Folículos ováricos diversos; folículos en crecimiento con una membrana pelúcida muy desarrollada, un folículo maduro (MF) y un folículo atrésico (AF); (D) Grupo 1 ($500 \mu\text{g L}^{-1}$): Numerosos folículos atrésicos (FA); los folículos maduros (MF) muestran abundantes granulaciones y gotitas lipídicas; (E) Bajo microscopio electrónico (Grupo 1): restos citoplasmáticos del ovocito atrésico degenerado.

Testículos

El parénquima testicular del pez cebra correspondiente al grupo control (Figura 39.A), se observó organizado con numerosas bolsas seminíferas ampliamente desarrolladas, exhibiendo todos los componentes celulares con una distribución normal. El intersticio presentaba abundantes células conectivas y vasos sanguíneos. Al microscopio electrónico las células de Sertoli forman un tapizado continuo de las bolsas seminíferas, sin alteración aparente. Se definen como células voluminosas, con un núcleo homogéneo y basófilo, de gran tamaño, con un nucleolo grande y evidente. Los contornos de las células de Sertoli son poco precisos e irregulares.

Las espermatogonias son de morfología inespecífica, en tanto que los espermatoцитos tienen condensaciones cromatínicas, y en estos elementos celulares se destacan las divisiones meióticas que definen a estas poblaciones celulares. Las espermátidas tienen diferentes formas, pero en la última fase se aprecia una escotadura nuclear, donde se engastan un centríolo. Finalmente, el espermatozoide, muestra una cabeza fundamentalmente esférica, aunque algunas pueden ser ovaladas, en donde se destaca un núcleo muy denso con una escotadura donde se integra un centríolo que se constituye en el cuerpo basal de un cilio extremadamente largo. El citoplasma apenas existe y solo hay un abultamiento en el que se agrupan algunas mitocondrias que se relacionan con el cilio y una proyección laminar delgada que nace en la base ciliar. Las espermatogonias, situadas en la periferia de los túbulos, sobre la lámina basal y entre los polos basales de las células de Sertoli; son en general células de pequeño tamaño, con un amplio núcleo rodeado de un citoplasma evidente. Los espermatoцитos primarios, en fase de preleptotene, los encontramos situados en hileras próximos a la membrana basal de los túbulos, detectándose por los complejos sinaptonémicos que aparecen como manchas hipercromáticas tanto al microscopio óptico como al electrónico. Las espermátidas fueron las células más numerosas del epitelio seminífero, distribuidas en amplios mosaicos, mostrando morfologías muy diferentes al ser su metamorfosis el hecho más característico de la espermiogénesis. Destacaron en agrupaciones de núcleo redondeado o alargado que evidencian el inicio de la formación del acrosoma. Finalmente, los espermatozoides muestran una cabeza fundamentalmente esférica, aunque algunas pueden ser ovaladas, en donde se destaca un núcleo muy denso con una escotadura donde se integra un centríolo que se constituye en el cuerpo basal de un cilio extremadamente largo del tipo 9+2. El

citoplasma apenas existe y solo hay un abultamiento en el que se agrupan algunas mitocondrias que se relacionan con el cilio y una proyección laminar delgada que nace en la base ciliar. En resumen, en el grupo control no ha presentado alteraciones importantes en la morfología testicular (Figura 39.A).

En G3 (Figura 39.B), el parénquima testicular mostraba signos leves de degeneración de los componentes celulares en el 85.7 % de los individuos evaluados, con diferencia significativa ($p < 0.05$) para los demás grupos (Tabla 19). Se observó una tumefacción de las células de Sertoli y una pérdida parcial de las células productoras de espermatogonias. Aunque el número de espermatozoides se mantuvo en proporciones normales en 85.7 % de los individuos evaluados, hubo una discontinuidad de los cordones testiculares, de modo que algunos espermatozoides se liberaron al interior del testículo. Tales alteraciones también fueron visualizadas en microscopia electrónica, donde se observó una leve degeneración de los componentes celulares, pero el resto de los componentes observados eran muy similar al grupo control.

El estudio de los testículos en G2 revelaron signos moderados de degeneración (Figura 39.C), con diferencia estadística respecto a los demás grupos ($p < 0.05$). Estas alteraciones se producen en todos los componentes celulares, con una pérdida celular y disminución drástica del número de espermatozoides, vacuolizaciones citoplasmáticas y desorganización de las bolsas testiculares (Tabla 19). Al microscopio electrónico se observaron alteraciones en todos los componentes celulares en un alto porcentaje de machos. Las células de Sertoli presentaban se degeneradas con vacuolizaciones del citoplasma. Las espermatogonias presentaban degeneración y tumefacción; degradación de la cromatina de los espermatoцитos, núcleos y fosetas de implantación de las espermátidas. Además, los espermatozoides tenían formas inmaduras y degeneradas. Para todas estas alteraciones, se encontraron diferencias significativas en comparación con los individuos expuestos a concentraciones más bajas, así como con el grupo de control ($p < 0.05$).

El G1 presentó un parénquima con alteraciones severas, como degeneraciones celulares, edema muy marcado y procesos hemorrágicos (Figura 39.D) en todos los machos evaluados, con diferencias estadísticamente significativas respecto al G3 y al grupo control ($p < 0.05$) (Tabla 19). Al microscopio electrónico, estos hallazgos se registraron con frecuencia e intensidad similares. En general, se observaron degeneraciones celulares, así como un aumento muy significativo de las células de Sertoli y una

morfología de células activas, con espermatogonias disminuidas en número y degenerados. Aunque alterados, los espermatoцитos mantuvieron sus divisiones meióticas. Se observaron procesos de vacuolización de las espermátidas tanto en su citoplasma como su envoltura nuclear. Los espermatozoides estaban muy disminuidos en cuanto al número, algunos con una morfología normal y otros con procesos degenerativos, es decir, tumefacción e hipertrofia y formas monstruosas (Figura 39.E). Se encontraron diferencias significativas para todas estas alteraciones en comparación con lo descrito para G3 y el grupo control ($p < 0.05$).

Tabla 19. Clasificación de las alteraciones testiculares en peces cebras en los distintos grupos experimentales, valorados según la gravedad de lesión histopatológica y el porcentaje de animales que las presentaron

Alteración	Control	G3 (50 µg. L⁻¹)	G2 (50 µg. L⁻¹)	G1 (50 µg. L⁻¹)
Grado de degradación del parénquima testicular	- (100%)	+ (85.7%)	++ (71.4%)	+++ (100%)
Frecuencia de espermatogonias degeneradas	- (100%)	+ (85.7%)	+++ (71.4%)	+++ (100%)
Alteraciones en las células de Sertoli	- (100%)	+ (85.7%)	+++ (57.1%)	+++ (100%)

(-) ausente; (+) leve/baja; (++) moderada; (+++) grave/alta

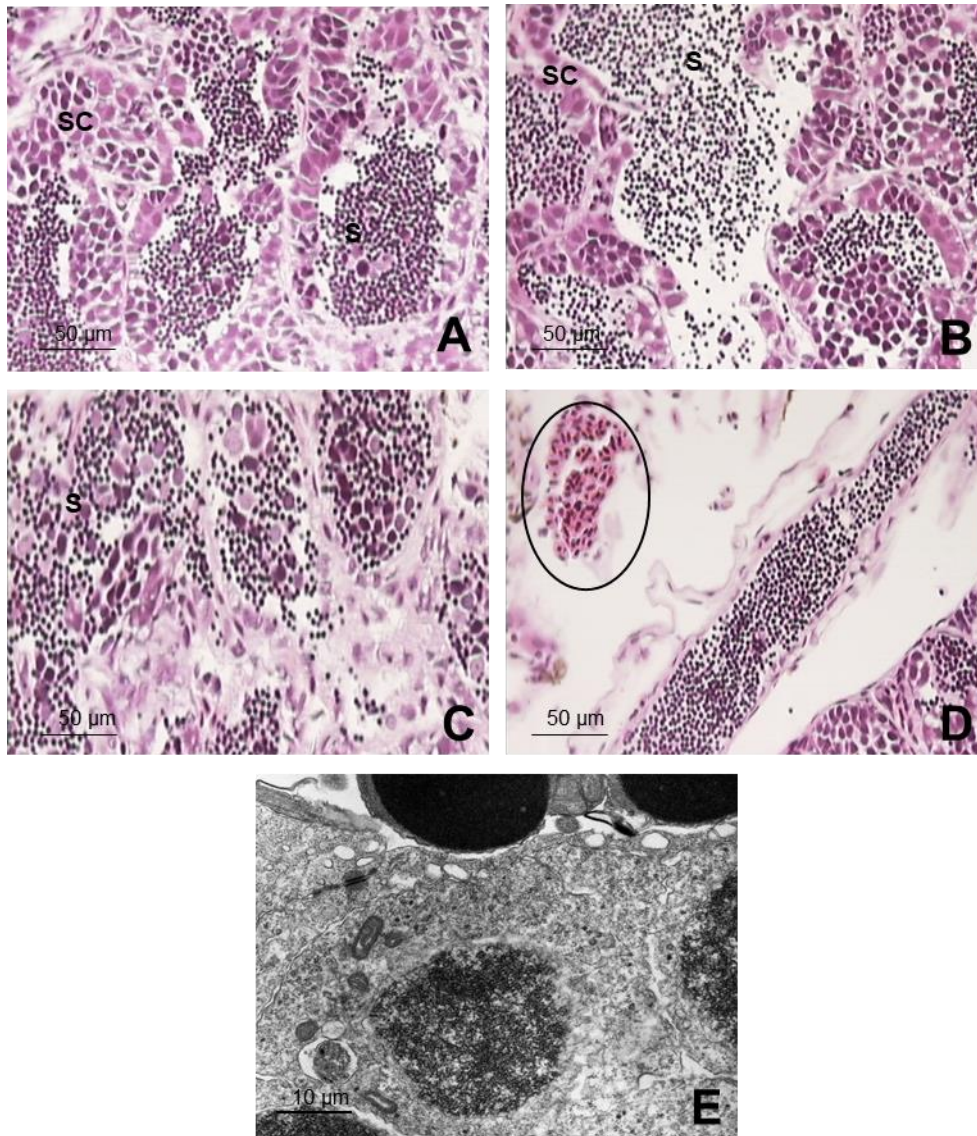


Figura 39. Parénquima testicular del pez cebra expuesto durante 21 días al BPA más el grupo de control, evaluado con microscopios ópticos y electrónicos. Microscopio óptico. (A) Grupo de control: componentes celulares que forman la espermatogénesis, así como las células de Sertoli (SC), abundantes espermatozoides (S) en las luces del cordón espermático; (B) Grupo 3 (5 µg L-1): se observó hinchazón en las células de Sertoli (SC), junto con la liberación de espermatozoides (S) debido a la discontinuidad en los cordones testiculares; (C) Grupo 2 (50 µg L-1): pérdida de células con una drástica disminución del número de espermatozoides (S), vacuolizaciones citoplasmáticas y desorganización en los cordones testiculares; (D) Grupo 1(500 µg L-1): parénquima muy degenerado, edematoso y hemorrágico (círculo). (E) Al microscopio electrónico (Grupo 1): Célula de Sertoli en el parénquima testicular con hinchazón e hipertrofia.

5.2.5 - Cuantificación del Bisfenol A en el agua y en el homogeneizado del cuerpo de los peces

Para la cuantificación del BPA en agua, se tomaron muestras en los días 7, 14 y 21 de la exposición al BPA. El volumen de cada muestra de agua fue de 20 mL de agua de cada tanque.

Para el grupo G1 la concentración de BPA ha variado, entre los tiempos, de $480.757 \pm 0.002 \mu\text{g L}^{-1}$, en el último día de prueba y $484.871 \pm 0.001 \mu\text{g L}^{-1}$ a los siete días de prueba, donde la concentración de objetivo era $500 \mu\text{g L}^{-1}$. El grupo G2, entramos concentraciones de $47.312 \pm 0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ a los siete días y máxima a los 14 días, con concentración de $48.449 \pm 0.012 \mu\text{g L}^{-1}$, donde el objetivo para este grupo era de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, en el G3, donde la concentración esperada era de $5 \mu\text{g L}^{-1}$

Las medias encontradas variaron de $4.545 \pm 0.005 \mu\text{g L}^{-1}$ a los siete días y $4.753 \pm 0.011 \mu\text{g L}^{-1}$. En ninguna de las concentraciones se ha observado diferencia estadística con la concentración esperada en cada grupo de exposición al BPA y el grupo Control no ha presentado ningún trazo de BPA (Tabla 20).

Tabla 20. Concentración de BPA en muestras de agua de los acuarios de prueba en distintos tiempos.

Grupo/BPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BPA EN AGUA ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	7 días	14 días	21 días
G1 (500)	484.871 ± 0.001	482.442 ± 0.004	480.757 ± 0.002
G2 (50)	47.312 ± 0.003	48.449 ± 0.012	47.357 ± 0.008
G3 (5)	4.545 ± 0.005	4.694 ± 0.008	4.753 ± 0.011
Control	nd	nd	nd

*Muestras de agua (por duplicado) días 7, 14 y 21 de exposición

En la evaluación de la concentración de BPA en los peces, se ha hecho un homogeneizado del cuerpo en un total de seis peces (3 machos y 3 hembras) al final de los 21 días de exposición. La media de la concentración encontrada en cada grupo está en la Tabla 21. Hubo una correlación positiva entre la concentración de BPA encontrada en los peces en comparación con la encontrada en el agua ($p=0.0014$), tras la prueba de Pearson r.

Tabla 21. Concentración de BPA en homogeneizado de cuerpo de peces expuestos más el grupo Control.

Grupo/BPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración de BPA ($\mu\text{g/g}$) en los peces
G1 (500)	14.781 ± 0.026
G2 (50)	0.285 ± 0.0013
G3 (5)	0.035 ± 0.004
Control	nd*

*nd= no detectado

6. Discusión

6.1. Evaluación del medio acuático

A pesar de la resistencia del pez cebra a distintas variaciones en el medio acuático, mantener las condiciones de calidad de agua, alimentación y ambiente externo en niveles adecuados, es de extrema importancia para garantizar el bienestar de los animales, alcanzar condiciones óptimas para la reproducción, la supervivencia y calidad de la descendencia (Haywood, 1983; Lawrence, 2007). Residuos orgánicos producidos por los peces o dentro del medio acuático pueden ser potencialmente tóxicos cuando en altas concentraciones. Estos factores estresantes cuando son por periodos cortos o puntuales no tienen efectos graves en la salud, pero el estrés a largo plazo o el estrés severo a corto plazo contribuyen a muchas de las enfermedades que incluso pueden provocar la muerte de los peces (Zahangir et al., 2015).

Eso porque los sistemas acuáticos pueden ser afectados por muchos factores internos y externos, tal como el clima de la región y de la sala (lo que requiere el ajuste/control de la temperatura ambiente de la sala de prueba), el tipo de sistema (abierto o cerrado), la calidad de agua del sistema de distribución de la región (agua menos o más dura, por ejemplo), la cantidad de peces por litro por tanque, la alimentación (la frecuencia y la cantidad de comida), la limpieza de cada acuario y de los filtros, los cambios de agua y utilización de productos tales como anticloros (Linbo, 2009; Lawrence 2012). Por lo tanto, son muchos factores que por mínimos que sean pueden cambiar en medio acuático y una alteración significativa en uno de sus parámetros de calidad (pH, temperatura, residuos nitrogenados, etc.) puede ser un factor estresante a los peces, como dicho anteriormente, y actuar como una reacción en cadena donde un parámetro alterado afecte a los demás parámetros.

La evaluación del pH, temperatura y conductividad a diario y la dureza, alcalinidad, nitrito, nitrato y amonio a la semana (antes de cada cambio de agua) ha estado dentro de los rangos aceptables para el pez cebra y su frecuencia de evaluación también seguía lo recomendado en la literatura (Lawrence, 2007; Westerfield, 2007; OECD TG 234, 2011; OECD TG 229, 2012; Avdesh et al., 2012).

El porcentaje de agua retirado en cada cambio también fue otro punto que no está estandarizado según los datos de literatura. Se sabe que cambios de más de 50% del volumen de agua de un acuario puede suponer un factor muy estresante a los peces por la alteración brusca en el medio, que puede provocar en los parámetros de calidad de agua (tal como el pH), por eso algunos autores recomiendan de hasta 50% una vez a la semana en sistemas cerrados que contengan un filtro interno en cada acuario (Westerfield, 2007) o en casos de sistema abierto, con cambios constantes de agua y filtros externos de purificación de agua, se puede cambiar al día cerca de 5-10% del volumen de agua (Linbo, 2009). En nuestro estudio, utilizando un sistema cerrado, optamos por cambiar 25% del volumen total de agua de cada tanque para evitar alteraciones muy bruscas a los peces y ha funcionado de forma satisfactoria, una vez que se pudo mantener los parámetros de calidad bajo control.

En los cambios de agua en la fase de PREEX, se utilizó el mismo porcentaje de la estandarización (25%), pero con el aumento de los residuos nitrogenados detectado en los primeros cambios de agua, aumentamos el cambio de agua a 50% (valor máximo para no provocar estrés en los peces) (Spence et al., 2006; Westerfield, 2007; Linbo, 2009). Y en estas etapas de prueba, igual que en la estandarización, la reposición de volumen de los acuarios de reproducción se hacía desde un tanque de reposición que recirculaba el agua proveniente del sistema de distribución de la ciudad, se trataba con anticloro.

En los resultados de calidad de agua encontrados en el acuario reposición de la fase de estandarización, se observa una diferencia significativa esperada entre los acuarios con peces para algunos parámetros, tales como pH (más alcalino comparado a las medias de A y B), temperatura diferente al acuario A (puede deberse a los cambios más constantes de agua que influyeron en una mayor variabilidad de temperatura en el acuario R), conductividad con media cerca de tres veces más baja (por la ausencia de peces, que por los cambios osmóticos agregan sal al agua (Lawrence, 2007), la dureza también con media más baja en relación a A y B (una vez que llevaba añadido agua destilada con la finalidad de reducir la dureza del agua), la alcalinidad y nitrito en cambio tuvieron valores muy similares a los acuarios con peces (se mantuvieron con baja variación entre las medias por meses en comparación con A y B que tuvieron valores desvío de la media), el nitrato también fue encontrado en concentraciones mucho más bajas y el amonio que fue de cero (por la ausencia de los peces que elimina amonio por las branquias, descomposición de materia orgánica de heces y comidas de los peces (Wilkie, 2002;

Lawrence, 2007). Parece que el agua del sistema de distribución de la ciudad llega con algún nivel de residuos nitrogenados, y con la filtración en el acuario la acción de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes contribuyeron para la ausencia de amonio y para los valores bajos de nitrito y nitrato.

Los resultados de calidad de agua en los acuarios A y B tenían valores aceptables, como comentado anteriormente, pero para evaluar si había diferencias entre los dos tanques, se hizo una comparación entre ellos. La separación de los peces por sexo, A (hembras) y B (machos), se hizo para evitar constantes desovas y la depredación de los embriones por parte de los padres, una vez que los acuarios no tenían separaciones para evitar tales problemas. En nuestro estudio además de mirar la variabilidad en los parámetros de calidad de agua en acuarios sometidos a las mismas condiciones de mantenimiento, concentración de pez por litro (densidad de peces en A y B fue de un pez para cada tres litros de agua), se puede incluir la variable de la influencia del sexo en tales parámetros, una vez que no hemos encontrado relatos de cambios significativos en acuarios compuestos solo por hembras o machos. Además, se hizo la corrección interna de cada acuario entre los parámetros medidos, para determinar las influencia o interacción entre ellas (por la prueba de Pearson $p < 0.05$).

El pH es uno de los factores más importantes en la acuicultura siendo un factor potencialmente estresante a los peces, por eso su evaluación debe ser a diario. Los peces no toleran cambios bruscos en los niveles de pH cuando ultrapasan el ± 1.5 de variación, aunque que estén dentro del rango aceptable para la especie (Fenner, 2001). Valores de pH intolerables para los peces están debajo de 4.5 y por encima de 10.0 (Zahangir et al., 2015). La OECD TG 234 (2011), 229 (2012) recomiendan una variación aún menor, que no sea mayor o menor que 0.5 unidades en los ensayos de toxicidad con el pez cebra. En las comparaciones de medias entre los acuarios de estandarización A y B para el pH, no hubo diferencia entre ellos y tampoco hubo variaciones de pH de ± 0.5 entre las medias de los meses evaluados, como es recomendable OECD TG 229 (2012) y Avdesh et al., (2012). Como el pH en los tanques de prueba no tuvieron amplia variabilidad, no ha interferido o ayudado en el cambio de las condiciones del medio acuático o en las concentraciones de los residuos nitrogenados (principales sustancias que sufren la influencia de los cambios de pH en la comunidad bacteriana) (Lawrence 2007). Lo mismo se observó en la fase de exposición, donde los acuarios de prueba antes y post adición del BPA, no presentaron diferencia entre los valores de pH, tampoco variaciones bruscas

o superiores a lo recomendable, aunque que un poco más Alcalino en comparación con los valores de la estandarización. Según Spence et al. (2006) el pez cebra, que es una especie que prefiere un ambiente así, más alcalino.

Otro parámetro medido a diario por su papel esencial para los peces teleósteos es la temperatura. En los acuarios con peces de todas las fases de pruebas, la temperatura se mantuvo dentro del rango adecuado y sin variaciones superiores a $\pm 0.8^{\circ}\text{C}$, aunque evaluadas tanto en verano e invierno en el caso de la estandarización. Lo que demuestra que la regulación de la temperatura interna de los acuarios a través de un termostato interno en conjunto con el control de la temperatura de la sala (con calefactores y aire acondicionado tal como recomendado por Lawrence y Mason (2012) ha sido eficiente. Aunque la variación entre los acuarios haya sido pequeña, hubo diferencia significativa de la temperatura en A (media más baja comparada a B), posiblemente por el tamaño del acuario, donde la superficie era mayor, favoreciendo la disminución de la temperatura. Mientras que los tanques de prueba en la exposición al BPA no presentaron diferencias significativas de temperatura en la comparación de sus medias.

La temperatura fue correlacionada de forma significativa en el acuario de estandarización de los machos (B) con la conductividad. Se ha observado un aumento ascendente de la conductividad desde el inicio de la prueba (marzo) hasta agosto, una ligera bajada de septiembre a diciembre y en enero otra subida ligera lo que ha coincidido con el aumento gradual de la temperatura en verano (interna del acuario B y ambiente) y bajada en invierno, aunque que no fue lineal entre todos los meses. Los niveles de salinidad varían con frecuencia en los sistemas de pez cebra cada vez que se añade agua fresca al sistema o cuando se pierde agua por evaporación (Lawrence y Mason 2015), lo que justificaría la correlación con la temperatura en el acuario B, en los meses de verano e invierno. Además, los cambios de temperatura de la sala se correlacionaron con el acuario B, lo que puede haber influido tanto en la temperatura del acuario como en su conductividad.

La conductividad también fue otro parámetro medido a diario, presentando media general más alta en el acuario A, comparado a B, diferencia que fue significativa. Tal diferencia puede deberse al tamaño del tanque A que tenía una capacidad de 120L, una superficie mayor que el acuario B (capacidad de 100L) lo que favorece la evaporación y concentración de las sales, una vez que los acuarios no llevaban tapas. Mientras que los acuarios de prueba en la fase de exposición, la comparación de las fases de PREEX y EXP entre todos los grupos correspondientes fue diferente significativamente, lo que

puede deberse a los cambios de agua que fueron más frecuentes y en mayores proporciones (50%) en la EXP. Lo que también puede justificar la diferencia encontrada al comparar la dureza entre los grupos correspondientes entre la PREEX y EXP, con excepción del grupo G3 que en la comparación con la fase de PREEX (GP3), el único grupo que no ha presentado diferencia estadística entre las medias de cada fase.

Los parámetros, dureza, alcalinidad, nitrato, nitrito y amonio se correlacionaron casi todos entre ellos, en cada uno de los acuarios A y B. La dureza depende del suministro de agua la geomorfología regional donde se puede encontrar un agua “más dura” y los minerales también pueden ser expuestos por la alimentación (Lawrence, 2007). El pez cebra es considerado de aguas dureza alta, con valores superiores a 100 mg/l de CaCO_3 , por los niveles altos de calcio en estas situaciones (Chen et al., 2003), lo que favorece la reproducción y procesos fisiológicos en el animal dependientes de calcio (Lawrence, 2007). En nuestro estudio controlamos la dureza del agua proveniente de sistema de distribución de la ciudad con adición de agua destilada y aun así se mantuvo en niveles ideales para los peces. En ninguna de las fases de pruebas se ha observado diferencias de las medias de dureza entre los acuarios.

La alcalinidad total (KH) fue otro parámetro sin variaciones importantes, su control es ideal en las pruebas de toxicidad, además de mantener el bienestar de los animales es por garantizar que sus valores no interfieran en los resultados. Una vez que tanto a alcalinidad como la acidez del agua pueden contribuir para aumentar o neutralizar los efectos tóxicos de algunas sustancias (Sanders, 2009). El Bisfenol A es un compuesto químico que posee baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos (Infosan, 2009; Michałowicz 2014; Lusher *et al.*, 2017). La solubilidad del BPA en agua es de 120-300 mg/l, y suele ser mayor si el pH es alcalino (Staples et al., 1997). Pero, el hecho del pH estar un poco más alcalino en las dos etapas de prueba no fue intencionado, además tal pH puede favorecer la permanencia de las bacterias que funciona como biofiltro para el agua, contribuyendo para mantener los parámetros normales, aunque sin filtro interno en los acuarios.

Los residuos nitrogenados son una gran preocupación en los acuarios por el potencial tóxico tanto del amonio como de los nitritos (Lawrence, 2007). Para controlar sus niveles se puede hacer un cambio de agua, cerca de 5-10% al día y disminuir la frecuencia de alimentación para una vez al día (Eshchar et al., 2006; Linbo, 2009). A pesar de

preocupación con los valores de amonio en la fase de exposición de los peces adultos, las comparaciones de medias entre los acuarios antes y post contacto con el BPA no presentaron diferencias estadísticas.

Evaluando la corrección observada entre muchos de estos parámetros de evaluación semanal, en la fase de estandarización, se observó medias más altas en el compuesto por hembras, para la mayoría de los parámetros, lo que sugiere que a pesar de la carga de peces haber sido igual (un pez/tres litros de agua/acuario), las hembras por recibir mayor proporción de suplementación alimentario para favorecer la reproducción, puede haber generado mayor acumulo de materia orgánica, y excreción de sustancias como el amonio.

No se ha observado señales de toxicidad en los peces, que podrían indicar que la calidad del medio acuático no era adecuada o por exposición al BPA. Las señales que caracterizan reacción de los peces a toxicidad son principalmente desequilibrio, respiración acelerada, pérdida de movimiento, incoordinación, peces que se quedan en el fondo del tanque o se mueven por un solo lugar, períodos de excitación, convulsiones, movimientos en círculos, perdida de pigmentación de la piel, apatía y muerte (Kane et al., 2005; Dobsikova et al., 2006; Khoshbavar-Rostami et al., 2006; Velisek et al., 2009; Zahangir et al., 2015).

6.2. Evaluación de los peces adultos (reproductores)

En la fase de estandarización, entre los seis cruces, el número de embriones totales a día de prueba fue muy variable. Se sabe que las hembras de pez cebrá son capaces de desovar con frecuencia, pero irregular, con varios cientos de huevos en una sesión de desove (Alsop et al., 2009), tal como hemos observado. En todos los grupos hubo puestas de menos de diez embriones y otras que ultrapasaron los 100 embriones totales. En grupos de reproductores, como el 2 y 3, la suma diaria en una de las puestas llegó a los 978 y 852 huevos, respectivamente.

Según la OECD TG 229 (2012), aunque adaptado para estudios de toxicidad, puede servir como referencia, donde se recomienda como ideal un promedio de más de 10 huevos/hembra/día, cosa que al final se ha logrado en todos los acuarios (en números promedios), incluyendo el grupo 4 a pesar de tener números de huevos por puesta más reducidos (aunque más equilibrado en números diarios) comparados a los demás grupos.

La FEC media entre los grupos ha variado de 64.7 huevos/hembra/puesta (R1) y 19.1 huevos/hembra/puesta (R4). También según el mismo documento de la OECD TG 229 (2012), puestas de hasta 20 huevos/5 hembras/día (FEC = 4 huevos/hembra/día) es considerado bajo; hasta 100 huevos/5 hembras/día (FEC = 20 huevos/hembra/día) es considerado medio; más de 100 huevos/5 hembras/día (FEC = más de 20 huevos/hembra/día) es considerado alto. De este modo en el grupo R1 y R2 ha oscilado, a cada puesta, en desoves considerados de bajo a alto, mientras que los grupos 3 y 4 oscilaron entre bajo y medio.

En la fase aclimatación para exposición al BPA, las medias de FEC, las medias variaron de 54.08 ± 14.73 (GP4) a 105.4 ± 66.75 (GP2), una tasa de fecundación aceptables, con producciones de huevos variando de medio a alto en la evaluación según los criterios de la OECD TG 229 (2012). Estos se aceptaron para seguir con los reproductores para la fase de exposición una vez que se ha encontrado una fecundidad buena y número suficiente de embriones por grupo para la evaluación del desarrollo.

Una vez expuestos al BPA la reducción de la FEC fue observado en el grupo de mayor concentración ($500 \mu\text{g L}^{-1}$). Esa disminución en la capacidad de desova de las hembras puede ser un indicativo de los efectos en la reproducción provocados por la exposición al BPA (dato que corrobora con los resultados de la histopatología expuestos en otro apartado). Nuestros resultados coinciden con los estudios de Canonica et al. (2008) que han demostrado que la exposición crónica del pez cebra a sustancias como el 17α -tinilestradiol (estrógeno sintético), que puede estar presente en las aguas residuales y en las aguas superficiales, induce un retraso en el inicio del desove y una reducción de la fecundidad y del éxito de la fertilización en concentraciones de ng/L (Segner, 2009). La exposición a los microplásticos (que también contienen BPA en su composición) se ha asociado con una serie de efectos negativos para la salud, tanto humana o como animal, entre ellas la disminución de la fecundidad y un impacto negativo en las generaciones posteriores (Sussarellu et al., 2016, FAO, 2017). En especies marinas, tal como *Paracyclops nana*, un copépodo marino (pequeño crustáceo), se ha retrasos en el desarrollo y una menor fecundidad, tras la exposición a los microplásticos (Jeong et al., 2017). Las altas dosis y la duración de la exposición a tales productos pueden disminuirla riqueza de especies y el número total de organismos, así como reducir directa o indirectamente (FAO, 2017).

En cuanto a los coagulados, los porcentajes fueron muy variables en todas las fases, alcanzando más de 50% en la mayoría de los cruces.

El porcentaje de FER en la fase de estandarización a las 2 hpf en todos los grupos fue superior a 70%, con mayor porcentaje en el grupo R4 (tuvo menor puesta y mayor FEC a las 2hpf), un porcentaje considerado bueno y parecido a los encontrados en el grupo control en estudios realizados por Martínez-Sales et al. (2015). En contrapartida, al mirar la viabilidad (mismo cálculo de la FER) de los embriones a las 24 hpf se observa una gran reducción media de embriones viables, con porcentajes entre 35% (grupo R1) y 57% (grupo R3), debido al alto número de coagulados. En nuestro estudio la evaluación de la FER, en los ensayos de toxicidad al BPA en los peces adultos, no ha sido muy determinante en la evaluación de la reproducción, una vez que los porcentajes encontrados no se diferenciaron de los datos encontrados en el grupo control, tampoco en la comparación de cada grupo con los datos previos a la exposición de los animales al BPA.

Son muchos los factores que pueden afectar la eficiencia reproductiva de los peces y la tasa de viabilidad de la prole, tales como la especie y el tipo fertilización (externa o interna), la edad de los reproductores, la nutrición y el estrés (por las instalaciones, densidad animal, productos químicos) (Campbell et al., 1994; Spence y Smith, 2005; Braunbeck y Lammer, 2006; Lawrence, 2007; Westerfield 2007; Carfagnini et al., 2009; Nasiadka y Clark, 2012; Delomas y Dabrowski, 2018).

La edad de los peces influye de forma directa en la reproducción, donde normalmente las hembras más viejas (aproximadamente 18 meses) empiezan a disminuir su capacidad reproductiva significamente (Nasiadka y Clark, 2012). Según, Sullivan (2007) y Wssterfield (2007) aunque que el pez cebrá posee la edad reproductiva a partir de las 10-12 semanas, el mejor rango de edad para la reproducción es entre 7 y 18 meses. En nuestros estudios los animales utilizados tenían edad alrededor de los 7 meses, según o recomendable, así que el factor edad en nuestro caso no ha sido un problema.

Como la intención en la fase de estandarización era evaluar la capacidad de poner huevos viables, el intervalo de cruces fue de una semana. Según estudios de Nasiadka y Clark (2012), el exceso de desove puede disminuir la cantidad y la calidad de los huevos y recomienda tener al menos una semana de descanso antes de utilizar a los reproductores en el siguiente desove, por otro lado, si los peces no desovan con frecuencia, los huevos

se reabsorben en la hembra (Nasiadka y Clark, 2012). Pero estudios anteriores de Eaton et al. (1974), determinaron que el pez cebra es capaz de desovar en intervalos medios de 1.9 días.

Markovich et al. (2007) han evaluado el efecto de diferentes dietas sobre desove y la supervivencia donde se ha demostrado que la suplementación con dietas más grasas, como el uso de *Artemia sp.* resultaba en mayor número de huevos comparada a dietas secas y que se divida en tres veces al día. Otros autores recomiendan la alimentación en una frecuencia de una a dos veces al día, dependiendo de las condiciones de calidad de agua (Avdesh et al., 2012; OECD TG 229, 2012; Lawrence y Mason 2015)

El desove y el éxito reproductivo se ven muy influenciados por el estrés (Ramsay et al. 2009) y el estado de salud de la hembra (Matthews 2004; Ramsay et al. 2009). En nuestros estudios no se ha observado agresividad entre los peces, tanto por parte de los machos como de las hembras además la calidad de agua estaba entre los parámetros ideales y la densidad de peces en los acuarios de reproducción pueden llegar a cinco adultos por litro (Brand et al., 2002), en nuestros estudios la densidad de peces por litro fue inferior a esa proporción., además la densidad de macho estaba equilibrada.

Las señales olfativas desempeñan un papel fundamental en la reproducción del pez cebra. La liberación de esteroides glucurónicos en el agua por parte de los machos induce la ovulación en las hembras (Lawrence, 2007). Después de la ovulación, las hembras liberan hormonas que a su vez que a su vez provocan el comportamiento de apareamiento de los machos, que precede inmediatamente y provoca la oviposición y el desove (van den Hurk y Lambert, 1983). Las feromonas también parecen tener la capacidad de suprimir la reproducción, donde las hembras "dominantes" del pez cebra pueden inhibir el desove de las hembras subordinadas (Gerlach, 2006). Tales factores pueden justificar la diferencia de puestas entre los grupos de reproductores.

Además, una combinación de una mayor filtración química y la tasa de reposición de agua en los sistemas de recirculación puede ayudar tanto a reducir las interacciones de dominancia entre hembras, por la dilución homogenización de las feromonas en el acuario o dependiendo de la frecuencia y cantidad de agua retirada, disminuir los niveles de los mismos (Lawrence, 2007).

6.3. Evaluación de viabilidad embrionaria

El azul de metileno (AM) es un agente antifúngico comúnmente utilizado en la cría de embriones de pez cebra agregándolo al agua o al medio embrionario (Hedge et al., 2017; Peneyra et al., 2020). En humanos, su acción como inhibidor del óxido nítrico sintasa y de la guanilato ciclasa tiene muchos usos en medicina en tratamientos para mejora de cuadros de hipoxia, hipotensión y la función cardíaca en el shock séptico (Ginimuge y Jyothi, 2010). A pesar de los beneficios citados, también están descritas alteraciones que el AM puede provocar, tales como efectos teratogénicos en peces de la especie *Pterophyllum scalare*, conocido como pez ángel (Perlberg et al., 2008), aumento de la muerte fetal (ratas y humanos) y producir hiperbilirrubinemia, anemia hemolítica y atresia intestinal (humanos) (Hedge et al., 2017).

La propuesta de hacer lavados previos de los embriones antes de la incubación es para promover la entrada mínima de microorganismo en el medio de incubación, la propuesta de Williams y Renquist (2016) y que aplicamos entre los protocolos de manipulación de los embriones, fue de hacer tres “lavados” tras la recogida de los embriones de los acuarios de reproducción.

Al evaluar los resultados en T2, que fueron los peores, principalmente respecto a la eclosión en 96 hpf, se observa que solamente la desinfección de los embriones antes de incubar y luego incubarlos en medio con agua del sistema no ha sido efectivo en mantener la viabilidad embrionaria. En nuestro estudio, todos los grupos tuvieron mejores resultados de eclosión a las 96 hpf, incluyendo el control, y adaptando tal evaluación a este caso, no se puede afirmar que el AM haya demostrado toxicidad por la reducción de las eclosiones en T2 por el hecho de haber sido una exposición significativa como para provocar toxicidad, además en el grupo donde se hizo la desinfección y incubación de los embriones en AM (T3) las tasas de eclosión fueron similares las encontradas en los grupos Control y T1.

Respecto a las malformaciones no fue observado alteraciones en embriones en contacto constante con el AM. En contrapartida, estudios de Perlberg et al. (2008) efectos teratogénicos tal como en fase de inflación de la vejiga natatoria a los 4 días post fertilización en peces de la especie *Pterophyllum scalare*, al contrario de lo que observamos nosotros.

El medio E3 es muy utilizado en estudios con embriones de pez cebra (Avdesh et al., 2012; Celienni et al., 2017; Fuad et al., 2017; Best y Vijayan, 2018; Lackmann et al., 2018), donde en los diversos trabajos lo único que puede cambiar es la cantidad de cada sustancia utilizada y la utilización o no del azul de metileno a distintas concentraciones.

En nuestro estudio seguimos el protocolo de producción del medio E3 adaptado a lo propuesto por Brand et al. (2002). Además de la evaluación de la eficiencia en el uso del medio embrionario, se ha evaluado la carga de embriones por placa, que un factor muy importante para la viabilidad embrionaria por la cantidad de oxígeno disponible. Kimmel et al. (1995) y Walker (2007) recomiendan el uso de 5 – 10 embriones por ml de medio, para su incubación. Brand et al. (2002), propone un protocolo de recogido de embriones donde recomienda llenar una placa de Petri de 90 mm hasta $\frac{3}{4}$ de su volumen para permitir el intercambio de oxígeno con el exterior y una cara de 60 embriones por placa. Nosotros adoptamos el protocolo de Brand et al. (2002) adaptándolo al uso en placa de Petri de tres secciones para facilitar la observación embrionaria, evaluando el uso del medio E3 con y sin azul de metileno, además probamos la carga de embriones por placa de 45 y 60 embriones. La temperatura de incubación dentro del límite ideal para embriones de pez cebra (Walker, 2007).

Según von Hellfeld et al. (2020), la coagulación suele ocurrir en las primeras 24 hpf y es indicativa de una muerte temprana (sólo en raras ocasiones ocurre en las posteriores fases del desarrollo). También según los mismos autores, ocurre por detención de la gastrulación, fase de formación de cerebro y notocorda rudimentarios y empieza con 50 % de epibolia formado (Kimmel et al., 1995), pero también puede observarse en embriones con un grave retraso en el desarrollo. En el caso de nuestros los niveles de embriones coagulados no se debían a la toxicidad de sustancias, una vez que los medios embrionarios utilizados estaban controlados, se asocia al caso de muerte temprana (von Hellfeld et al., 2020) que puede ocurrir por factores relacionados con los reproductores y en las primeras horas post fecundación por el fallo en la fertilización (Mason, 2007).

En general el medio E3 con y sin azul de metileno ha demostrado mejores resultados principalmente respecto a las tasas eclosiones a las 48 hpf, en comparación con medio compuesto por agua limpia proveniente del acuario de reposición de agua de los acuarios de los peces adultos. Embriones incubados en agua retrasaron las eclosiones tanto en placas de carga baja como alta, con diferencias significativas a los grupos M2 y M3, tanto en 72 hpf como a las 96 hpf. El medio E3 sin y con azul de metileno mostró ser eficaz,

favoreciendo el desarrollo del embrión al promover la eclosión, en los tiempos ideales descritos para el pez cebra (Kimmel et al., 1995; Brand et al., 2002; Westerfield, 2007). En los estudios de toxicidad la eclosión es considerado uno de los puntos finales de evaluación de alteraciones en el desarrollo, una vez que ocurre cuando la anatomía general está principalmente desarrollada y los embriones están listos para la eclosión (Beekhuijzen et al., 2015), además el desarrollo de los embriones ocurre de forma sincrónica, después de las primeras horas post fertilización (Kimmel et al., 1995).

En nuestra evaluación el medio embrionario puede ser utilizado en los estudios del desarrollo embrionario por permitir tasas de eclosión en los tiempos normales para el pez cebra y no provocar alteraciones significativas en los embriones cuanto a malformaciones y mortalidad.

6.4. Evaluación de los embriones (F1)

Varios autores describen el impacto negativo del BPA en el desarrollo del embrión de los peces y crecimiento tanto en la fase larvaria como en la juvenil (Faheem, et al., 2021). Además, la exposición de la generación F0 de pez cebra expuestos a concentraciones entre 10 y 400 µg/L de BPA, provocó efectos en la generación F2, tales como peso y longitud corporal reducidos en comparación con los individuos F2 del grupo de control (Keiter et al., 2012; Faheem, et al., 2021).

Es conocido el efecto del BPA sobre el desarrollo de embriones de pez cebra, la ocurrencia de malformaciones en exposiciones de los mismos a distintas concentraciones, puede causar alteraciones que provocan la muerte, el retraso de desarrollo o malformaciones a largo plazo (Akhter et al., 2018). Los DE pueden interferir en las funciones del sistema endocrino, así como en la síntesis, liberación y el metabolismo de las hormonas (Chen et al., 2019). Afectando la reproducción al interferir en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG) que también sufre alteraciones por las condiciones del medio ambiente (Musumeci et al., 2015; Tao et al. 2022).

La tasa de coagulados es un parámetro de evaluación de toxicidad principalmente en los estudios de DL₅₀, que puede indicar la de muerte temprana del embrión posiblemente por relacionado la detención de la gastrulación (von Hellfeld et al. (2020). En nuestro estudio, no se ha observado diferencias estadísticas entre la tasa de coagulados en las primeras 24

hpf, en los distintos grupos. No se puede, en este caso, asociar tales pérdidas a la toxicidad del BPA, una vez que también se ha observado una tasa de coagulados similar en el grupo control y, además, los embriones no habían permanecido en medio embrionario contaminado con el BPA. Muchas veces el fallo en la fertilización puede llevar el embrión a coagular y las señales coagulación, además del color blanco lechoso en que se convierte el huevo puede aparecer con la presencia de burbujas, en un huevo aparentemente normal, en el polo animal del huevo hasta las 4 hpf (Beekhuijzen et al., 2015), nosotros seleccionamos los embriones en las primeras 2 hpf para evitar la manipulación excesiva de los embriones al quitarlos de los acuarios de prueba.

Los DE pueden activar, reprimir o interferir en la síntesis y el metabolismo de las hormonas. El BPA, un DE muy conocido en la actualidad, posee la capacidad agonista de los receptores de estrógeno y también es capaz de antagonizarlos en tejidos como el cerebro y en los órganos reproductores de humanos, rata, ratón y peces como el pez cebra (vom Saal et al., 2006; Richter et al., 2007; Chung et al., 2011; Canesi, 2015;).

Dado que no se encontraron número de alteraciones en ninguna de las etapas de crecimiento del grupo de control del pez cebra, se pudo asociar un mayor número de embriones alterados con los grupos de exposición al BPA (G1, G2 y G3). Estas alteraciones pueden explicarse por la acción estrogénica del compuesto y el refuerzo de los efectos sobre la hormona tiroidea de los peces en crecimiento. En este sentido, el BPA actúa provocando la alteración de la transcripción de diferentes genes sensibles a la T3, que son marcadores biológicos relacionados con la función de la hormona tiroidea en el crecimiento del esqueleto y los huesos, así como en el desarrollo ocular y hematopoyético (Bhandari et al., 2015). Además, con respecto a la mayor mortalidad observada, aunque ésta ya había sido descrita en embriones expuestos directamente a concentraciones de 5000 a 20.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante varias horas (Pelayo, 2012), en nuestro estudio se observó que la acción del BPA en concentraciones mucho más bajas como las utilizadas (aproximadamente 500, 50 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), en las que, además, los embriones no estuvieron expuestos más de una hora hasta su recogida, fueron suficientes para provocar un porcentaje de mortalidad considerable, principalmente en la concentración de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, generando importantes alteraciones en el crecimiento, básicamente clasificadas como teratogénicas.

Las alteraciones de no formación de somitas y no desprendimiento de cola son alteraciones consideradas letales (OECD TG 236, 2013; von Hellfeld et al., 2020).

Mientras que las malformaciones de la cabeza, de la columna vertebral, edema pericárdico y de saco vitelino son consideradas subletales, con potencial o no regeneración (von Hellfeld et al., 2020).

Nuestros resultados coinciden con los de otros estudios publicados relacionados con la exposición a concentraciones crecientes de BPA. Estos incluyen un aumento de las malformaciones cardíacas y cefálicas, alteraciones en la vejiga natatoria, formación de edemas en el saco vitelino, no formación de somitas, así como el no desprendimiento de la cola (Lam et al., 2012; Tišler et al., 2016). Estas alteraciones están relacionadas con la desregulación de genes relacionados con el sistema endocrino (regulador del crecimiento embrionario (Egr2)) causada por el BPA, afectando principalmente al desarrollo cardiovascular y neurológico (Lam et al., 2012). En estudios de Cypher et al. (2015), demostraron que la exposición al BPA tiene un efecto mínimo durante la normoxia pero puede afectar gravemente al sistema cardiovascular durante un evento hipóxico en larvas de pez cebra, se sabe que la vía de acción durante la hipoxia es por la interacción entre el BPA y la vía del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α). La asociación entre la exposición embrionaria directa al BPA y la presencia de malformaciones cardíacas y cefálicas también fue descrita por otros autores (Duan et al., 2008; Gilbert et al., 2011). Las alteraciones encontradas por nosotros coinciden con las de esos autores a pesar de que los embriones de nuestro estudio no estuvieron en contacto con el BPA durante el tiempo de evaluación (96 hpf). Esto demostró que los efectos del BPA podrían estar en la generación F1, independientemente de que haya habido o no contacto directo con el producto químico.

Las alteraciones musculoesqueléticas y malformaciones de la cabeza pueden relacionarse son los posibles efectos neurotóxicos de los DE. Estudios realizados *in vitro* demostraron que el BPA puede ser tóxico para las células del sistema nervioso. Se observó que el BPA en altas concentraciones (por encima de 100 μ M) inducía la apoptosis de las células neuronales del hipocampo (Michałowicz, 2014). La actividad locomotora se ha utilizado ampliamente para estudiar los efectos de las sustancias químicas neurotóxicas en el neuro comportamiento del pez cebra, la exposición a un análogo del BPA, el BPS en la dosis de 3 mg/L, provocó en larvas de pez cebra presentaron alteraciones en la estructura de la retina, afectó al comportamiento locomotor, además de bajar los genes necesarios para el desarrollo neural normal (Gu et al., 2019). En estudios recientes se comprobó que, tras la exposición al BPA, larvas de pez cebra presentaron alteraciones de comportamiento (tal

como preferencia de colores), una disminución de la distancia recorrida y movimiento lento (Kim et al., 2020). En nuestras observaciones, no hemos observado diferencias entre el comportamiento de larvas entre los grupos, por lo menos en los momentos de evaluación de las demás alteraciones embrionarias, lo que es muy poco tiempo para determinar que no haya podido ocurrir tales alteraciones comportamentales en los individuos tratados en esta investigación.

La alteración relacionada con la formación de edemas en el saco vitelino podría estar vinculada a la interrupción del metabolismo de los lípidos provocada por el BPA una vez que el saco vitelino actúa como órgano de reserva de nutrientes, como fosfolípidos y triacilgliceroles, para el crecimiento del embrión. Por tanto, las alteraciones lipídicas podrían afectar directamente al saco vitelino. En ratas y ratones, por ejemplo, el BPA es capaz de aumentar la densidad celular de los adipocitos e inducir la acumulación de lípidos hepáticos, lo que refuerza la hipótesis de que el metabolismo de los lípidos es una de las principales vías del BPA (Mu et al., 2018).

Con respecto al porcentaje de eclosión, se obtuvieron valores más altos en los embriones de progenitores expuestos al BPA, coincidiendo los primeros registros en todos los casos, aunque en menor proporción a las 48 hpf. Los mayores porcentajes de eclosión se registraron entre las 72 y 96 hpf. Estos resultados coinciden con lo esperado en relación con el tiempo de eclosión, que osciló en torno a las 72 hpf. La tasa de eclosión a las 72 hpf es descrita por Martínez-Sales et al. (2015) como un buen indicador de embriotoxicidad en embriones de pez cebra tras la exposición a sustancias tóxicas (tal como los disruptores endocrinos) que pueden disminuir o inhibir la eclosión a este tiempo post fertilización. Los datos de la bibliografía respecto a este parámetro en ensayos con BPA son controvertidos, ya que algunos estudios señalan que el BPA es una sustancia capaz de provocar un retraso en la eclosión a las 72 hpf en el pez cebra (Tišler et al., 2016), y otros no encontraron diferencias aparentes entre los grupos evaluados (Mu et al., 2018). La acumulación de BPA en huevos de trucha arco iris, antes de la fecundación, no modificó su tasa de fecundación, pero retrasó la eclosión y el crecimiento larvario en comparación con los controles (Aluru et al., 2010). En un estudio similar al nuestro, la exposición de los padres al BPS (análogos del BPA) provocó un retraso en la eclosión de la generación F1 del pez cebra (Ji et al., 2013), pero esto no se evidenció significativamente en nuestro estudio con BPA.

Estas alteraciones del desarrollo tras la exposición de los adultos en edad reproductiva a disruptores endocrinos puede reflejar en el desarrollo de la siguiente generación (Xu et al., 2017). En los seres humanos, la exposición a dosis más altas de BPA que las utilizadas en este estudio (concentraciones relevantes para la salud humana) puede conducir a una pubertad más temprana en los individuos expuestos durante la fase fetal y a un mayor crecimiento de la próstata en los seres humanos (Wolstenholme et al., 2011), lo que se atribuye a los conocidos efectos epigenéticos de las sustancias alteradoras endocrinas (Xin et al., 2015). En estudios de evaluación de la fecundidad de otras generaciones de peces cebra, también se observaron efectos transgeneracionales adversos sobre la fecundidad en la descendencia de los peces expuestos al BPA (Akhter et al., 2018).

6.5. Concentración de BPA en los peces y en el agua

La concentración de BPA medida en agua y en los peces expuestos en los grupos G1 (500 $\mu\text{g L}^{-1}$), G2 (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) y G3 (5 $\mu\text{g L}^{-1}$), se correlacionaban significativamente, lo que comprueba la absorción del producto de forma ascendente cuanto más alta la concentración de BPA en el agua, resultados que coinciden con los encontrados por Molina et al. (2013).

Respecto a la acumulación de BPA en el cuerpo, estudios en humanos han detectado BPA en cerebro, hígado, tejido adiposo (Fernández et al. 2007; Geens et al. 2012), pero su acumulo en el cuerpo por largos periodos todavía no está esclarecido, una vez que en algunos estudios e ha encontrado la misma concentración de BPA en la sangre era muy próxima a lo encontrado en los órganos, y se elimina por la orina (Volkel et al. 2008). Mientras que otros estudios plantean su acumulo en compartimentos corporales y eliminación lenta, tras su entrada por vía alimentarias y no alimentarias (Stahlhut et al., 2009). Aunque son capaces de excretar fácilmente el BPA los organismos acuáticos pueden estar expuestos crónicamente al compuesto y en estos casos la excreción puede verse desbordada (Canesi y Fabbri, 2015).

En estudios de Molina et al., 2013 la evaluación de la concentración de BPA en el pez cebra se ha detectado la acumulación de BPA en los tejidos del pez cebra, que aumentó a medida que la concentración de BPA se elevaba. En nuestros estudios debido a la exposición constante, los niveles de BPA en el cuerpo de los animales se mantuvieron

durante el periodo de prueba, no se ha evaluado de forma individual la concentración de BPA en los órganos, pero también se ha confirmado su acúmulo el cuerpo proporcional a la concentración expuesta.

La eficacia de la degradación del BPA en agua puede ser muy afectada por el pH y la temperatura, considerando la especiación de cloramina y BPA, según descritos en estudios de He et al. (2017). A pesar de que el pH favorece su dilución, también favorece su eliminación, igual que temperaturas altas (en torno a 30°C) también provocan el mismo efecto en estudios en conjunto con la dechloración del agua (He et al., 2017). En nuestros estudios, los cambios de agua y reposición de proporcional a la concentración de BPA en cada acuario de prueba fueron realizados con frecuencia, pensando una la posible degradación del producto, y de este modo hemos podido mantener el BPA en las concentraciones propuestas.

6.6. Evaluación histopatología de peces expuestos al Bisfenol A

Con respecto a los estudios histopatológicos, hay que tener en cuenta la característica del BPA de ser un modulador selectivo de los receptores de estrógenos RE α y RE β , como se ha comentado anteriormente. Su actividad estrogénica actúa directamente sobre la vitelogenina, que es una proteína secretada por los hepatocitos del hígado que se sintetiza en respuesta a los estrógenos endógenos, como el 17 β -estradiol (E₂), se libera al torrente sanguíneo y se transporta a los ovarios, actuando en el desarrollo del ovocito (Wetherill et al., 2007; Bhandari et al., 2015; Matozzo et al., 2008).

El BPA, como DE, puede aumentar significativamente la transcripción de la vitelogenina (Bhandari et al., 2015), siendo así capaz de causar efectos negativos en la función y el desarrollo de los sistemas reproductivo y neurológico (Tse et al., 2013). Los ratones hembra expuestos prematuramente al BPA manifestaron una reducción de la fertilidad y la fecundidad (Cabaton et al., 2011). También puede alterar la morfología y la funcionalidad del tracto reproductivo de las hembras, así como afectar al desarrollo de la glándula mamaria en la pubertad y comprometer la diferenciación sexual en el cerebro (Markey et al., 2005; Muñoz-de-Toro et al., 2005; Nakamura et al., 2006).

Las concentraciones de BPA utilizadas en los grupos de experimentación están en el rango considerado como una dosis baja para los animales acuáticos, que es inferior a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BPA en el agua (vom Saal, Welshons, 2006). A pesar de la baja dosis utilizada, en nuestro estudio se encontraron alteraciones significativas, tanto en el microscopio óptico como en el electrónico, siendo éstas más evidentes en los individuos expuestos a concentraciones más altas de BPA (500 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Una de las alteraciones encontradas en el estudio histopatológico, tanto del grupo G1 como del G2, fue la presencia de numerosas vesículas lipídicas (gránulos y gotas lipídicas) en su citoplasma. En este sentido, hay que considerar que los lípidos que se encuentran de forma natural en los huevos de los peces provienen de los ácidos grasos de su dieta, de las reservas, y/o son sintetizados por el organismo del animal (Wiegand, 1996). Además, los lípidos llegan a los ovocitos a través de la vitelogenina, que es rica en lípidos polares, y probablemente a través de otras lipoproteínas especialmente de baja densidad que son ricas en triaglicerol, que ayudarán a suministrar energía para el desarrollo embrionario y larvario (Wiegand, 1996). Esto significa que la composición lipídica de los ovocitos está directamente relacionada con la concentración de vitelogénesis en la sangre, principalmente durante la fase de vitelogénesis, en la que se produce la yema del huevo (Biran y Levavi-Sivan, 2018).

Como las alteraciones encontradas fueron más acentuadas en los grupos con mayor concentración de BPA, se puede asociar directamente su acción tóxica en las gónadas de las hembras de pez cebra expuestas. Una vez que la acción estrogénica del BPA ha influido en la concentración de vitelogenina al alza, el BPA también puede estar asociado a la aparición de folículos numerosos atróficos y a la degradación de todos los componentes del folículo, siendo ambas alteraciones más frecuentes y evidentes en los grupos tratados con BPA. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores (Flint et al., 2012; Molina, et al., 2018).

La alteración de la maduración de los ovocitos porcinos tras el tratamiento con BPA se evidenció en estudios in vitro, lo que se debió principalmente a alteraciones en el citoesqueleto de los ovocitos, a la modificación epigenética, al estrés oxidativo, a la autofagia y a la apoptosis de los ovocitos, comprometiendo los sistemas reproductivos porcinos (Wang et al., 2012). Además, se ha descrito el proceso de atresia folicular observado en grupos expuestos a BPA en individuos en los que no hay puesta de huevos y el ovocito es reabsorbido por el organismo del animal, que se incrementa en poblaciones

cultivadas o silvestres sometidas a altos niveles de explotación y captura, siendo posiblemente originado por diferentes disfunciones o alteraciones reproductivas (Valdebenito et al., 2011; Abdollahpour et al., 2020).

Se observaron alteraciones en la evaluación estructural y microestructural de los machos, como la degeneración del parénquima, la inflamación de las células de Sertoli y la disminución del número de espermatozoides; esto último se agravó proporcionalmente cuanto mayor fueron las concentraciones de BPA utilizadas. En la concentración más alta, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ en G1, se encontraron alteraciones aún más graves, como edema y hemorragia en el parénquima, disminución de las espermatogonias, aumento de las células de Sertoli que permanecían activas, reducción de los espermatozoides y alteraciones en su morfología. Esas alteraciones podrían deberse al aumento de las acciones estrogénicas una vez que el BPA puede actuar como E₂. El E₂ está normalmente presente en bajas concentraciones en la sangre de los varones, actuando de forma importante en la expresión génica de los testículos (Miura et al., 1999; Schulz et al., 2010). El aumento de E₂ en los varones puede confirmarse por el aumento concomitante de la vitelogenina en su sangre, una vez que el E₂ tiene la capacidad de inducir el gen codificador de la vitelogenina entre 10 y 30 veces.

Además, la exposición a altos niveles de estrógenos puede reducir el volumen del líquido seminal, aumentar la densidad de los espermatozoides y provocar infertilidad (Schulz et al., 2010). El BPA también puede actuar como receptor de esteroides (Michałowicz, 2014; Schug et al., 2011), que está asociado al proceso de maduración testicular y a la espermatogénesis. Las alteraciones espermáticas evidenciadas en este estudio corroboran las alteraciones causadas por el BPA en algunas especies de peces de trucha marrón (*Salmo trutta*) y *Pimephales promelas*, en las que se produjo una reducción de la densidad y la motilidad espermáticas (Lahnsteiner et al., 2005) y de la producción de espermatozoides (Sohoni et al., 2001).

La grave reducción del recuento de espermatozoides encontrada en nuestro estudio confirma los hallazgos de estudios similares de varias crías de pez cebra tras la exposición al BPA (Lahnsteiner et al., 2005; Bhandari et al., 2015; Chen et al., 2015). La mayoría de estos cambios en la maduración de la expresión génica parecen estar altamente correlacionados con los cambios en los niveles de andrógenos circulantes (Schulz et al., 2010), lo cual es otro indicador del hecho de que la presencia de BPA puede estar alterando negativamente la espermatogénesis. Los machos se mostraron extremadamente

sensibles al BPA, ya que, a partir del grupo con la menor concentración ($G3-5 \mu\text{g L}^{-1}$), se observaron ya alteraciones estructurales en sus testículos. La gravedad de esas alteraciones estaba directamente relacionada con el aumento de BPA en los grupos.

7. Conclusiones

PRIMERA:

Respecto a la calidad de agua, se observa una gran variabilidad de los parámetros en los distintos meses del año, referente a la estación del año. La variación en uno de los parámetros puede interferir en los demás siendo el amonio uno de los más preocupantes durante el mantenimiento. Los acuarios compuestos solamente por hembras pueden presentar valores de residuos nitrogenados ligeramente más altos comparados a los acuarios con machos, lo que puede deberse, posiblemente, al mayor aporte de comida por parte de las hembras requerido para la reproducción.

SEGUNDA:

La utilización del azul de metileno en la desinfección (lavados previos a la incubación) agregado al medio embrionario ha demostrado mayor eficacia en la viabilidad embrionaria, principalmente referente a las tasas de eclosión. El medio embrionario E3, con o sin la adición de azul de metileno, es una buena alternativa, favoreciendo principalmente la tasa de eclosión entre las 72 y 96 hpf. Además, la carga de embriones menor o igual a 60 embriones ha demostrado buenos resultados.

TERCERA:

Cuando las condiciones de calidad de agua se mantienen estables y se realizan cruces con intervalo de, al menos, una semana, se pueden alcanzar tasas de fecundidad (huevos producidos por hembra en una desova) y fertilidad (huevos fertilizados sobre el total producido) en niveles considerados adecuados para la especie. Aunque también observamos una gran variabilidad en producción de huevos entre grupos de reproductores y puestas muy discrepantes en número total absoluto (pero sin diferencia estadística) entre el desove en una semana, comparada a las siguientes.

CUARTA:

Al exponer el pez cebra al BPA, la absorción del producto por los animales es directamente proporcional a la concentración expuesta, tras un periodo de 21 días. La comparación entre la fertilidad media de los peces pertenecientes a los mismos grupos en la preexposición y la fase de exposición al BPA evidenció una considerable reducción de la fecundidad de los peces expuestos a la concentración más alta de BPA ($500 \mu\text{gL}^{-1}$).

QUINTA:

En la generación F1 de embriones de reproductores expuestos a BPA se obtuvieron alteraciones en su desarrollo clasificadas como indicadores de embriotoxicidad. Estas malformaciones fueron más frecuentes en los individuos del grupo expuesto a la mayor concentración ($500 \mu\text{gL}^{-1}$). Entre las malformaciones de mayor incidencia observadas, destacaron la ausencia de desprendimiento de la cola, la no formación de somitas, las malformaciones cefálicas, las alteraciones cardíacas y musculoesqueléticas, y el edema del saco vitelino, siendo este último el más frecuente entre los individuos evaluados. Estos indicadores de embriotoxicidad podrían estar asociados a la acción tóxica y estrogénica del BPA, como demostró la baja incidencia observada en el grupo de control.

SEXTA:

Se observó que el BPA es capaz de provocar alteraciones estructurales y microestructurales en las gónadas del pez cebra adulto tras la exposición durante 21 días. Las alteraciones ováricas percibidas fueron atresia, degeneración y, en los testículos, degeneración celular y pérdida de estructuras celulares normales, lo que podría reducir considerablemente la fecundidad, tanto en hembras como en machos.

SÉPTIMA:

Teniendo en cuenta los puntos finales específicos de ciertos disruptores endocrinos, este estudio puede aportar pruebas útiles sobre la probable causalidad de los efectos transgeneracionales del BPA, siendo ésta una cuestión clave en la propia definición de los disruptores endocrinos.

8. Referencias Bibliográficas

- Abdollahpour, H., Falahatkar, B., Jafari, N., Lawrence, C. (2020). Effect of Stress Severity on Zebrafish (*Danio rerio*) Growth, Gonadal Development and Reproductive Performance: Do Females and Males Respond Differently? *Aquaculture*, 522, 735099.
- Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2013). Perinatally administered bisphenol A acts as a mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect* 121:1040–104
- AESAN - Agencia Española Seguridad alimentaria y Nutrición. La EFSA abre una consulta pública sobre su borrador de dictamen científico relativo al bisfenol A. España, 15 diciembre 2021. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2021/borrador_dictamen.htm, acceso en abril de 2022.
- Akhter, A., Rahaman, M., Suzuki, R.-T., Murono, Y., Tokumoto, T. (2018). Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. *Heliyon*, 4: p.788.
- Alsop, D., Ings, J.S. & Vijayan, M.M. (2009). “Adrenocorticotrophic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles,” *PLoS ONE*, vol. 4, 7, e6463.
- Aluru N, Leatherland J.F, Vijayan M. M. (2010). Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *Plos One*, 5 (5): p. 10741.
- Arnold, S., Clark, K., Stapes, C.H., Klecka, G., Dimond, S., Caspers, N., Hentges, S. (2013). Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* 23, 137–144.
- Ashton, A.J, Farkvam, D.O, March, B.E. (1993). Fatty acid composition of lipids in the eggs and alevins from wild and cultured chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J Fish. Aquat.Sci.*, 50: 648-655.
- Beekhuijzen, M., Koning, C., Flores-Guillén, M E., Vries-Buitenwega, S., Marysiatobor-Kaplona, Beppyvandewaarta, Emmen, H. (2015). A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56: 64–76.
- Best, C & Vijayan, M.M. (2018). Cortisol elevation post-hatch affects behavioural performance in zebrafish larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 257, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.009>
- Bhandari, R.K, Deem, S.L, Holliday, D.K, Jandegian, C.M, Kassotis, C.D, Nagel, S.C, Tillitt,, D.E, vom Saal, F.S, Rosenfeld, C.S. (2015) Effects of the Environmental Estrogenic Contaminants Bisphenol A and 17 α -Ethinyl Estradiol on Sexual Development and Adult Behaviors in Aquatic Wildlife Species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 214, 195–219.
- Biemann, R., Blüher, M., & Isermann, B. (2021). Exposure to endocrine-disrupting compounds such as phthalates and bisphenol A is associated with an increased risk for obesity. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 35, Issue 5). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101546>

- Biran, J. & Levavi-Sivan, B. (2018). Endocrine Control of Reproduction, Fish. In Encyclopedia of Reproduction; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 362–368, ISBN 9780128151457.
- Bousoumah, R, Leso, V, Iavicoli, I, Huuskonen, P, Viegas, S, Porras, S.P, Santonen, T., Frery N., Robert A., y Ndaw S. (2021). Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. In Science of the Total Environment (Vol. 783). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146905>
- Bradford, Y., Conlin, T., Dunn N., Fashena, D., Frazer, K., Howe, D. G., Knight, J., Mani P., Martin R., Moxon, S. A. T., Paddock, H., Pich C., Ramachandran S., Ruef B. J., Ruzicka L., Schaper H. B., Schaper K., Shao X., Singer A. Westerfield M. (2011). ZFIN: Enhancements and updates to the zebrafish model organism database. Nucleic Acids Research, 39(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1077>
- Brand, M., Granato, M., Nüsslein-Volhard, C. (2002). Chapter 1 Keeping and Raising Zebrafish; C. Nusslein-Volhard and R. Dahm, New York, NY, USA, pp. 7–24.
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol., 89: 66–77.
- Braunbeck, T. & Lammer E. (2006). Background document on fish embryo toxicity assays – UBA Contract Number, 203 (85): p. 422.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish LC (50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. ALTEX, 22: 87–102.
- Breder, C.M, & Rosen, D.E. American Museum of Natural History. (1966). Modes of reproduction in fishes. Garden City (NY): Natural History Press.
- Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Carr, G.J., Cenijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hubler, N., Kleensang, A., Knobel, M., Kussatz, C., Legler, J., Lillicrap, A., Martinez-Jeronimo, F., Polleichtner, C., Rzodeczko H., Salinas E., Schnei-Der K.E., Scholz S., Van Den Brandhof E.J Van Dervenl., T.M., Walter-Rohde S., Weigt S., Witters H., Halder M. (2014). OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. Regul Toxicol Pharmacol., 69: 496–511.
- Cabaton, N.J., Wadia P.R., Rubin B.S., Zalko D., Schaeberle C.M., Askenase M.H. (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. Environ Health Perspect, 119: 547–552.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., & Sumpster, J. P. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. In Aquaculture (Vol. 120).
- Canesi, L. & E. Fabbri. (2015). Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. Dose-Response: An International Journal, 1-14.
- Carfagnini, A. G., Rodd, F. H., Jeffers, K. B., & Bruce A. E. E. (2009). The effects of habitat complexity on aggression and fecundity in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Biology of Fishes, 86(3), 403–409. <https://doi.org/10.1007/s10641-009-9539-7>
- Castranova D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D. P., Best, J., Coscolla, J., Doherty A., Ramos, J., Hakkesteg, J., Wang, C., Wilson, C., Malley, J., & Weinstein B. M. (2011). The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish, 8(3), 141–146. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0688>
- Chen, J., Xiao, Y., Gai, Z., Li, R., Zhu, Z., Bai C., Tanguay R.L., Xu X., Huang C., Dong Q. (2015). Reproductive toxicity of low level bisphenol a exposures in a two-generation zebrafish assay: evidence of male-specific effects. Aquat. Toxicol., 169: 204–214.

- Chen, J., Xiao, Y., Gai, Z., Li, R., Zhu, Z., Bai, C., Tanguay, R.L., Xu, X., Huang, C., Dong, Q. (2015). Reproductive toxicity of low level bisphenol a exposures in a two-generation zebrafish assay: evidence of male-specific effects. *Aquat. Toxicol.* 169, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.020>.
- Chung, E., Genco, M.C., Megrelis, L., Ruderman, J.V. (2011). Effects of Bisphenol A and Triclocarban on Brain-Specific Expression of Aromatase in Early Zebrafish Embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 17732–17737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115187108>.
- Colin, A., Bach, C., Rosin, Ch., Munoz, J-F., Dauchy, X. (2013). Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-013-9942-0>.
- Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Williams, E.S. (2015). Brooks, B.W., 2015. Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose Response Int. J.*, 1e29.
- Czarny-Krzywińska, K., Krawczyk, B., Szczukocki, D. (2022). Toxicity of bisphenol A and its structural congeners to microalgae *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus armatus*. *Journal of Applied Phycology*, <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02704-3>
- Dahme, T., Katus, H. A., & Rottbauer, W. (2009). Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 2, Issues 1–2, pp. 18–22). <https://doi.org/10.1242/dmm.000687>
- Dai, Y.J., Jia, Y.F., Chen, N., Bian, W.P., Li, Q.K., Ma, Y.B., Chen, Y.L., Pei, D.S. (2014). Zebrafish as a Model System to Study Toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33, 11–17.
- Den Braver-Sewradj, S., van Spronsen, R., Hessel, E.V.S. (2020). Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Critical Reviews in Toxicology*, 50 2, 128-147.
- Directive 2020/2184 of the European Parliament and of the council of 16 Dec 2020 on the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union* 2020, 63, L435 1-84.
- Dolinoy, D.C., D. Huang, R.L. Jirtle. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 13056–13061.
- Duan, Z.; Zhu, L.; Zhu, L.; Kun, Y.; Zhu, X. Individual and Joint Toxic Effects of Pentachlorophenol and Bisphenol A on the Development of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008, 71, 774–780. <https://doi.org/10.116/j.ecoenv.2008.01.021>.
- Eaton, R. C., & Farley, R. D. (1974). Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory (Vol. 1974, Issue 1). <https://www.jstor.org/stable/1443023>
- ECHA - European Chemicals Agency. (2018). Inclusion of substances of very high concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV. Helsinki, Finlandia. 1., p.6.
- ECHA – European Chemicals Agency. ECHA and the Member States have assessed a group of 148 bisphenols and recommended that more than 30 bisphenols need to be restricted due to their potential hormonal or reprotoxic effects. Helsinki, 6 April 2022. Disponible en: <https://echa.europa.eu/es/-/group-assessment-of-bisphenols-identifies-need-for-restriction>, acceso en mayo de 2022.

- EFSA—European Food Safety Authority Bisphenol A. (2021). Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol> (acceso en octubre de 2021).
- EU Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, L 276: 33–79.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). Microplastics in fisheries and aquaculture Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. Fisheries And Aquaculture Technical Paper. Rome, 615, 1–147.
- Flint, S., T. Markle, S. Thomson, E. Wallace. (2012). Bisphenol A exposure effects and policy - a wildlife perspective. *J. Environ. Manag.*, 104: 19–34.
- Fu, P., Kawamura, K. (2010). Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ. Pollut.* 158, 3138–3143.
- Geens, T., H. Neels, A. Covaci. (2012). Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylophenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*, 87: 796–802.
- Gibert, Y., S. Sassi-Messai, J.B. Fini, L. Bernard, D. Zalko, J.P. Cravedi, P. Balaguer, M. Andersson-Lendahl, B. Demeneix, V. Laudet. (2011). Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. *BMC Dev. Biol.*, 11: p. 4.
- González, N., Cunha, S.C., Monteiro, J.O., Fernandes, C., Marquès, M., Domingo, J.L., Nadal, M. (2019). Quantification of eight bisphenol analogues in blood and urine samples of workers in a hazardous waste incinerator. *Environmental Research*. 176,108576
- Goto, Y.; Kitamura, S.; Kashiwagi, K.; Oofusa, K.; Tooi, O.; Yoshizato, K.; Sato, J.; Ohta, S.; Kashiwagi, A. Suppression of amphibian metamorphosis by bisphenol A and related chemical substances. *J. Health Sci.* (2006), 52, 160–168. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.160>.
- Grand View Research Bisphenol A Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Polycarbonates, Epoxy Resins) by Region, and Segment Forecasts, 2018–2025. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bisphenol-a-bpa-market> (acceso en diciembre de 2021).
- GraphPadPrism, version 9.0.0. (2020). GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA.
- Grumetto, L., Montesano, D., Seccia, S., Albrizio, S., Barbato, F. (2008). Determination of bisphenol A and bisphenol B residues in canned peeled tomatoes by reversedphase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 10633–10637.
- Hallare, A., K. Nagel, H.-R. Kohler, R. Triebkorn. (2005). Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Eco-toxicol Environ Saf.* 63 (3): 378–88.
- Hassan, Z. K., M. A. Elobeid, P. Virk et al. (2012). “Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, Article ID 194829, 6.
- He, J.H., J.-M. Gao, C.-J. Huang, C.-Q. Li. (2014). Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, 42: 35–42.
- Hill, A.J, Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*;86 (1):6–19.
- Hoekstra, E., C. Simoneau. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53: 386–402.

- Hong, Y.C., Park, E.Y., Park, M.S., Ko, J.A., Oh, S.Y., Kim, H., et al. (2009). Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicol Lett*;184:139–44.
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., van Doan, H., Spanò, N., & Faggio, C. (2018). Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish and Shellfish Immunology*, 83, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.046>
- Howe, D.G., Bradford, Y.M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K., Kalita, P., Mani, P., Martin, R., Moxon, S.T., Paddock, H., et al. (2017). The Zebrafish Model Organism Database: New Support for Human Disease Models, Mutation Details, Gene Expression Phenotypes and Searching. *Nucleic Acids Res.*, 45, D758–D768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1116>.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Infosan (International Food Safety Authorities Network). (2009). Bisphenol A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. INFOSAN Information Note, 5.
- Iso, T., T. Watanabe, T. Iwamoto, A. Shimamoto, Y. Furuichi. (2006). DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 206–210.
- Ji, K., S. Hong, Y. Kho, K. Choi. (2013). Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.*, 47: 8793–8800.
- Juan-García, A., & Gallego, C. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión (Vol. 32).
- Kabuto, H, M. Amakawa, T. Shishibori. (2004). Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci.*, 74 (24): 2931–40.
- Kamaraj M. et al. (2014). *International Biodeterioration & Biodegradation* 93, 216e222222.
- Kang, J. H., & Kondo, F. (2005). Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. *Chemosphere*, 60(9), 1288–1292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.058>
- Kang, J. H., Katayama, Y., & Kondo, F. (2006). Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. In *Toxicology* (Vol. 217, Issues 2–3, pp. 81–90). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.001>
- Kang, J.H., D. Asai, Y. Katayama. (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol.*, 37: 607–625.
- Kawagoshi., Y., Fujita, Y., Kishi, I., Fukunaga, I., (2003). Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *J. Environ. Monit.* 5, 269–274.
- Keri, R., S. Ho, P. Hunt, K. Knudsen, A. Soto, G. Prins. (2007). An evaluation evidence for carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*, 24: 240–252.
- Kim, S. S., Hwang, K. S., Yang, J. Y., Chae, J. S., Kim, G. R., Kan, H., Jung, M. H., Lee, H. Y., Song, J. S., Ahn, S., Shin, D. S., Lee, K. R., Kim, S. K., & Bae, M. A. (2020). Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model. *Chemosphere*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124751>.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. And Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.
- Kolatorova, L., Vitku, J., Hampl, R., Adamcova, K., Skodova, T., Simkova, M., Parizek, A., Starka, L., & Duskova, M. (2018). Exposure to bisphenols and parabens during pregnancy and relations to steroid changes. *Environmental Research*, 163, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.031>
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., Weismann, T. (2005). Effect of Bisphenol A on Maturation and Quality of Semen and Eggs in the Brown Trout, *Salmo Trutta f. Fario*. *Aquat. Toxicol.*, 75, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.004>.
- Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Trznadel, M., Trunkfield, L.a., Webster, T.M.U., van Aerle, R., Paull, G.C., Wilson, R.J., Mill, J., Santos, E.M. (2016). Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics* 2 11 (7), 526–538.
- Lam, S. H., M.M. Hlaing, X. Zhang, C. Yan, Z. Duan, L. Zhu, C.Y. Ung, S. Mathavan, C. N. Ong, Z. Gong. (2011). Toxicogenomic and phenotypic analyses of bisphenol-A early-life exposure toxicity in zebrafish. *PLoS ONE*, 6: e.28273.
- Lang, I.A, Galloway, T.S, Scarlett, A., Henley, W.E. (2008). Depledge M, Wallace RB, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*; 300:1303–10.
- Law, J.M. (2001). Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing. *ILAR J.*, 42 (4): 274–284.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269: 1–20.
- Lawrence, C., Best, J., James, A., & Maloney, K. (2012). The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 368–369, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.022>
- Lawrence, C., y Mason, T. (2012). Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality. In *ILAR Journal* (Vol. 53, Issue 2, pp. 179–191). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.179>
- Lee, H., Peart, T. (2000). Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Q. Res. J. Can.* 35, 283–298.
- Léger, C., L. Frémont, D. Marion, I. Nassour, M.-E. Desfarges. (1981). Essential fatty acids in trout serum lipoproteins, vitellogenin and egg lipids. *Lipids*, 16: 593 600.
- Lin, T.; Chen, Y.Q.; Chen, W. (2013). Impact of Toxicological Properties of Sulfonamides on the Growth of Zebrafish Embryos in the Water. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 36, 1068–1076. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.009>.
- Linbo, T. L. (2009). NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-100. Zebrafish (*Danio rerio*) husbandry and colony maintenance at the Northwest Fisheries Science Center.
- Lusher, A., P. Hollman, J. Mendoza-Hill. (2017). Microplastics in fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 65: p.125.
- Maclusky Nj, Hajszan T, Leranath C. (2005). The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect.*, 113 (6): 675–9.
- Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2005). Long-Term Effects of Fetal Exposure to Low Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A in the Female Mouse Genital Tract 1. *Biol. Reprod.*, 72, 1344–1351. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036301>.

- Mason, T. (2007). Chapter 3 - Embryonic and Larval Culture: Raising Larvae in a Nursery. Westerfield, M. The Zebrafish Book; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 5th Edition, University of Oregon Press. Eugene, Oregon, US.
- Matozzo, V., F. Gagné, M.G. Marin, F. Ricciardi, C. Blaise. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environ. Int.*, 34: 531–545.
- Matthews JL. (2004). Common diseases of laboratory zebrafish. *Methods Cell Biol* 77:617-643.
- Melzer, D., L. Harries, R. Cipelli, W. Henley, C. Money, P. McCormack, A. Young, J. Guralnik, L. Ferrucci, S. Bandinelli, A. Corsi, T. Galloway. (2011). Bisphenol A exposure is associated with *in vivo* estrogenic gene expression in adults. *Environ. Health Perspect.*, 119: 1788–1793.
- Mercea, P., (2009). Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *J. Appl. Polym. Sci.* 112, 579–593.
- Miao, S., Gao, Z., Kou, Z., Xu, G., Su, C., Liu, N., (2008). Influence of bisphenol a on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: a two-generational study. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 71, 1000–1008.
- Michałowicz, J. 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37: 738-758.
- Mihaich, E. M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A. T., Klecka, G. M., Dimond, S. S., Staples, C. A., Ortego, L. S., & Hentges, S. G. (2009). Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.02.005>
- Miura, T., C. Miura, T. Ohta, M.R. Nader, T. Todo, K. Yamauchi. (1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144: 5504–5510.
- Molina, A. M., N. Abril, N. Morales-Prieto, J.G. Monterdec, A.J. Lora, N. Ayala, R. Moyano. (2018). Evaluation of toxicological endpoints in female zebrafish after bisphenol A exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 112: 19–25
- Molina, A.M., A.J. Lora, A. Blanco, J.G. Monterde, N. Ayala, R. Moyano. (2013). Endocrine-active compound evaluation: qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-a exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 88: 155–162.
- Moon, M., M. Kim, I. Jung, Y. Koo, H. Ann, K. Lee, S. Kim, Y. Yoon, B.J. Cho, K. Park, H. Jang, Y. Park. (2012). Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Endocrinol. Nutr. Metabol.*, 27: 644–652.
- Moral, R. Wang, I., Russo, H., Lamartiniere, C.A., Pereira, J., Russo, J. (2008). Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature, *J. Endocrinol.* 196 101–112.
- Mourente, G. & J.M. Odriozola. (1990). Effects of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 8: 93-101.
- Mu, X., Y. Huang, X. Li, Y. Lei, M. Teng, X. Li, C. Wang, Y. Li. (2018). Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model. *Environ. Sci. Technol.*, 52: 3222–3231.
- Munguia-Lopez, E., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S., Soto-Valdez, H., (2005). Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit. Contam.* 22, 892–898.
- Muñoz-De-Toro, M.; Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2005). Perinatal Exposure to Bisphenol-A Alters Peripubertal Mammary

- Gland Development in Mice. *Endocrinology*, 146, 4138–4147. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0340>.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. In *Int. J. O., BioI* (Vol. 38).
- Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., Fushiki, S. (2006). Murine Neocortical Histogenesis Is Perturbed by Prenatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A. *J. Neurosci. Res.*, 84, 1197–1205. <https://doi.org/10.1002/jnr.21020>.
- Nam, S., Seo, Y., Kim, M., (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949–952.
- Namazi, M. R. (2009). “Cytochrome-P450 enzymes and autoimmunity: expansion of the relationship and introduction of free radicals as the link,” *Journal of Autoimmune Diseases*, vol. 6,4.
- Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Maruyama, T., Kim, S., & Tanaka, T. (2016). Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. In *Congenital Anomalies* (Vol. 56, Issue 1, pp. 18–27). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/cga.12142>
- Niu, Y., Zhang, J., Wu, Y., Shao, B. (2012). Analysis of bisphenol A and alkylphenols in cereals by automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6116–6122.
- Noyes, P.D., G.R. Garcia, R.L. Tanguay. (2018). Zebrafish as an *in vivo* model for sustainable chemical design. *Green Chem.*, 18 (24): 6410–6430.
- OECD, Guideline for testing of chemicals n°. 236. (2013). Fish embryo acute toxicity (FET) test Adopted, 26 July 2013.
- OECD, Guidelines for Testing of Chemicals n° 210. (2013). Fish. Early-life Stage Toxicity Test. Adopted 26 July; 2013.
- OECD, Guidelines for Testing of Chemicals n°. 229. (2012). Fish Short Term Reproduction Assay. Adopted 02 October 2012.
- OECD, Guidelines for Testing of Chemicals n°.234. (2011). Fish Sexual Development Test. Adopted 28 July 2011.
- Pant, J., & Deshpande, S. B. (2012). Acute toxicity of Bisphenol A in rats. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 50).
- Parnig C. (2005). *In vivo* zebrafish assays for toxicity testing. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 8:100–6.
- Parnig, C., Sengwl, C. Semino, P. Mcgrath. (2002). Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*, 1: 41–8.
- Pelayo, S., E. Oliveira, B. Thienpont, P.J. Babin, D. Raldua, M. Andre, B. Pina. (2012). Triiodothyronine-induced changes in the zebrafish transcriptome during the eleutheroembryonic stage: implications for bisphenol A developmental toxicity. *Aquat. Toxicol.*, 110: 114–122.
- Pereira, A.C., T. Gomes, M.R.F. Machado, T.L. Rocha. (2019). The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental Pollution*, 252: 1841-1853.
- PlasticsEurope—Association of Plastics Manufacturers Plastic—The Facts 2021: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. Available online: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2021> (acceso en abril 2022).

- Ramsay, J.M, Watral, V., Schreck, C.B., Kent, M.L. (2009). *Pseudoloma neurophilia* infections in zebrafish *Danio rerio*: Effects of stress on survival, growth, and reproduction. *Dis Aquat Organ* 88:69-84.
- Richter, C., L. Birnbaum, F. Farabollini, R. Newbold, B. Rubin, C. Talsness, J. Vandenberg, D. Walser-Kuntz, F. Saal. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.*, 24: 199–224.
- Rocha, S., Domingues, V., Pinho, C., Fernandes, V., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Mansilha, C. (2013). Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in Portuguese Rivers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 73–78.
- Rochester, J.R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.*, 42: 132-155.
- Rogers J.A., Luanne Metz, V. Wee Yong. (2013). Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology* 53, 421– 430.
- Rubin, B.S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34.
- Rudel, R., Camann, D., Spengler, J., Korn, L., Brody, J. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4543–4555.
- Santangeli, S., Consales, C., Pacchierotti, F., Habibi, H.R., Carnevali, O. (2019). Transgenerational Effects of BPA on Female Reproduction. *Sci. Total Environ.*, 685, 1294–1305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.029>.
- Sarria, A., J. Gallo, E. Perez. (2019). Bisphenol-A: A contaminant present in plastic containers. *Revista ITTPA*, 01 (01): 35-41.
- Schmidt, K.; Stachel, C.; Gowik, P. (2008). Development and In-House Validation of an LC-MS/MS Method for the Determination of Stilbenes and Resorcylic Acid Lactones in Bovine Urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1199–1210. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1943-x>.
- Schug, T., A. Janesick, B. Blumberg, J. Heindel. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127: 204–211.
- Schulz, R.W., França, L.R., Lareyre, J.-J., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390–411.
- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* (Vol. 149, Issue 2, pp. 187–195). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>
- Selderslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., Coen, W., Witters H. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28: 308–320.
- Shahidehnia, M. (2016). Epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals. *J. Environ. Anal. Toxicol.*, 6: p. 381.
- Shankar A, Teppala S. (2011). Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.*, 96:3822–6.
- Shankar A, Teppala S. (2012). Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *J Environ Public Health*, 481641.

- Shao, B., Han, H., Li, D., Ma, Y., Tu, X., Wu, Y., (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 105, 1236–1241
- Sharma, P., & Chadha, P. (2021). Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4738–4750. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.088>
- Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gragas, M., et al. (2001). Reproductive Effects of Long-Term Exposure to Bisphenol A in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, 35, 2917–2925. <https://doi.org/10.1021/es000198n>.
- Sotto, R.B D., Medriano, C.D., Cho, Y., Kim, H., Chung, I.Y., Seok, K.S., Song, K.G., Hong, S.W., Park, Y., & Kim, S. (2017). Sub-lethal pharmaceutical hazard tracking in adult zebrafish using untargeted LC–MS environmental metabolomics. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.009>
- Spence R, Ashton R, Smith C. (2007). Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour* 144:953-966.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 83(1):13-34. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x. Epub 2007
- Spence, R., Jordan, W. C., & Smith, C. (2006). Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Frontiers in Zoology*, 3. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-5>
- Spitsbergen, J. M. & M.L. Kent. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. *Toxicol Pathol.*, 31: 62–87.
- Sprague, J., L. Bayraktaroglu, D. Clements, T. Conlin, D. Fashena, K. Frazer, M. Haendel, D.G. Howe, P. Mani, S. Ramachandran, K. Schaper, E. Segerdell, P. Song, B. Sprunger, S. Taylor, C.E. Van Slyke, M. Westerfield. (2006). The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research*, 34: 581–585.
- Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O., Lepom, P., Reinckle, H., Sawal, G., Theobald, N., (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environ. Pollut.* 124, 497–504.
- Tayama, S., Y. Nakagawa, K. Tayama. (2008). Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat. Res.*, 649: 114–125.
- Tisler, T.; Krel, A.; Gerzelj, U.; Erjavec, B.; Dolenc, M. S. Pintar, A. (2016). Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environ. Pollut.*, 212: 472–479.
- Tse, W.K.F., B.HY. Yeung, H.T. Wan, C.K.C. Wong. (2013). Early embryogenesis in zebrafish is affected by bisphenol A exposure *Biology Open*, 2: 466–471.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., & Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 137(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00178-8)
- Uusi-Heikkilä, S., Wolter, C., Meinelt, T., Arlinghaus, R. (2010). Size-dependent reproductive success of wild zebrafish *Danio rerio* in the laboratory. *J Fish Biol* 77(3):552-569.
- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Arch Med Vet.*, 40: 115-123.

- van Den Bulck K, A. Hill, N. Mesens, H. Diekman, L. De Schaepdrijver, L. Lammens. 2011. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring. *Reprod Toxicol.*, 32: 213–9.
- van Der Ven, L.T., P.W. Wester, J.G. VOS. (2003). Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 908–913.
- Vandenberg, L., Chahoud, I., Heindel, J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F., Schoenfelder, G. (2012). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Cien. Saude Colect.*, 17: 407–434.
- Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021b). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. In *Science of the Total Environment* (Vol. 789). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148013>
- Vermeirssen, E. L. M., Dietschweiler, C., Werner, I., & Burkhardt, M. (2017). Corrosion protection products as a source of bisphenol A and toxicity to the aquatic environment. *Water Research*, 123, 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.006>
- Villeneuve, D. L., Garcia-Reyero, N., Escalon, B. L., Jensen, K. M., Cavallin, J. E., Makynen, E. A., Durhan, E. J., Kahl, M. D., Thomas, L. M., Perkins, E. J., & Ankley, G. T. (2012). Ecotoxicogenomics to support ecological risk assessment: A case study with bisphenol A in fish. *Environmental Science and Technology*, 46(1), 51–59. <https://doi.org/10.1021/es201150a>
- vom Saal, F. S. & W. V. Welshons. 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ. Res.*, 6: 100, 50–76.
- von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., & Braunbeck, T. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00398-3>
- Walker, C. (2007). Chapter 3 - Embryonic and Larval Culture: A Simple Method for Raising Babies. Westerfield, M. *The Zebrafish Book; A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5th Edition, University of Oregon Press. Eugene, Oregon, US.
- Wang T, Li M, Chen B, Xu M, Xu Y, Huang Y, et al. (2012). Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J Clin EndocrinolMetab*;97:E223–7.
- Wang, T.; Han, J.; Duan, X.; Xiong, B.; Cui, X.-S.; Kim, N.-H.; Liu, H.-L.; Sun, S.-C. (2016). The Toxic Effects and Possible Mechanisms of Bisphenol A on Oocyte Maturation of Porcine in Vitro. *Oncotarget*, 7, 32554.
- Watanabe, T., S. Ohhashi, A. Itoh, C. Kitajima, S. Fujita. (1984). Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Bull. Jap. Soc. Seient. Fish.*, 50: 503 515.
- Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book; A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5th Edition, University of Oregon Press. Eugene, Oregon, US.
- Wetherill, B., N. Fisher, A. Staubach, M. Danielsen, W. De Vere, R. White, K. Knudsen. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res.*, 65: 54–65.
- Wetherill, Y., B. Akingbemi, J. Kanno, J. Mclachlan, A. Nadal, C. Sonnenschein, C. Watson, T. Zoeller, S. Belcher. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.*, 24: 178–198.
- Wiegand, M.D. (1996). Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6: 259-286.

- Wilkie, M.P. (2002). Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges *J Exp Zool.* Aug 1;293(3):284-301.
- Wolstenholme, J.T.; Rissman, E.F.; Connelly, J.J. (2011). The Role of Bisphenol A in Shaping the Brain, Epigenome and Behavior. *Horm. Behav.*, 59, 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.001>.
- Xin, F.; Susiarjo, M.; Bartolomei, M.S. (2015). Multigenerational and Transgenerational Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: A Role for Altered Epigenetic Regulation? *Semin. Cell Dev. Biol.*, 43, 66–75.
- Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., & Strähle, U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 28, Issue 2, pp. 245–253). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.013>
- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 18, 69–75.
- Zahangir, M. M., Haque, F., Mostakim, G. M., & Islam, M. S. (2015). Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquaculture Reports*, 2, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.08.008>
- Zanuy, S. & Carrillo M. (1987). La reproducción de los peces teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: Espinosa de los Monteros J, Labarta U (eds). *Reproducción en acuicultura*. CAICYT. Madrid, España, p.1-131.
- Zhang, C., Guangming, Z., Li, Y., Jian, Y., Jianbing, L., Guohe, H., Beidou, X., Hongliang, L., (2007). Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere* 68, 181e190.
- Ziv-Gal, A., C. Zeliann, W. Wang, J. Flaws. (2013). Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially *via* the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reprod. Toxicol.*, 42: 58–67.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.