

Tesis Doctoral

Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol

Rey Vázquez, Graciela

2012-06-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rey Vázquez, Graciela. (2012-06-28). Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rey Vázquez, Graciela. "Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-06-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros
hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei,
Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor: Lic. Graciela Rey Vázquez

Director: Dra. Graciela Alicia Guerrero

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecotoxicología Acuática
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol.

Resumen

En el presente trabajo se analizó primeramente la espermatogénesis y el ciclo reproductivo anual del pez *Cichlasoma dimerus*, un perciforme representativo de la ictio-fauna de la Cuenca del Río de La Plata. Los estudios realizados con microscopía óptica y electrónica permitieron determinar que los testículos pertenecen al tipo lobular irrestricto. La espermatogénesis es de tipo cística y se estudiaron las características de los distintos estadios de las células germinales durante este proceso, desde espermatogonia hasta espermatozoide. Los espermatozoides en esta especie corresponden a la categoría acuasperma anacrosomal tipo I y se determinó que son biflagelados, carácter excepcional entre los cíclidos. Se estableció que la estación de alta actividad reproductiva se extiende a lo largo de siete meses (desde septiembre hasta marzo) durante los cuales las puestas tienen lugar cada $29,4 \pm 16,2$ días. Se describieron los cambios del epitelio germinal a lo largo de todo el año, estableciéndose cinco clases reproductivas: proliferación, maduración temprana, media y tardía (final) y regresión. Además, se caracterizaron a nivel óptico y electrónico los distintos tipos celulares de la sangre y se determinaron los valores de referencia de los índices hematológicos (RGR, RGB, HTC, Hb, VCM, HCM, CHCM) de esta especie bajo condiciones estandarizadas. En una segunda etapa, utilizando métodos semiestáticos se evaluó el efecto de la exposición de *C. dimerus* a concentraciones subletales de octilfenol (OF), uno de los surfactantes más comúnmente utilizado, que puede contaminar el ambiente acuático. Se determinó en primer lugar la toxicidad aguda del compuesto y posteriormente, se realizaron ensayos de exposición subcrónica. Se observó que el OF tiene acción estrogénica consistente en la inducción de la síntesis de Vtg y daño en la morfología testicular que determina la infertilidad de los machos de esta especie. Por otra parte, produce estrés hemodinámico que lleva a anemia normocrómica, normocítica, con un aumento significativo de eritroblastos y presencia de eritrocitos amitóticos como patología eritrocítica. Todos los efectos resultaron ser dependientes de la concentración y reversibles tras un proceso de depuración.

Palabras clave: Teleósteos, Perciformes, Cíclidos, espermatogénesis, ciclo reproductivo anual, hematología, histología, toxicidad aguda, ecotoxicología, alteradores endocrinos.

Spermatogenesis, annual reproductive cycle and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Effect of the exposure to 4-tert-octylphenol.

Abstract

The first step in the present study was the analysis of spermatogenesis and annual reproductive cycle in *Cichlasoma dimerus*, a typical perciform of the Río de la Plata basin ichthyofauna. The studies performed under light and electron transmission microscopy revealed that the testicular structure corresponds to an unrestricted lobular type. Spermatogenesis is of cystic type and the characteristics of the different stages of the germ cells during this process, from spermatogonia to spermatozoa, were studied. Sperm in this species correspond to the anacrosomal type I aquasperm and they are biflagellate, an exceptional character among cichlids. It was established that the season of highest reproductive activity extends over seven months, from September to March, during which spawning took place on average every 29.4 ± 16.2 days. The changes that occur in the germinal epithelium throughout the year were described, determining five reproductive classes: proliferative, early, mid-, and late maturation and regression. The different blood cell types were characterized under light and electron microscopy, and reference values of the hematological indexes (RBC, WBC, HCT, Hb, MCV, MCH, MCHC) were determined for this species under standardized conditions.

In a second step, under semistatic conditions, the effects of exposure of *C. dimerus* to sublethal concentrations of octylphenol (OP), one of the surfactants most widely used that can pollute the aquatic environment, were evaluated. First, the acute toxicity of OP was assessed, and afterwards subchronic essays were performed. It was observed that OP acts as a xenoestrogen, since there was Vtg synthesis in males and testicular damage which determined infertility. Besides, it produces hemodynamic stress that leads to normochromic and normocytic anemia, a significant increase of erythroblasts and amitotic erythrocytes as erythrocytic pathology. All effects were concentration-dependent and reverted after a depuration process.

Keywords: Teleosts, Perciforms, Cichlids, spermatogenesis, annual reproductive cycle, haematology, histology, acute toxicity, ecotoxicology, endocrine disrupting compounds.

Abreviaturas

ABC, complejo avidina-biotina

AFs, alquilfenoles

AFEs, alquilfenoles polietoxilados

AMH, factor inhibidor Mülleriano

CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media

cL, célula de Leydig

CL50, concentración letal 50

cS, célula de Sertoli

DAB, 3,3-diaminobencidina

DB, dot blot

DHP, progestina (17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona)

Dmc1, marcador específico de meiosis

DPX, nombre comercial de una resina sintética

EDCs, químicos disruptores endocrinos

E2, estradiol

EG, epitelio germinal

eSRS34, homólogo del factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas de mamíferos-PD-ECGF-

FgB y **FgG**, fibrinógenos

FSH, hormona folículo estimulante

FSHR, receptores para FSH

GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas

GSDF, factores de crecimiento y diferenciación

Hb, hemoglobina

HCM, hemoglobina corpuscular media

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

hsp90, proteína de choque térmico 90

HTC, hematocrito

IGF1, factor de crecimiento insulínico 1

IGS, índice gonadosomático

LH, hormona luteinizante

LHR, receptores para LH
MET, microscopía electrónica de transmisión
MO, microscopía óptica
NF, nonilfenol
OF, 4-tert-octilfenol
11-KT, 11-cetotetosterona
PAS, reacción del ácido peryódico
PBS, buffer fosfato salino
PCNA, antígeno nuclear de proliferación celular
PD-ECGF, factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas de mamíferos
PMS,F fenilmetilsulfonil fluoruro
RE, receptor de estógenos
REL, retículo endoplasmático liso
RGB, recuento de glóbulos blancos
RGR, recuento de glóbulos rojos
SDS/PAGE, gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio
SHBG, globulinas fijadoras o transportadoras de hormonas esteroideas
SPCI, espermatocono I
SPCII, espermatocono II
SPD, espermátida
SPGA, espermatoconia A
SPGB, espermatoconia B
Spo11, marcador específico de meiosis
SPZ, espermatozoide
TGF β , superfamilia de los factores de crecimiento transformante β
TTBS, buffer Tris Tween salino
VCM, volumen corpuscular medio
Vtg, vitelogenina
WB, Western blot

Índice

Resumen.....	I
Abstract.....	III
Índice.....	IV

Introducción general.....	1
<i>Los peces y su ambiente.....</i>	<i>2</i>
<i>Los disruptores endocrinos.....</i>	<i>5</i>
<i>Cichlasoma dimerus como modelo biológico.....</i>	<i>8</i>

Capítulo I.....	11
------------------------	-----------

Sección A.....11

Espermatogénesis y cambios en la estructura testicular durante el ciclo reproductivo de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes).

Introducción.....	12
<i>Espermatogénesis.....</i>	<i>12</i>
<i>Tipos de testículos.....</i>	<i>15</i>
<i>Ciclo reproductivo anual.....</i>	<i>18</i>
<i>Hipótesis.....</i>	<i>20</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>20</i>
Materiales y métodos.....	21
Resultados.....	24
<i>Estructura testicular.....</i>	<i>24</i>
<i>Compartimento germinal.....</i>	<i>26</i>
<i>Compartimento intersticial.....</i>	<i>34</i>
<i>Actividad reproductiva y cambios en el epitelio germinal.....</i>	<i>34</i>
Discusión.....	44

Sección B.....51

Efectos de la exposición al xenobiótico 4-tert-octilfenol sobre machos adultos de *Cichlasoma dimerus*

Introducción	88
<i>La sangre de los peces</i>	88
<i>Los elementos figurados</i>	88
<i>Los parámetros hematológicos</i>	89
<i>Hipótesis</i>	91
<i>Objetivos</i>	91
Materiales y métodos	91
Resultados	96
<i>Caracterización de los tipos celulares</i>	96
<i>Análisis hematológico</i>	100
Discusión	100
Sección B	
Cambios hematológicos inducidos por xenobiótico en <i>Cichlasoma dimerus</i>	
Introducción	112
<i>Hipótesis</i>	113
<i>Objetivos</i>	114
Materiales y métodos	114
Resultados	115
Discusión	118
 Anexos	 122
 Conclusiones	 127
 Bibliografía	 129

*Para que pueda ser he de ser otro,
salir de mí, buscarme entre los otros,
los otros que no son si yo no existo,
los otros que me dan plena existencia.*

Octavio Paz

A todos los que me acompañaron estos años

Gracias

Para mis amores

Gerardo

Paula

Sofía

... y Timoteo

Introducción general

Los peces y su ambiente

Los peces, como otras formas de vida, tienen un inmenso valor para los seres humanos. Desde siempre representan un alimento básico para muchos pueblos. Además, hoy son un elemento importante en la economía de muchas naciones que practican la pesca comercial, presentando además valor recreativo para naturalistas, pescadores y acuaristas. Por lo tanto, muchas instituciones gubernamentales se interesan en el estudio de su biología y de sus formas de reproducción.

Bajo el término “peces” se incluyen tres grupos de vertebrados: los Agnatha, peces primitivos sin mandíbula; los Chondrichthyes, peces cartilagosos y los Osteichthyes, peces óseos (Langeland y Kimmel, 1997).

La mayoría de los vertebrados vivientes son los peces óseos. El primer fósil conocido del grupo es un conjunto de pequeñas escamas imbricadas que datan del Silúrico tardío (Kardong, 1997). Los osteictios están bien representados desde el Devónico temprano y su radiación tuvo un completo florecimiento hacia la mitad de dicho período, con la divergencia de dos grupos principales: los peces con aletas radiadas, los Actinopterygii y los peces con aletas lobuladas los Sarcopterygii (Pough y col., 1999). Este último grupo, aunque es el más pequeño, es muy importante en relación con la historia de los vertebrados, ya que dio origen a los tetrápodos y sus descendientes. El grupo más representativo de los Actinopterygii es el de los teleósteos, integrado por más de 20.000 especies vivientes (Fig. 1). Uno de los hechos claves en la evolución de este grupo es la especialización en los mecanismos de alimentación. Una flexibilidad creciente de los huesos del cráneo y las mandíbulas permitió, en particular a los peces con aletas radiadas, explotar un amplio rango de tipos de presas y modos de predación. Las especializaciones de los peces óseos en cuanto a locomoción, comportamiento e historia de vida han acompañado la especialización del mecanismo de alimentación. A pesar de su amplia radiación evolutiva, existen características embriológicas básicas que son compartidas entre todos los peces al igual que con el resto de los vertebrados. Dados estos caracteres compartidos y su posición basal en el linaje de los vertebrados, los peces resultan particularmente apropiados como modelos para estudios de numerosos aspectos del desarrollo de los vertebrados (Langeland y Kimmel, 1997).

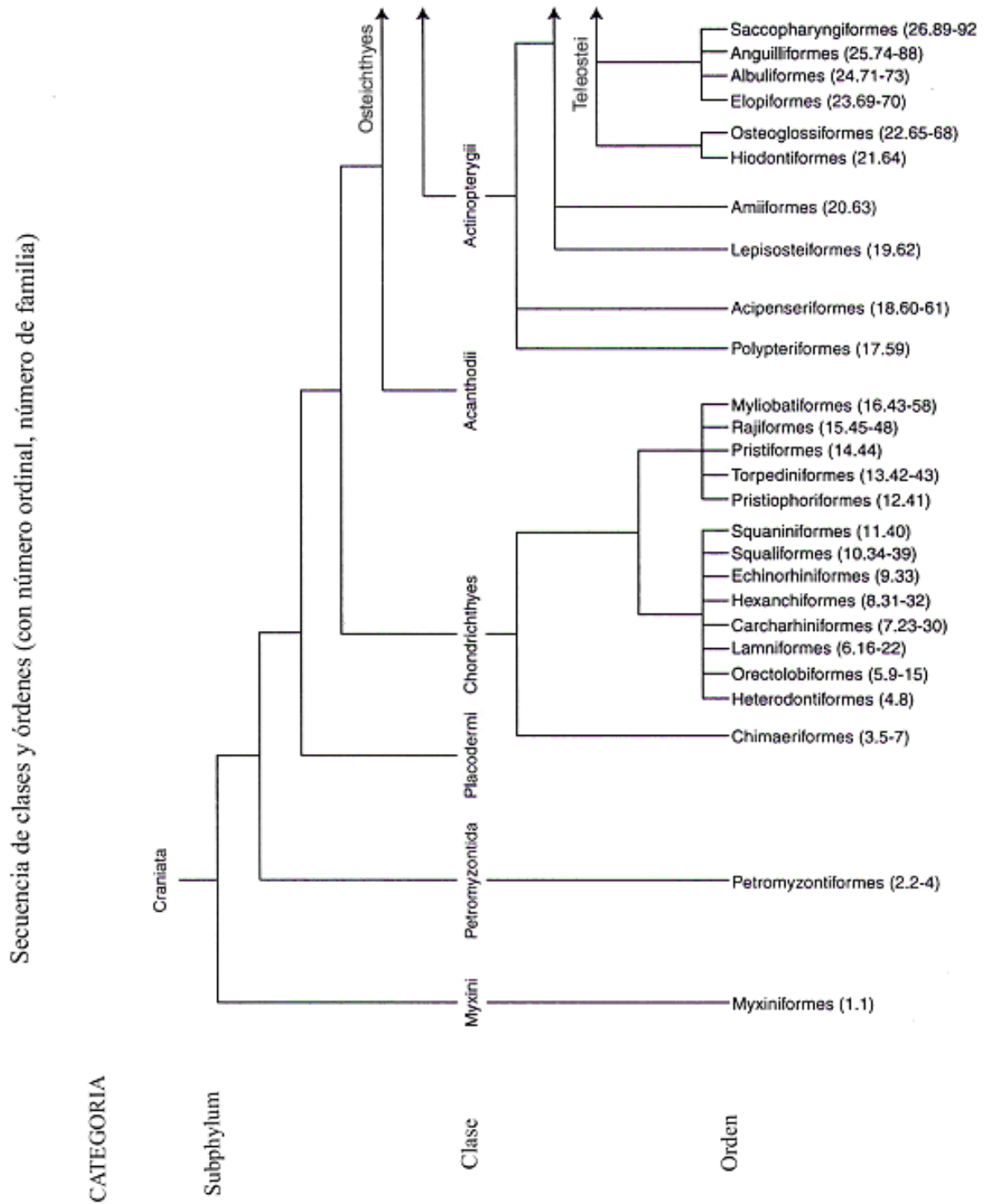


Fig. 1. Árbol filogenético de los peces (Modificado de Nelson, 2006)

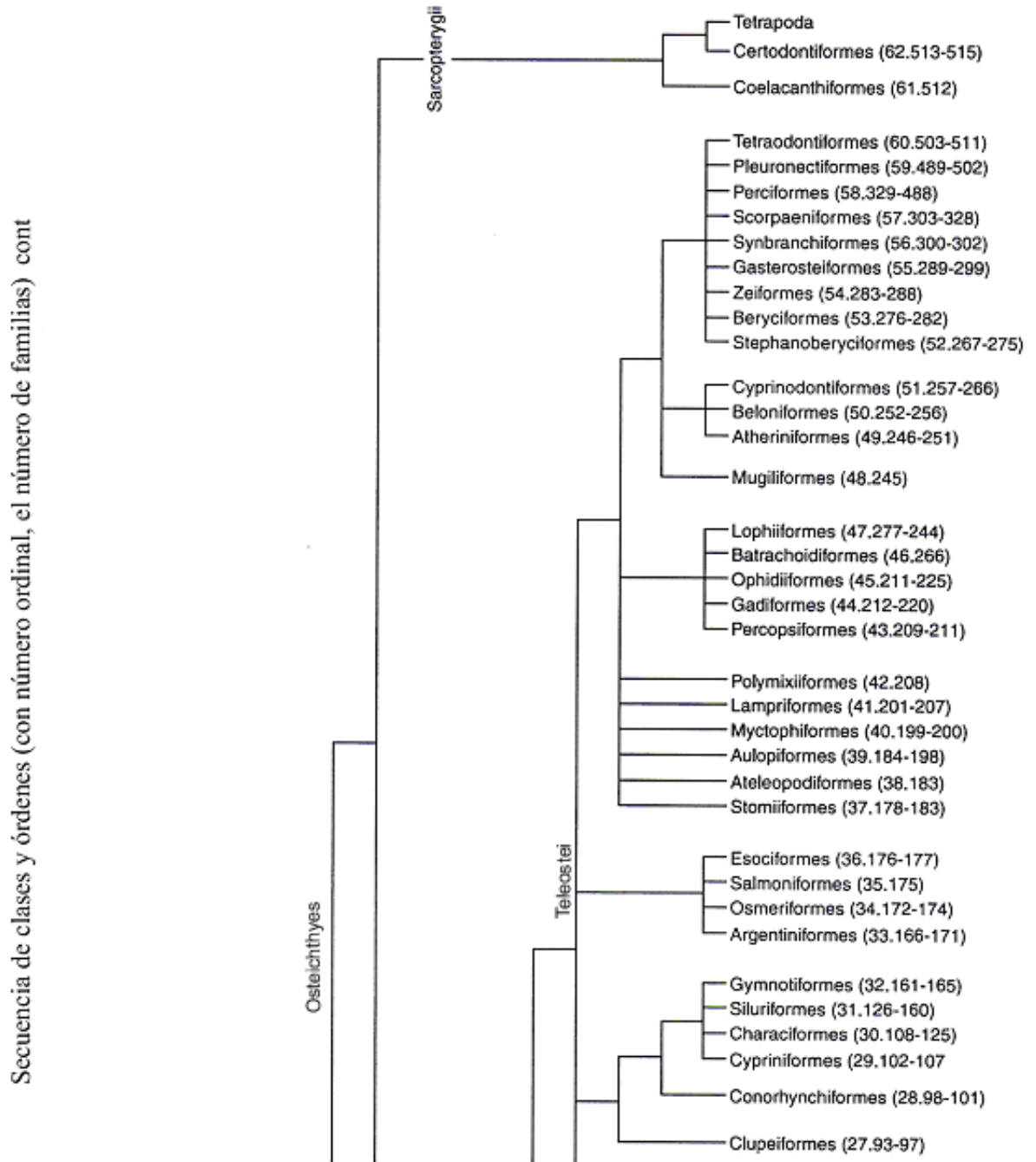


Fig. 1 (cont.). Árbol filogenético de los peces (Modificado de Nelson, 2006)

La forma del cuerpo, el comportamiento, la función mecánica y la fisiología de los peces óseos están íntimamente relacionados con las características del hábitat acuático y con las propiedades del agua como un medio ambiente para la vida (Pough y col., 1999). El medio acuático presenta cierta fragilidad, que deriva, entre otras razones, del elevado poder disolvente de una amplia gama de productos de desecho, a la vez que es un vehículo excelente para la evacuación de materiales de muy diversa índole. Las aguas continentales se convierten en el principal medio a través del cual se realiza el drenaje de los restos de degradación ocasionados bien por causas naturales o por causas antropogénicas, como productos de las actividades humanas (Capó Martí, 2007). Por ello, las distintas especies de peces, entre otras, son utilizadas como bioindicadores generales de contaminación, en parte para beneficio directo de los humanos contribuyendo a mejorar su bienestar y en parte para compatibilizar el progreso económico y la protección del medio ambiente, patrimonio de la humanidad (Nelson, 2006).

Los disruptores endocrinos

Dada su actividad biológica y su presencia en el ambiente, una serie de sustancias químicas, llamadas comúnmente compuestos disruptores endocrinos (EDCs), preocupan por su impacto potencial en el ecosistema y la salud humana (Ying y col, 2002). Un EDC ha sido definido como una sustancia o mezcla que altera la función del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos en la salud de un organismo, su progenie o en la población (Lister y Van Der Kraak, 2001). El término es aplicado a un amplio rango de compuestos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas naturales del cuerpo, que regulan la homeostasis, reproducción, desarrollo y comportamiento (Nishi y col., 2002).

Una gran variedad de contaminantes pueden estar presentes en las aguas de desecho industriales y domésticos y ser recibidos por el ambiente. Estos incluyen pesticidas, residuos de detergentes, estrógenos naturales y sintéticos, entre muchos otros. En particular, los alquilfenoles etoxilados (AFEs) son uno de los tipos de tensioactivos más ampliamente utilizados. Son empleados en la elaboración de detergentes domésticos, pesticidas formulados y se aplican en diversos procesos industriales. Una molécula de AFE consiste de dos partes: el alquilfenol (AF) y el grupo etoxilado (EO). La degradación primaria de los AFEs en plantas de tratamiento de agua de desecho o en el ambiente genera

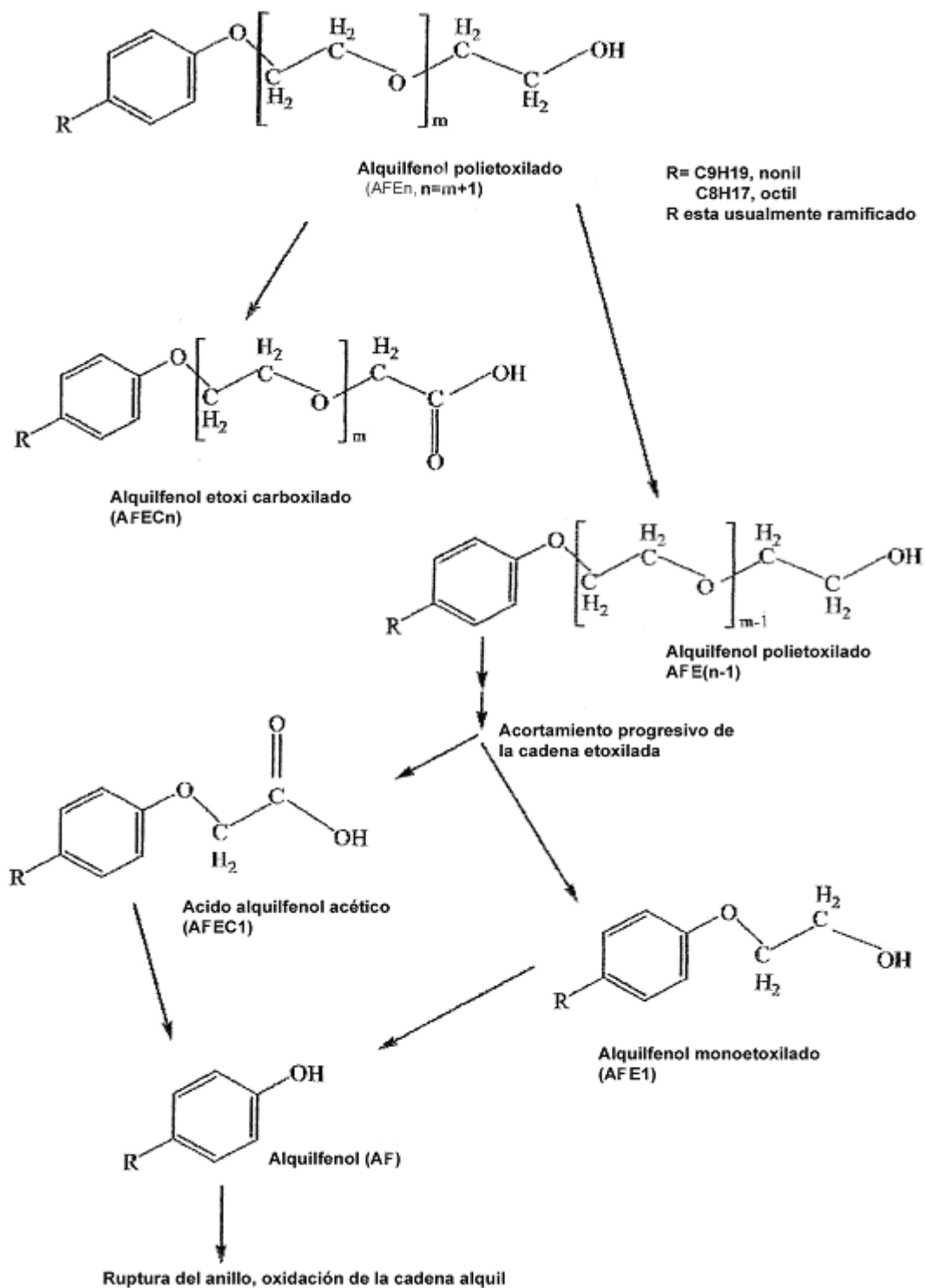


Fig. 2. Camino de degradación de AFE (Modificado de Ying y col., 2002)

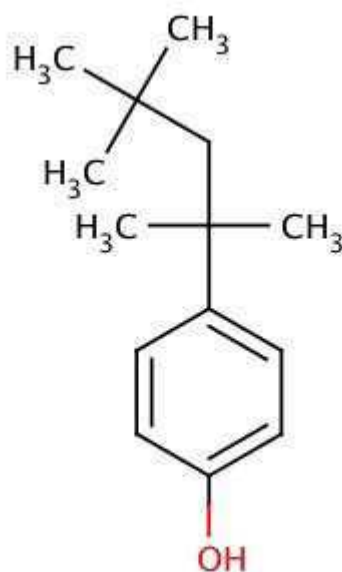


Fig. 3. Estructura del 4-tert-octilfenol

AFEs de cadena más corta, más persistentes y AFs (Fig. 2). Los dos surfactantes más comunes en el mercado son el nonilfenol etoxilado (NFE) y el octilfenol etoxilado (OFE) (Fig.3). Algunos estudios han demostrado que los metabolitos de los AFE son más tóxicos que las sustancias que los originaron y poseen la capacidad de imitar a los estrógenos naturales por interactuar con sus receptores (Jobling y Sumper 1993; Jobling y col. 1996, Renner, 1997). A estos compuestos químicos que pueden producir los mismos efectos que los estrógenos endógenos, se los denomina xenoestrógenos. Los niveles de AFEs presentes en el ambiente, pueden inducir alteraciones endocrinas en los organismos silvestres y en los seres humanos.

Estudios de laboratorio han demostrado que la exposición de peces machos a compuestos alquilfenólicos produce la inducción de vitelogenina (Vtg), una proteína producida por el hígado de las hembras maduras, por acción del 17β -estradiol, así como inhibición de la espermatogénesis, anormalidades del testículo y formación de gónadas intersexo. Otros efectos reportados incluyen cambios en los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y esteroides sexuales y descenso de la fecundidad y tasa de eclosión (White y col.,1994; Sumpter y Jobling, 1995; Jobling y col., 1996; Gray y Metcalfe, 1997; Christiansen y col.,

1998; Gronen y col., 1999; Kinnberg y col., 2000; Folmar y col., 2001; Metcalfe y col., 2001; Van den Belt y col., 2001; Knörr y Braunbeck, 2002; Kang y col., 2003; Rasmussen y Korsgaard, 2004; Rasmussen y col., 2005).

Cichlasoma dimerus como modelo biológico

Ubicación taxonómica:

Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata (Craniata)
Superclase Gnathostomata
Clase Actinopterygii
Subclase Neopterygii
División Teleostei
Subdivisión Euteleostei
Superorden Acanthopterygii
Serie Percomorpha
Orden Perciformes
Suborden Labroidei
Familia Cichlidae
Género *Cichlasoma*
Especie *C. dimerus*

El Orden Perciformes es el más diverso de todos los órdenes de peces (Fig. 1). La mayoría son marinos y son los vertebrados dominantes en los océanos. Casi el 21% son dulceacuícolas y también mayoritarios en diversos cuerpos de agua dulce tropicales y subtropicales. La familia Cichlidae es segunda en diversidad de especies del orden. Comprende peces de agua dulce y salobre localizados en América Central y del Sur (una especie se extiende al N de Texas), India occidental, África, Madagascar, Israel, Siria, la costa de India y Sri Lanka. Como en muchas familias, hay una gran variabilidad en la forma del cuerpo entre especies. La mayoría de los cíclidos tienen un cuerpo comprimido. Forman un grupo de relativamente gran importancia como peces de acuario y distintas especies como la tilapia *Oreochromis niloticus*, para acuicultura extensiva. Las especies de

la familia tienen comportamientos de cría altamente organizados. Se pueden reconocer dos formas de cuidado parental: los incubadores bucales, generalmente polígamos, en los que usualmente sólo la hembra cuida los huevos y las larvas recién eclosionadas en el interior de la boca; y los incubadores de sustrato, que son típicamente monógamos y ambos sexos pueden cuidar a los huevos y las crías. Unas pocas especies combinan ambos métodos (Nelson, 2006).



Fig. 4. Ejemplar adulto de *C. dimerus*. Barra: 1 cm.

El cíclido Sudamericano *C. dimerus* (Haeckel, 1840), vulgarmente conocido como chanchita (Fig. 4), es muy común en aguas calmas y poco profundas de Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina y Uruguay. Vive en parejas que defienden su territorio y presentan fuertes interacciones sociales. Alonso y col. (2011), observaron una jerarquía de dominancia que determina el acceso a territorios reproductivos entre los machos. Esto hace que se describan en esta especie distintos estatus sociales establecidos a través de interacciones agresivas. Establecidas las parejas, las hembras liberan los oocitos sobre un sustrato, el macho los fecunda, ambos padres ventilan a estos huevos y a los jóvenes alevinos una vez que comienzan a nadar libremente. Antes de cada puesta, ambos padres

presentan un comportamiento de prepuerta o cortejo, el cual está compuesto por un número de diferentes actividades característicamente estereotipadas (Polder, 1971).

C. dimerus es un pez de tamaño mediano que puede alcanzar los 13 cm de longitud total. El cuerpo es oval y comprimido. Las aletas pélvicas, dorsal y anal terminan en punta. Si bien no presentan un marcado dimorfismo sexual, los machos suelen ser de mayor tamaño y presentar el borde distal de las aletas dorsal, anal y pélvicas extendido en filamentos. El borde posterior de la aleta caudal es redondeado. La coloración de fondo es verde oliva. Cuentan con una banda horizontal negra que se extiende desde la zona post-orbital hasta el pedúnculo caudal. Se destacan dos manchas características, una de estas marcas forma parte de la banda horizontal aunque es más alta que ésta, y la segunda está situada en la mitad superior del pedúnculo caudal. También presentan leves bandas transversales (Fig. 4).

Por su tamaño, porque se adapta cómodamente al cautiverio, se reproduce con facilidad y presenta una tasa de supervivencia aceptable, *C. dimerus* resulta una especie apta como modelo para estudios de laboratorio, incluyendo estudios ecotoxicológicos (Domitrovic, 1997; Hirt y Domitrovic, 2002). Esto ha llevado a su inclusión en la norma IRAM 29112 como una de las especies autóctonas propuestas para realizar ensayos tendientes a determinar la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce (IRAM 29112, 2008).

Capítulo I Sección A

Espermatogénesis y cambios en la estructura testicular durante el ciclo reproductivo de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes).

Introducción

El comportamiento de los peces es tan diverso como su morfología (Nelson, 2006). Esta diversidad se ve también reflejada en las diferentes estructuras gonadales, las estrategias reproductivas y los modos de cuidado parental encontrados en este grupo (Nagahama, 1983; Pudney, 1995, 1996; Nakatani y col. 2001).

A pesar de la gran variabilidad de estrategias reproductivas presentes, la organización básica del testículo de los peces está notablemente conservada. Los testículos están envueltos por una capa de tejido conectivo llamada cápsula testicular y como ocurre en otros vertebrados, estos órganos están constituidos por el compartimento germinal y el intersticial, ambos separados por una membrana basal. El primero comprende un epitelio seminífero compuesto por las células germinales y las células somáticas, células de Sertoli. El segundo, está compuesto por tejido conectivo que contiene las células esteroideogénicas (células de Leydig), fibroblastos, fibras colágenas, células mioides, células sanguíneas, vasos sanguíneos y fibras amielínicas (Grier, 1993; Cinquetti y Dramis, 2003; Lo Nostro y col, 2004; Grier y Uribe Aranzabal, 2009).

Espermatogénesis

Es un proceso que consiste en dos etapas proliferativas (renovación de las células madre y proliferación mitótica de las espermatogonias), seguidas por meiosis y espermiogénesis, durante la cual las espermátidas haploides se transforman en espermatozoides, vectores genómicos flagelados móviles (Nóbrega y col., 2009; Schulz y col., 2009). De este modo, un pequeño número de células madre espermatogoniales diploides, producen espermatozoides altamente diferenciados que contienen un genoma haploide recombinado. El conocimiento sobre la espermatogénesis en peces está limitado a unas pocas especies utilizadas en investigación básica y/o biotecnología-acuicultura (por ejemplo: bagre, bacalao, anguila, lebistes, medaka, salmón, tilapia, trucha y pez cebra) (Schulz y col., 2009).

En vertebrados amniotas, una célula de Sertoli contacta a miembros de diferentes cohortes de células germinales que se encuentran en distintos estadios de la espermatogénesis; cada

célula germinal tiene una vasta área de contacto con la superficie de la célula de Sertoli. Evidentemente el número de células germinales que hospeda una célula de Sertoli es finito y por lo tanto es limitante para la producción de espermatozoides. En anamniotas, por otro lado, todos los miembros de una cohorte proveniente de una célula germinal dada están agrupados en un espermatocisto limitado por un número de células de Sertoli (espermatogénesis cística). Estas células de Sertoli constituyen entonces el soporte estructural y funcional de una única cohorte de células germinales en un tiempo determinado y la separa de otras que frecuentemente están en otros estadios del desarrollo (Nóbrega y col., 2009). Por lo tanto, en los peces teleósteos, la espermatogénesis ocurre dentro de espermatocistos, clones sincrónicos de células germinales que maduran rodeadas por procesos de las células de Sertoli (Callard, 1991; Grier, 1993; Schulz y col., 2009).

Las células madre espermatogoniales proliferan y tienen la capacidad de autorenovarse dando nuevas espermatogonias A, así como de diferenciarse en espermatogonias B, conminadas a dar espermatozoides (De Rooij y Russell, 2000). Las espermatogonias sufren un número específico de ciclos celulares mitóticos (por ejemplo: 14 en lebistes, Billard, 1969; 10 en anguila japonesa, Miura y col., 1991a). La última generación de espermatogonias B, emerge del final de la mitosis y entra en meiosis pasando a ser un espermatocito primario en etapa de preleptonema. Ellos llevan un set duplicado del genoma en una dilatada profase de la primera división meiótica. En esta primera división se separan los cromosomas homólogos y producen espermatocitos secundarios haploides de vida corta, que rápidamente avanzan a través de la segunda división meiótica dando espermátidas. Estas espermátidas se diferencian en espermatozoides mediante el proceso de reestructuración celular llamado espermiogénesis, que involucra entre otros eventos, el empaquetamiento de la cromatina y la formación del flagelo.

Debido a la citoquinesis incompleta, las células resultantes de las divisiones celulares permanecen interconectadas por puentes citoplasmáticos que se conservan hasta espermátidas y son responsables del desarrollo sincrónico de las células germinales (Fig. 5).

Mattei (1970) diferenció, inicialmente para la serie Percomorpha, dos tipos de espermatozoides anacrosomales uniflagelados, que luego fueron encontrados en otros

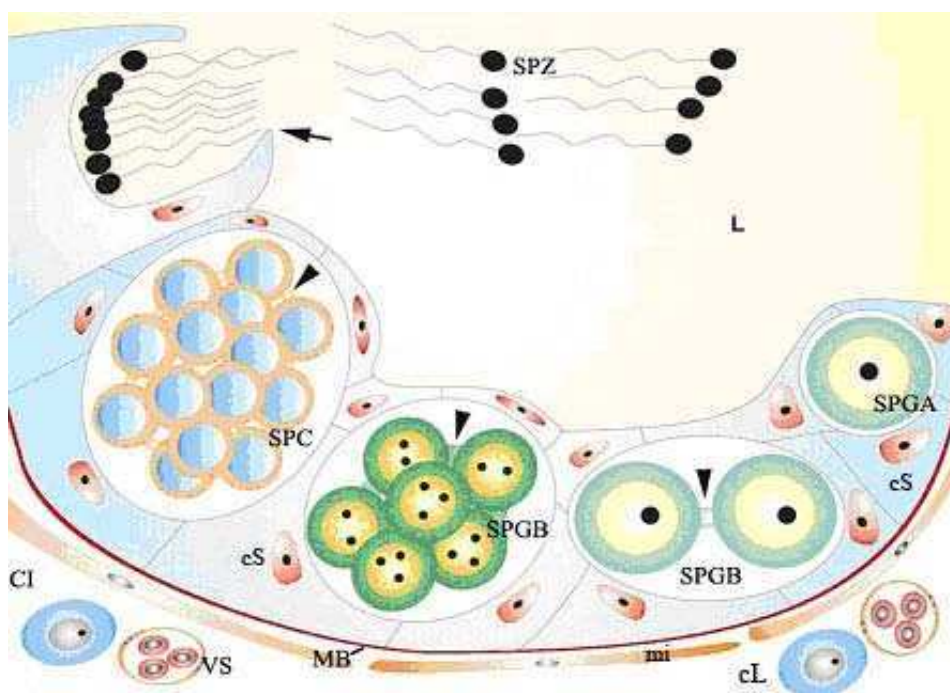


Fig. 5. Esquema de la sección transversal de un lóbulo espermatogénico de testículo de peces. Se muestra la relación entre las células germinales y las células de Sertoli en la espermatogénesis cística. El epitelio germinal presenta células de Sertoli (cS) y células germinales, está delineado por una membrana basal (MB) y células mioideas (mi). Se representan espermatogonias A (SPGA) y espermatogonias B (SPGB); espermatocitos (SPC) y espermatozoides (SPZ) que salen a la luz del lóbulo (L) por la apertura del espermatocisto (flecha). Nótese la presencia de puentes citoplasmáticos a partir de SPGB (punta de flecha). En el compartimento intersticial (CI) se esquematizan: células intersticiales de Leydig (cL) y vasos sanguíneos (VS) (Tomado de Nobrega, y col., 2009).

órdenes (Anexo I). El espermatozoide tipo 1, típico espermatozoide de Neopterygii, presenta cabeza redondeada u oval y se caracteriza porque el eje flagelar resulta perpendicular a la base del núcleo. En contraposición el tipo 2, en el que el eje flagelar permanece paralelo a la base del núcleo (Fig. 6). Este segundo tipo de espermatozoides se encuentra exclusivamente en los Acanthopterygii y sólo en el orden Perciformes se identificó en 25 de las 39 familias investigadas (Mattei y col., 1979; Mattei, 1988).

Jamieson y Leung en 1991, basados en las descripciones realizadas en numerosas especies, clasificaron a los espermatozoides en las siguientes categorías:

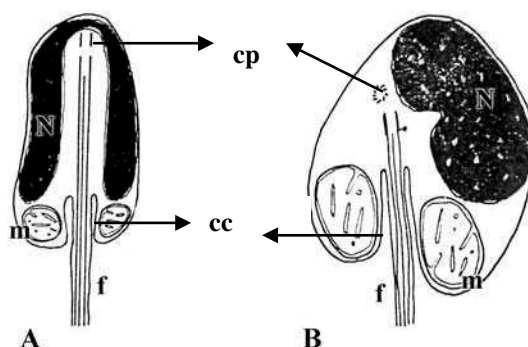


Fig.6. Cortes longitudinales de espermatozoides de tipo acuaspermas anacrosomales uniflagelados tipo 1 (A) y tipo 2 (B) según Mattei (1970), ejemplificados con *Upeneus prayensis* el tipo 1, que presenta una fosa nuclear muy profunda y con *Parapristipoma octolineatum* el tipo 2. cc, canal citoplasmático; cp, centriolo proximal; f, flagelo; m, mitocondrias; N, núcleo (Modificado de Jamieson, 1991).

- 1.- Acuasperma: esperma liberado al agua, siempre en especies de fecundación externa.
 - a) Acuasperma acrosomal: con acrosoma.
 - b) Acuasperma anacrosomal: acrosoma ausente (coexistente con un oocito con micropilo).
 - i. Uniflagelado
 - ii. Biflagelado
 - iii. Aflagelado
- 2.- Intrasperma: no se libera al agua, se da en especies con fecundación interna.
 - a) Intrasperma acrosomal: con acrosoma.
 - b) Intrasperma anacrosomal: acrosoma ausente.

De acuerdo con estos autores, el acuasperma anacrosomal uniflagelado es el patrón básico para los espermatozoides de los teleósteos.

Tipos de testículos

El arreglo del epitelio germinal varía entre los osteictios. En los taxones de aparición temprana se describe un testículo llamado tubular anastomosado constituido por lóbulos que forman rulos en la periferia del testículo y se conectan entre sí conformando un

sistema de aspecto muy irregular (Fig. 7A). La cápsula testicular está bien desarrollada y los espermatocistos no guardan un ordenamiento sino que están mezclados y se pueden encontrar espermatocistos con distintos estadios de la espermatoogénesis a cualquier altura del lóbulo. Los teleosteos de aparición tardía, incluyendo los Atherinomorpha, exhiben un testículo lobular. En él se observan “ramas”, como proyecciones redondeadas sólidas del compartimento germinal, los lóbulos. Éstos se disponen radialmente y terminan por debajo de la superficie del testículo, es decir que se apoyan sobre la cápsula testicular.(Fig. 7B) (Grier, 1993).

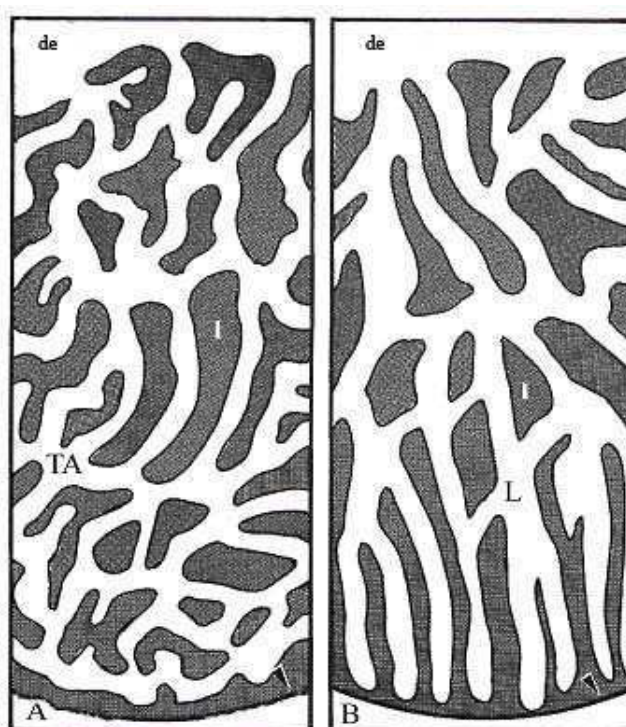


Fig. 7. A) Testículo tubular anastomosado, hipotetizado típico de grupos basales de peces, B) Testículo lobular, característico de atherinomorfos entre otros. de: conducto eferente, I: tejido intersticial, L: lóbulos, TA: túbulos anastomosados (Modificado de Grier, 1993).

El testículo lobular puede dividirse en dos tipos sobre la base de la distribución y el arreglo de las espermatogonias. En los peces atherinomorfos, el testículo corresponde a un tipo lobular restricto, en el cual los lóbulos muestran una progresión ordenada de células germinales en desarrollo, con las espermatogonias restringidas a la porción distal. Así, dentro de los lóbulos, los distintos estadios de la espermatoogénesis se encuentran en orden

creciente de maduración. Los espermatogonias A, rodeadas por procesos de las células de Sertoli, se encuentran en el extremo ciego del lóbulo. A continuación espermatocistos conteniendo las espermatogonias B, luego los espermatocitos I y II y finalmente las espermatidas y espermatozoides (Fig. 8A). En este tipo de testículo los lóbulos son sólidos, no poseen luz. En contraste, los teleósteos no atherinomorfos, poseen un testículo lobular irrestricto, en los cuales las espermatogonias y los distintos espermatocistos que

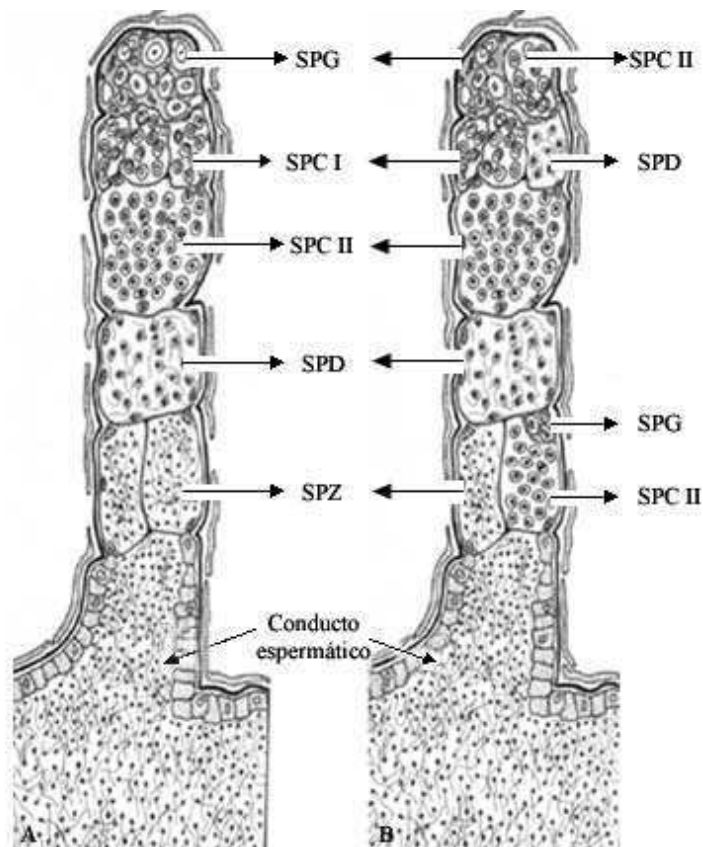


Fig 8. Esquemas de lóbulos correspondientes a testículos lobulares restringido (A) e irrestricto (B). A- con espermatogonias y espermatocistos en distintos estadios del desarrollo ordenadas a lo largo de toda la longitud del lóbulo, B- distribución de las células germinales sin ordenamiento (Modificado de Grier 1993 en *The Sertoli Cell*).

contienen a cada uno de los estadios de la espermatogénesis, no guardan un ordenamiento centrípeto dentro del lóbulo, sino que están mezclados y se los pueden encontrar a cualquier altura del mismo (Fig. 8B). El extremo ciego de los lóbulos apoya sobre la cápsula testicular, bien próximos a la periferia del testículo. Los lóbulos presentan una luz virtual hacia la que se abrirán los espermatocistos para liberar oportunamente a los

espermatozoides durante el proceso de espermiación (Grier, 1981; Parenti y Grier, 2004; Grier y Uribe Aranzabal, 2009).

Ciclo reproductivo anual

En algunas especies de teleósteos los cambios histológicos del epitelio germinal del testículo se utilizaron para determinar una secuencia de cinco clases reproductivas durante el ciclo reproductivo anual: “regresada, maduración temprana, maduración media, maduración tardía (o final) y regresión” (Fig. 9). Esta clasificación se basa en los estadios de las células germinales presentes y en la alternancia entre un epitelio germinal continuo y discontinuo (Grier y Taylor, 1998; Taylor y col., 1998; Grier 2002; Lo Nostro y col., 2003b; Parenti y Grier, 2004). En un epitelio germinal continuo, a lo largo de la membrana basal del lóbulo, se observa una población ininterrumpida de células germinales en distintos estadios de desarrollo asociadas a células de Sertoli. En un epitelio germinal discontinuo, como los espermatozoides maduros son liberados a la luz del lóbulo, los espermatocistos y generalmente las espermatogonias se vuelven escasas y resulta un epitelio casi completamente compuesto por una monocapa de células de Sertoli a lo largo de la membrana basal del lóbulo (Fig. 9) (Grier y Taylor, 1998; Taylor y col., 1998; Grier, 2002; Lo Nostro y col., 2003b; Parenti y Grier, 2004). Entre los Perciformes, estas clases del ciclo reproductivo han sido descritas en los machos del róbalo común, *Centropomus undecimalis* (Taylor y col., 1998), el bonito, *Rachycentron canadum* (Brown-Peterson y col., 2002), la trucha moteada, *Cynoscion nebulosus* (Brown-Peterson, 2003), y el gobido de agua dulce, *Padogobius bonelli* (*Padogobius martensi*, Cinquetti y Dramis, 2003).

Típicamente, en la mayoría de las especies de teleósteos los patrones de estación de cría están gobernados por factores ambientales como el fotoperíodo, la temperatura, la salinidad, las lluvias, el flujo de agua, los predadores y la densidad poblacional entre otros (Bromage y col., 2001; Cinquetti y Dramis, 2003; Alvarenga y col., 2006; Godinho, 2007; Batlouni y col., 2008; Fiszbein y col., 2010). Estas áreas del conocimiento tienen particular interés para la industria pesquera. La morfología de las gónadas ha sido estudiada para identificar el ciclo anual reproductivo y la extensión de las estaciones de cría. Por otra parte, la utilización de la ultraestructura de los espermatozoides es aceptada para la resolución de problemas de ubicación taxonómica e interrelaciones filogenéticas

(Jamienson, 1991, 2009), así como también los caracteres gonadales son interpretados y propuestos para análisis filogenéticos (Parenti y Grier, 2004; Parenti y col, 2010).

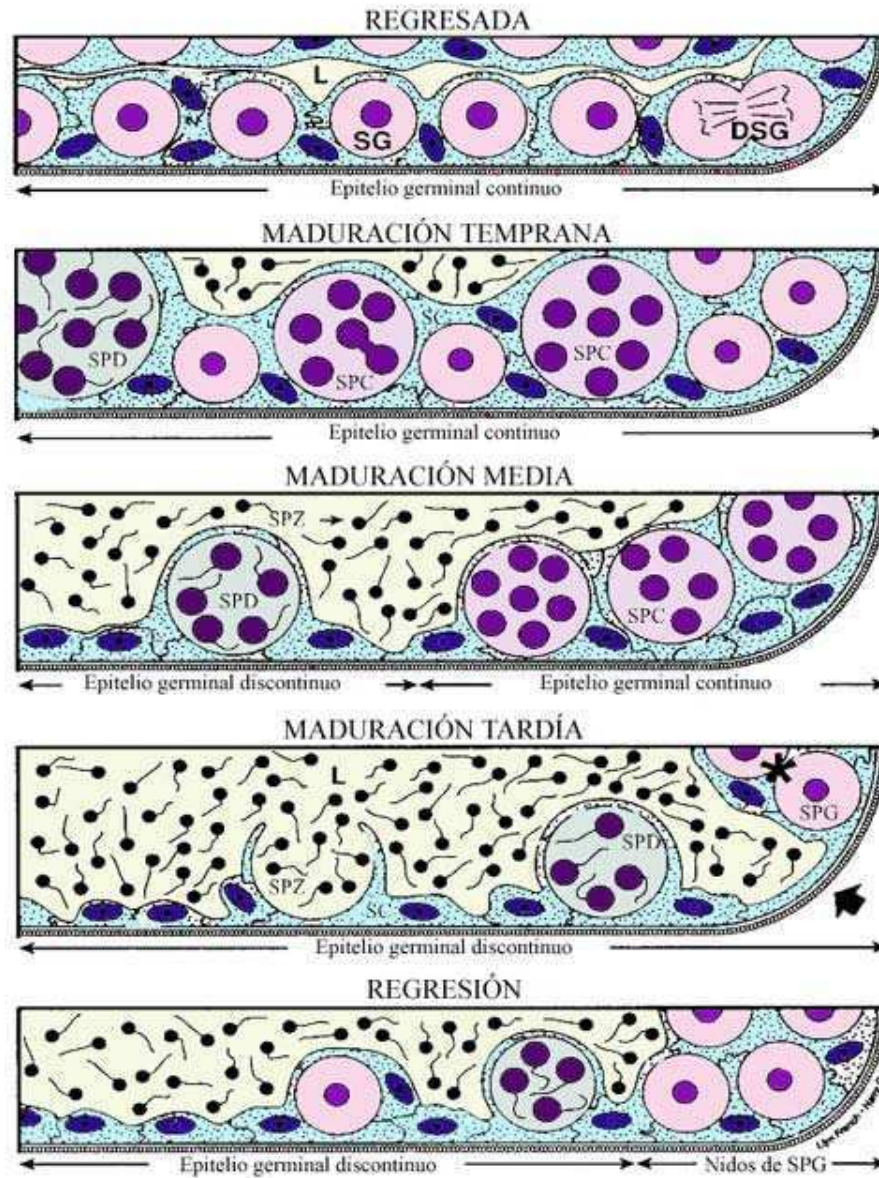


Fig. 9. Clases reproductivas durante el ciclo anual: se muestran los cambios en el epitelio germinal de peces machos en las cinco clases reproductivas (Modificado de Grier, 2002).

Estas caracterizaciones dan un nuevo marco a los estudios realizados por Polder (1971) quien realizó una valiosa descripción del comportamiento durante el período reproductivo y también abordó el estudio de la estructura testicular en *C. dimerus* (anteriormente llamada *Aequidens portalegrensis*). Sin embargo, estos estudios estaban limitados a la

observación con microscopía óptica y quedan fuera del contexto actual del conocimiento sobre la espermatogénesis.

C. dimerus es una especie representativa de la ictio-fauna de la Cuenca del Río de La Plata y en ella se pusieron a prueba, en esta sección, las siguientes hipótesis.

Hipótesis:

- 1.- El testículo de *Cichlasoma dimerus* conserva la organización básica del resto de los vertebrados.
- 2.- *C. dimerus* presenta espermatogénesis cística y una estructura testicular del tipo lobular irrestricta como en otros teleósteos no Atherinomorpha.
- 3.- En esta especie se identifican las cinco clases reproductivas descritas para otros perciformes, durante el ciclo reproductivo anual.
- 4.- La morfología del epitelio germinal varía durante el ciclo reproductivo anual, reflejando estacionalidad reproductiva.

Para validar estas hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivos:

- 1.- Describir anatómica e histológicamente el testículo de *C. dimerus* y determinar su tipo estructural.
- 2.- Caracterizar los distintos estadios de la espermatogénesis.
- 3.- Describir los cambios que se dan durante el ciclo reproductivo anual en el epitelio germinal, considerando los tipos celulares presentes en el testículo.
- 4.- Determinar la estación reproductiva en un ponedor múltiple.

Materiales y métodos

Dado que los objetivos de estas investigaciones están asociados con eventos reproductivos, en este estudio se trabajó con especímenes adultos. Los peces utilizados provinieron de los Esteros del Riachuelo, Corrientes, Argentina (27° 35' S, 58° 45' O). Fueron capturados por pescadores locales y transportados al laboratorio, donde se los aclimató a las condiciones de cautiverio por un mes antes de iniciar los distintos estudios. Para ello se mantuvieron en acuarios de 100 l con una capa de grava en la base (Fig. 10). La temperatura fue de $26,5 \pm 1^\circ \text{C}$, el pH 7,3, con un fotoperíodo de 12:12 h. y una densidad promedio de 6,4 g/l. Los acuarios estaban provistos de aireadores y filtrado externo de agua. La alimentación de los peces se realizó diariamente con alimento balanceado comercial (Tetra®), que fue ocasionalmente suplementado con gusanos *Tubifex* sp.

Las parejas reproductivas (N=12) fueron aisladas en acuarios aireados de 45 l, también provistos de una capa de grava y con una piedra lisa para la deposición de los oocitos. La temperatura ambiente fue regulada de modo tal que el agua se mantuvo de 22°C a 26°C desde abril hasta agosto y de 25°C a 30°C durante el resto del año. Las condiciones del fotoperíodo se establecieron en 12:12 h superpuestas con el ciclo de luz-oscuridad que ocurre naturalmente. El comportamiento de las parejas se observó a diario y los eventos de puesta se registraron diariamente durante uno (tres parejas) o dos años (tres parejas). La fecundación fue verificada por la eclosión de las larvas.

Por otro lado, machos pertenecientes a acuarios comunitarios (N=70; longitud estándar=9,5-12 cm; peso=40-70 gr) se sacrificaron a lo largo del año a razón de 5 por mes. Los peces fueron anestesiados con Fish Calmer® (ingredientes activos: Acetona, Dimetilquetona, Alfametilquinolina, Laboratorios Jungle, USA), pesados y medidos. Luego se sacrificaron por decapitación, los testículos se removieron rápidamente y se pesaron para determinar el índice gonadosomático:

$$\text{IGS} = 100 \times [P_G \times (P - P_G)^{-1}],$$

Donde, P_G = peso de la gónada y P = peso total del individuo.

Secciones de testículos se procesaron siguiendo técnicas convencionales de histología, para evaluar sus características durante el ciclo reproductivo de la especie.



Fig. 10. Sala del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., con acuarios acondicionados según los requerimientos experimentales. Cuadrante superior izquierdo: acuarios para exposición a contaminantes; resto: acuarios para aclimatación y mantenimiento, con grava en la base y plantas artificiales.

Para microscopia óptica, las muestras fueron fijadas en líquido de Bouin por 12 h, deshidratadas gradualmente en una serie creciente de alcoholes e incluidas en parafina. Secciones de 6 μm de espesor se colorearon con hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson.

Para realizar técnicas inmunohistoquímicas e identificar células en proliferación, pequeños trozos de testículo fueron fijados en formol 4%, deshidratados gradualmente en una serie creciente de alcoholes e incluidos en parafina. Cortes de 6 μm se montaron y secaron al aire. Luego de ser desparafinados e hidratados en gradación decreciente de etanol, se lavaron con PBS (buffer fosfato salino, 5 mM, pH 7,6). Tras bloquear las peroxidasas endógenas usando una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 3% durante 10 min., los cortes fueron lavados nuevamente con PBS. Se procedió a recuperar los antígenos, enmascarados por el fijador, utilizando la técnica conocida como *antigen retrieval* (según Lo Nostro y col. 2003a). Brevemente, los cortes se sumergieron en una solución de sulfato de Zinc 1% y se calentaron en microondas (700 W) a 100°C durante 2 min. Seguidamente, los sitios inespecíficos de unión, fueron bloqueados utilizando leche en polvo descremada,

5% en PBS, por 40 min. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (monoclonal PC10 producido en ratón, anti-PCNA; Enzo Diagnostics Inc, USA) en una dilución 1:30, durante 1.30 hs. a temperatura ambiente. Los cortes control fueron tratados con PBS en lugar del anticuerpo primario. Luego de lavar durante 5 min., se agregó el segundo anticuerpo biotinilado: anti-ratón IgG producido en caballo (Sigma Aldrich) en una dilución de 1:15, durante 1 h. a temperatura ambiente. Se lavó en PBS y se agregó el complejo estreptoavidina- biotina (ABC- Vector Laboratories, USA) por 1 h. a temperatura ambiente. Para el revelado de las inmunomarcas se utilizó una solución de 3,3' diaminobencidina en buffer Tris 0,1 M, pH 7,2 (DAB-Vector Laboratories, USA) y H₂O₂, 30% al 0.02%. Los cortes se revelaron bajo observación en microscopio y la reacción se detuvo lavando los cortes en agua corriente. Luego fueron deshidratados y se les colocó un cubre para su observación. Algunas muestras se contracoloraron con verde luz, previo a la deshidratación y montaje definitivo. Finalmente, los preparados fueron examinados y fotografiados con un microscopio Nikon Microphot FX

Para microscopía electrónica de transmisión (MET), se fijaron secciones de testículo de 2 mm. de espesor en glutaraldehído al 3 % en solución tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 h a 4° C. Las secciones fueron lavadas con solución tampón fosfato 0,1M, post-fijadas en tetróxido de osmio 1% en solución tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 2 h a temperatura ambiente, luego enjuagadas en agua destilada, deshidratadas en una serie creciente de alcoholes y acetona, y embebidos en resina Spurr. Se realizaron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Sorvall MT2-B, se colorearon con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo, y se examinaron bajo un microscopio Philips EM301. Los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina fueron usados para orientación.

Los testículos de tres machos reproductivos adicionales fueron disecados y macerados individualmente en 2 ml de solución salina. Las suspensiones resultantes se ubicaron en porta-objetos con el fin de observar los espermatozoides bajo fotomicroscopio óptico.

Resultados

Estructura testicular

Los testículos de *C. dimerus* son órganos pares alargados, filiformes, con una sección transversal triangular u ovalada. Se encuentran ubicados ventrales a la vejiga natatoria y están conectados a la pared dorsal del cuerpo por un mesorquio. El conducto eferente corre dorsalmente paralelo a la arteria y a la vena principal que drenan hacia y desde el órgano (Figs.11, 12A, 12B). La pared del testículo es una serosa compuesta de un mesotelio simple y una delgada capa de tejido conectivo subyacente. Dos compartimentos se pueden distinguir en el testículo: el germinal, compuesto de células de Sertoli y células germinales, y el intersticial que contiene tejido conectivo (Fig. 12A).

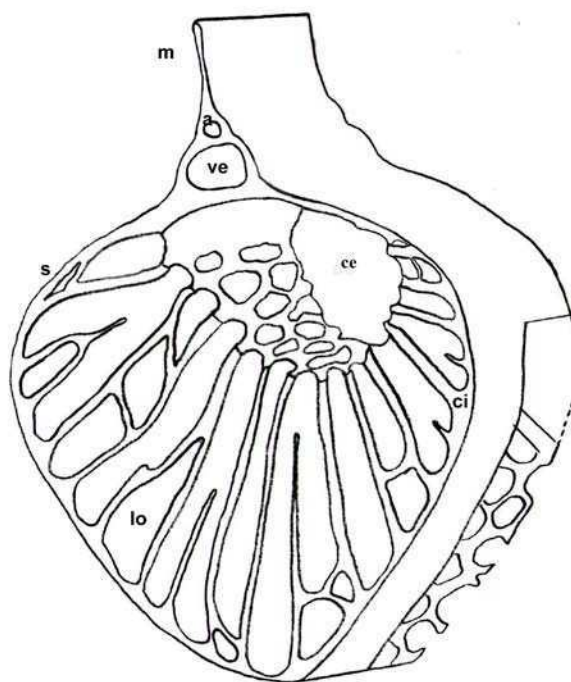


Fig. 11. Estructura del testículo de un adulto de *C. dimerus*. a, arteria; ci, compartimento intersticial; ce, conducto eferente; lo, lóbulo; m, mesorquio; s, serosa; ve, vena (Modificado de Polder, 1971).

Los testículos pertenecen al tipo lobular irrestricto. Los espermatocistos que contienen clones de células germinales en distintos estadios de la espermatogénesis, desde las espermatogonias hasta los espermatozoides, se dan a lo largo de la longitud del lóbulo sin

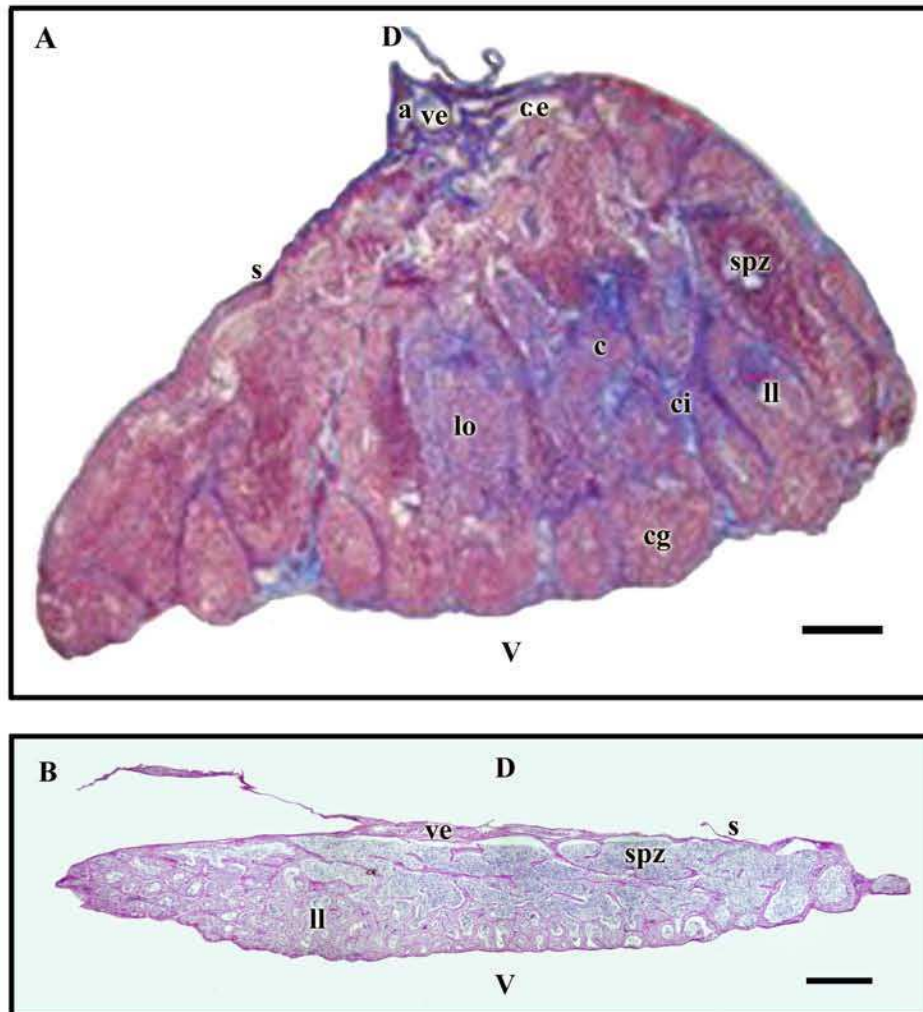


Fig. 12. Testículo de *C. dimerus* en maduración media. A- Corte transversal, B- corte sagital
 Barra: A: 100 μ m, B: 200 μ m. a: arteria, c: cisto, cg: compartimento germinal, ci: comparti-
 mento intersticial, ce: conducto eferente, D: dorsal; ll: luz del lóbulo, lo: lóbulo, s: serosa,
 SPZ: espermatozoides, V: ventral, ve: vena.

orden creciente de maduración. Los lóbulos terminan ciegos en la periferia del órgano y están limitados por una membrana basal que los separa del tejido intersticial (Fig. 12A). Los espermatozoides durante la espermiación son liberados al lumen lobular, el cual es continuo con el conducto eferente (Fig. 12A; 12B).

Compartimento germinal

El compartimento germinal del testículo de *C. dimerus* está formado por lóbulos que contienen a las células germinales y a las células de Sertoli.

Las espermatogonias tipo A (SPGA) son las células germinales más grandes encontradas en el testículo. Tienen forma redonda a oval, con un citoplasma hialino. Están caracterizadas por un núcleo esférico central prominente que contiene un único nucléolo. Frecuentemente se observa cromatina periférica en distintos grados de condensación dependiendo del estadio mitótico (Fig. 13A y detalle). Bajo MET (Fig. 14A-C) se observa que las SPGA están individualmente rodeadas por procesos de las células de Sertoli. El núcleo de las SPGA muestra áreas relativamente claras ocupadas por eucromatina y áreas densas de heterocromatina asociadas con la envoltura nuclear. En el citoplasma puede observarse retículo endoplasmático liso (REL) con numerosas cisternas, REL circular, abundantes mitocondrias con crestas lamelares y mitocondrias en forma de copa. Las lamelas anulares aparecen usualmente como pilas de cisternas con complejos de poro similares a aquellos de la envoltura nuclear y pueden estar dispuestas como ordenamientos paralelos, en círculos concéntricos o formar, a veces, estructuras tipo anfiteatro (Fig. 14B). También están presentes cúmulos de sustancia electrodensa denominados “nuage” que pueden estar asociados con mitocondrias formando complejos (Fig. 14C).

Las espermatogonia tipo B (SPGB) están agrupadas en espermatocistos, rodeadas por procesos de células de Sertoli. Las SPGB se caracterizan por una forma redonda y un núcleo esférico prominente que contiene un nucléolo. Según la fase del ciclo celular difieren en la agregación cromatínica. Las SPGB son más pequeñas en tamaño que las SPGA (Fig. 13A y detalle). Ultraestructuralmente se pueden observar puentes citoplasmáticos entre las SPGB aunque son difíciles de discernir. El citoplasma contiene lamelas anulares, mitocondrias con crestas lamelares, unas pocas mitocondrias en forma de

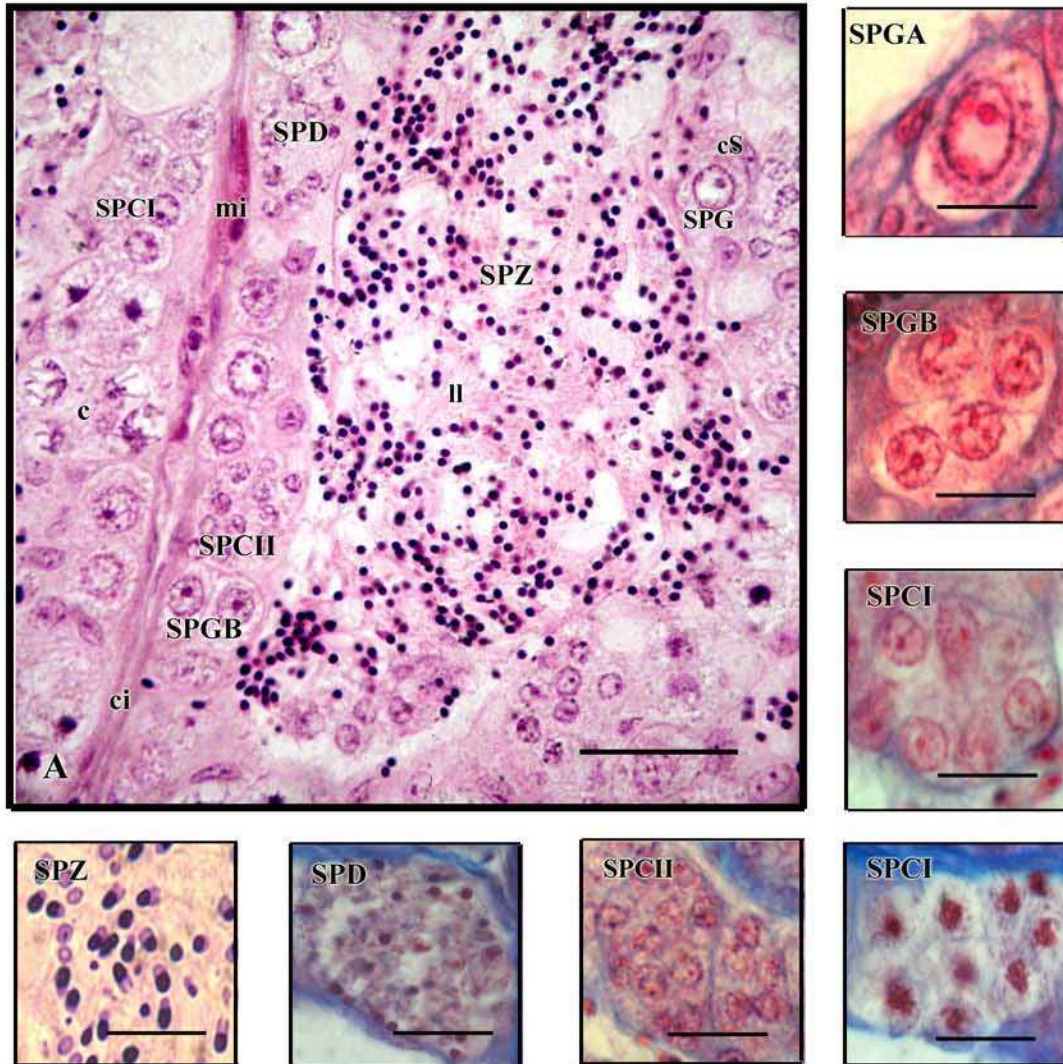


Fig. 13. Espermatogénesis en *C. dimerus*. Aspecto general de los lóbulos al microscopio óptico. Barra: A: 15 μ m, detalles: 10 μ m. c: cisto, ci: compartimento intersticial, cS: célula de Sertoli, II: luz del lóbulo, mi: célula mioide, SPCI: espermatocito I, SPCII: espermatocito II, SPD: espermátida, SPGA: espermatogonia A, SPGB: espermatogonia B, SPZ: espermatozoides.

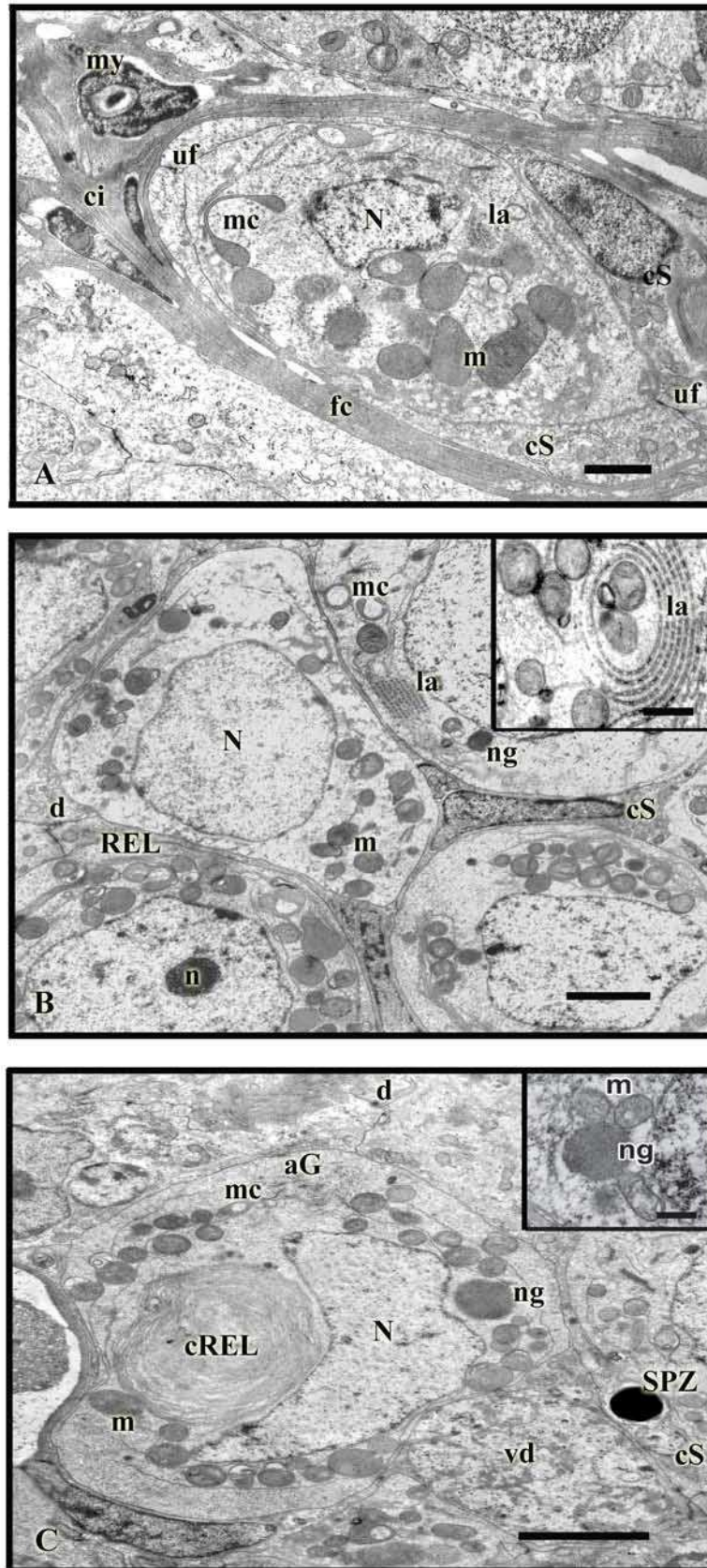


Fig. 14. SPGA bajo TEM. Nótese en C la presencia de un espermatozoide fagocitado en la célula de Sertoli. Detalle B: lamela anular, detalle C: complejo nuage-mitochondria. Barra: A, B y C, 2 μ m, detalles, 0.5 μ m. a G, aparato de Golgi ; ci, compartimento intersticial; cREL, REL circular; cS, célula de Sertoli; fc, fibras de colágeno; la, lamela anular; m, mitocondria con crestas lamelares; mc, mitocondrias en forma de copa; my, célula mioide; N, núcleo; n, nucleolo; ng, nuage; REL, retículo endoplasmático liso; SPZ, espermatozoide; uf, unión fuerte; vd, vacuola digestiva.

copa, escasas “nuage”, un aparato de Golgi y REL circular. Además, fue evidente una disminución en el número de mitocondrias cuando se las comparó con las SPGA (Fig. 15A, B).

Los espermatoцитos primarios (SPCI) son similares en tamaño y forma a las SPGB, de la última división mitótica. Ellos poseen un citoplasma hialino y un núcleo esférico que difiere en apariencia según el estadio de la profase meiótica y contiene un nucléolo (Fig. 13A y detalles). Bajo MET (Fig. 16A), se pueden observar los puentes intercelulares. El citoplasma contiene escasas mitocondrias con crestas lamelares, más pequeñas en tamaño que aquellas de las SPGB. También pueden observarse las “nuage”, un REL y un aparato de Golgi, así como lamelas anulares, las cuales pueden ser encontradas en estrecha asociación con la envoltura nuclear (Fig. 16A detalle). En el estadio de paquinema son evidentes en el núcleo, los complejos sinaptonémicos.

Los espermatoцитos secundarios (SPCII) se encuentran raramente en una sección del testículo ya que este estadio tiene una duración corta. Su disminución en el tamaño es evidente cuando se los compara con estadios previos. El núcleo esférico está rodeado por un citoplasma pobremente distinguible (Fig. 13A y detalle). Ultraestructuralmente (Fig. 16B), los límites citoplasmáticos son difíciles de identificar debido a la presencia de numerosos puentes intercelulares que unen células adyacentes, estos límites son evidentes sólo en las áreas donde se distinguen los espacios entre células. El núcleo tiene un contorno regular, bien definido. También se observan polirribosomas, REL y cuerpos multilamelares (multivesiculares). Los centríolos pueden observarse cerca del núcleo.

Espermátidas (SPD). Las espermátidas tempranas tienen núcleo esférico con hebras irregulares de cromatina densa (Fig. 13A y detalle). Durante la espermiogénesis, las SPD sufren una remodelación en su forma y una reducción de tamaño. Los espacios entre las células dentro de los espermatoцитos se vuelven cada vez más grandes y el núcleo cada vez más pequeño dado que la cromatina va condensándose. Bajo MET (Fig. 16A, 16C), los puentes citoplasmáticos son evidentes y los espacios intercelulares son variables en forma y tamaño. El núcleo contiene un nucléolo hasta que comienza la espermiogénesis. En el citoplasma pueden observarse los centríolos a partir de los cuales se forman los flagelos. La distribución y estructuras de otras organelas son básicamente similares a aquellas observadas en SPCII.

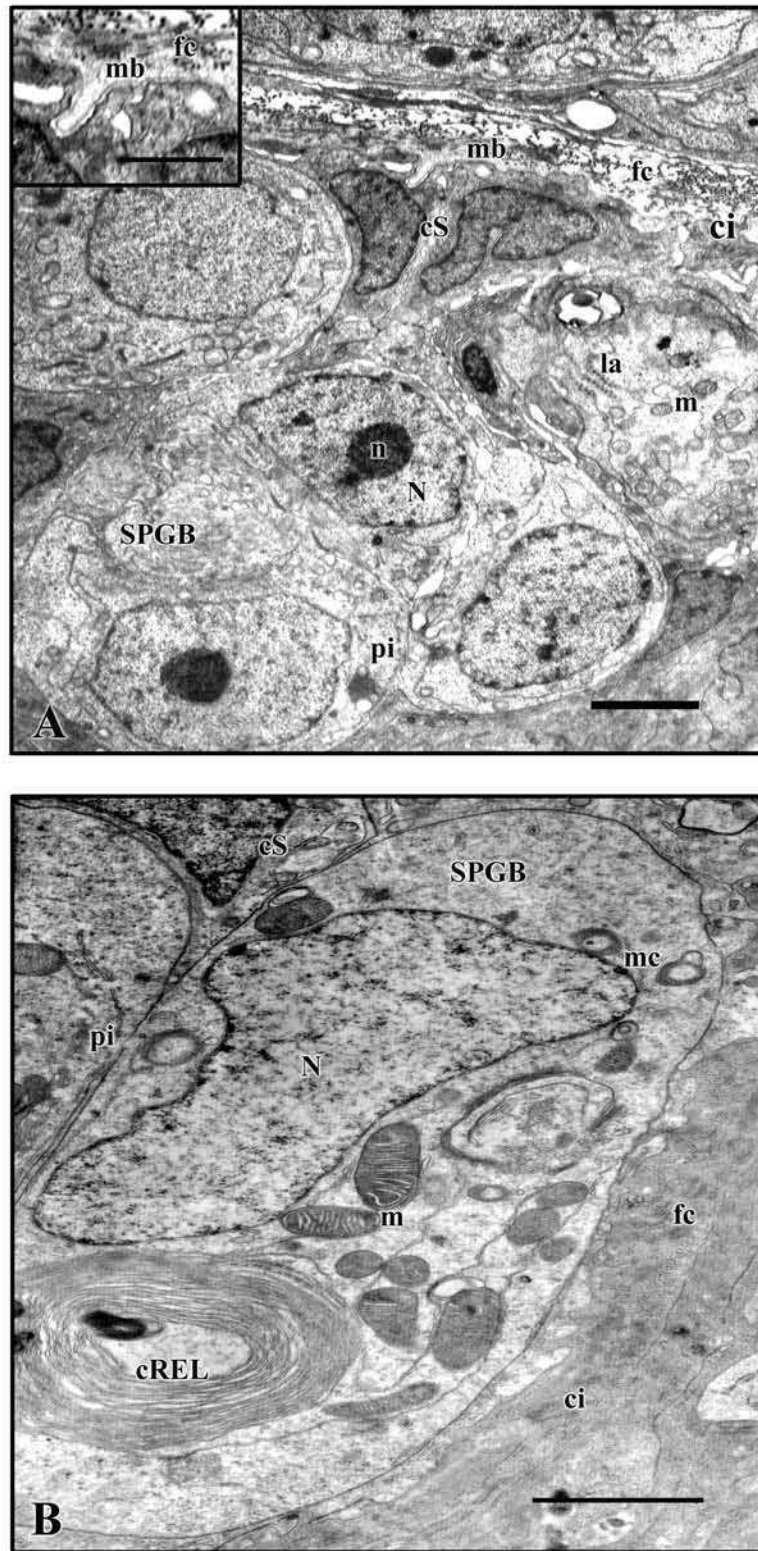


Fig. 15. SPGB bajo MET. A- Cisto de SPGB. B- Nótese el puente citoplasmático entre ambas gonias. Detalle (A): membrana basal. Barra: (A-B) 2 μm , Detalle (A) 1 μm . ci, compartimento intersticial; cREL, retículo endoplasmático liso circular; cS, célula de Sertoli; fc, fibra colágena; la, lamela anular; m, mitocondria; mb, membrana basal; mc, mitocondria en forma de copa; N, núcleo; n, nucleolo; pi, puente intercelular; SPGB, espermatogonia B.

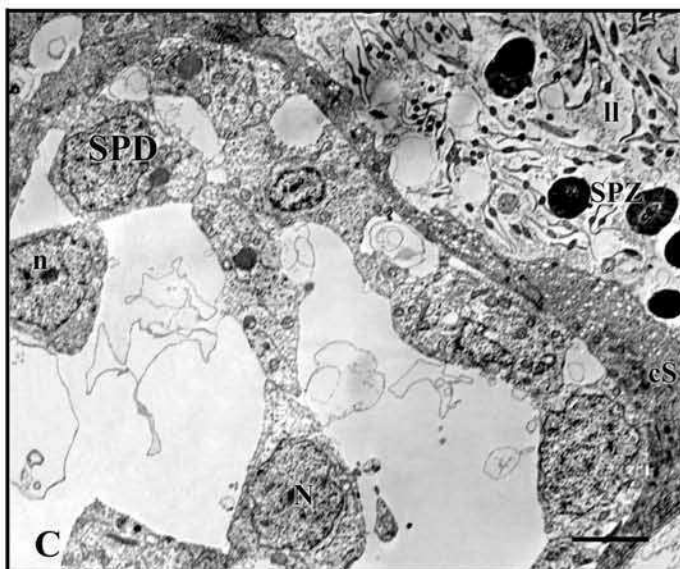
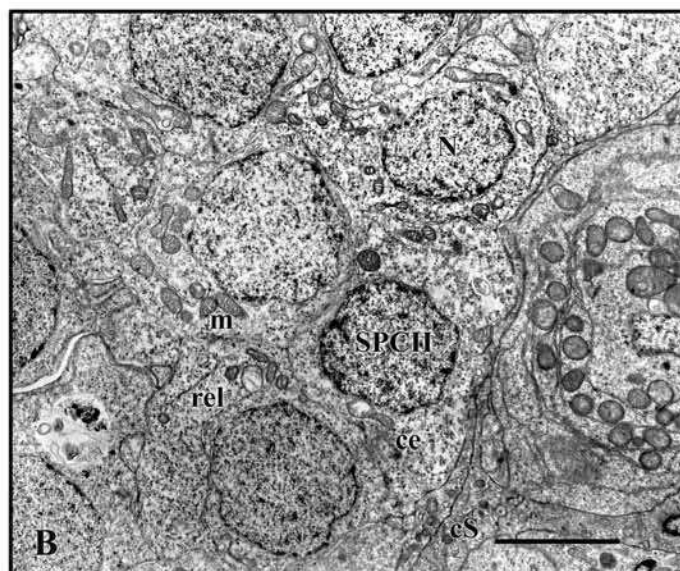
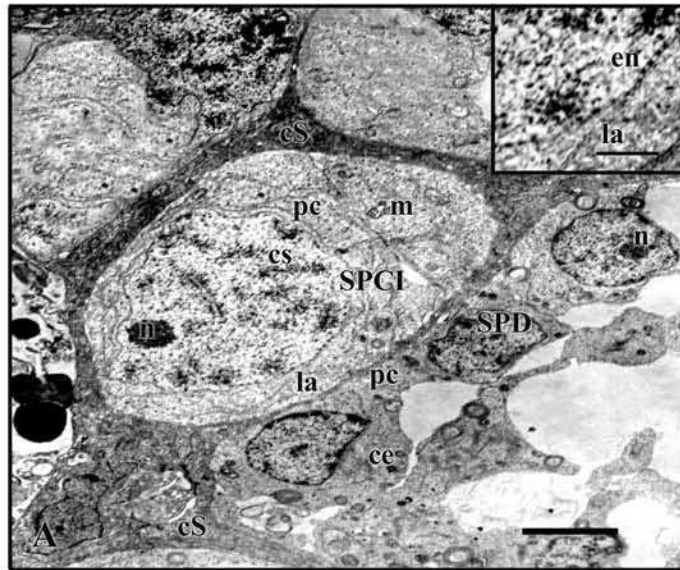


Fig. 16 . (A). SPCI (en paquitene) y SPD. Detalle: lamela anular en estrecha asociación con la envoltura nuclear. **(B).** SPCII. **(C).** SPD. Barra: (A–C) 2 μ m. Detalle 1 μ m. ax, axonema; ce, centriolo; cs, complejo sinaptonémico; cS, célula de Sertoli; en, envoltura nuclear; la, lamela anular; ll, luz lobular; m, mitocondria con crestas lamelares; N, núcleo; n, nucleolo; pc, puente citoplasmático; SPCI, espermatocito primario; SPCII, espermatocito secundario; SPD, espermátida; SPZ, espermatozoide.

Espermatozoide (SPZ). En esta especie, los SPZ son biflagelados y de acuerdo con sus características se clasifican como acuaspermas anacrosomales tipo I (Fig. 13A y detalle). Los flagelos se mantienen separados uno de otro a lo largo de toda su longitud (Fig. 17A). Ultraestructuralmente, la cabeza cilíndrica está completamente ocupada por el núcleo que presenta cromatina altamente condensada y una fosa nuclear poco profunda (Fig. 17B). La pieza media contiene cuatro anillos con nueve mitocondrias cada uno, éstas son esféricas, con crestas lamelares (Fig. 17B,D,E). Entre las membranas externas contiguas de las mitocondrias adyacentes, de cada anillo, se observan densificaciones (Fig. 17D,E). Los anillos de mitocondrias están separados de los dos centriolos por un canal citoplasmático (Fig. 17D). Cada uno de los centriolos da origen a un flagelo (Fig. 17B). En cortes transversales, se observa la típica estructura de 9 +2 microtúbulos del axonema y dos aletas laterales bien definidas (Fig. 17C,E). El axonema es una continuación del cuerpo basal, los dos microtúbulos centrales se originan poco después del cuerpo basal. En la región de transición entre el centriolo y el axonema pueden observarse nueve rayos satelitales bien desarrollados (Fig. 17D).

Las células de Sertoli (cS) son el único tipo celular somático que se da en el compartimento germinal. Adoptan distintas formas de acuerdo con el espacio disponible en el epitelio germinal y tienen un núcleo de triangular a alargado con un nucléolo excéntrico (Fig. 13). Con microscopía óptica, el citoplasma es difícil de identificar, pero bajo MET éste se observa bastante denso.

La SPGA está rodeada por más de una única cS (Fig. 14). Los procesos de la cS forman las paredes de los espermatocistos. Estas células están unidas por desmosomas y uniones fuertes y se apoyan en una delgada membrana basal que limita los lóbulos del testículo, separándolos del compartimento intersticial (Fig. 14A,B,C, 15A, 16A). En el citoplasma de las cS se observan numerosas mitocondrias redondeadas con crestas lamelares, ribosomas libres, poliribosomas, RE rugoso y un aparato de Golgi (Fig. 14A y B, 15A). Las cS fagocitan cuerpos residuales y células en degeneración. Frecuentemente, se observan también vacuolas autofágicas o digestivas que contienen restos celulares o SPZ completos (Fig. 14C). La espermiación está acompañada por la ruptura de la pared del espermatocisto y la liberación de los SPZ a la luz del lóbulo (Fig. 20D). Después de la espermiación,

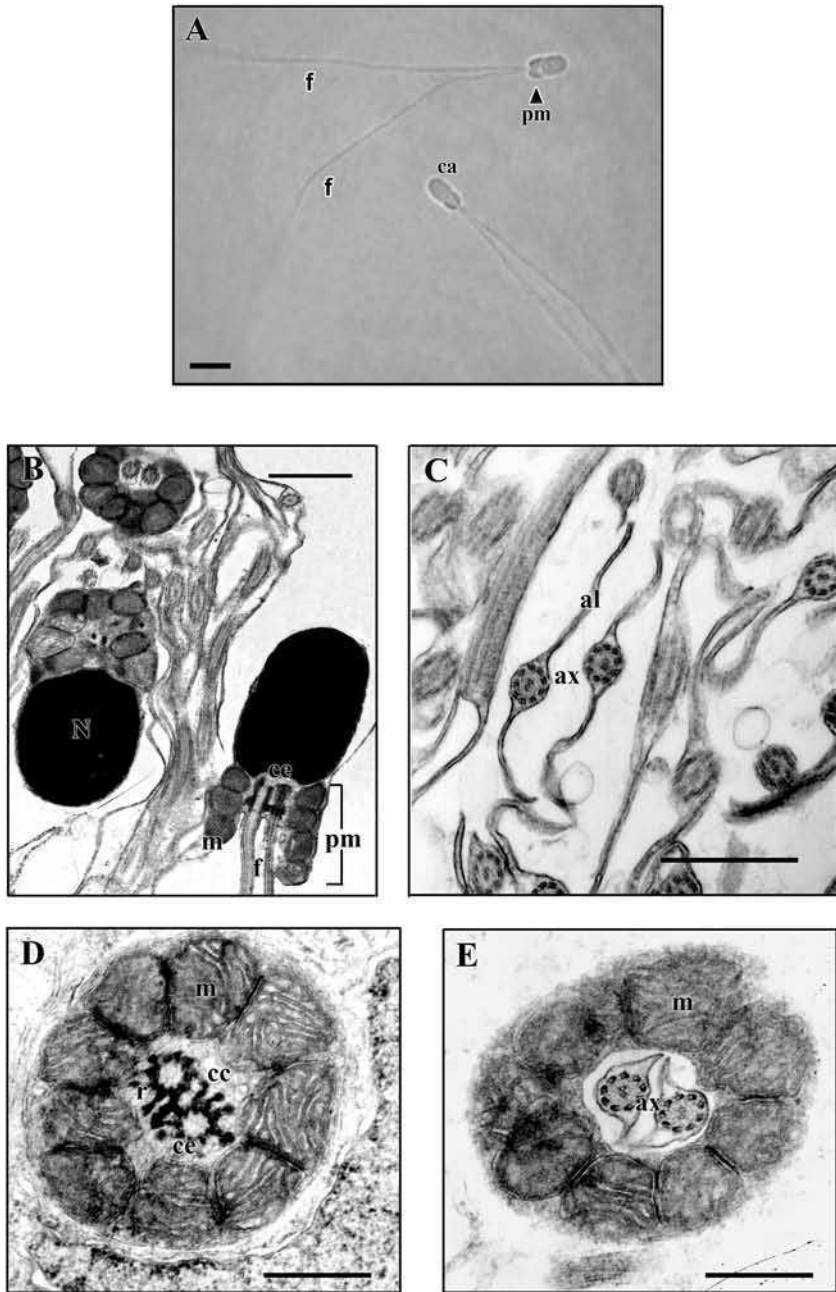


Fig. 17. Espermatozoides biflagelados de *C. dimerus*. -A. Montados *in toto* y observados al MO.-B -E TEM.-B. Corte longitudinal mostrando los dos flagelos. -C. Corte transversal de los flagelos mostrando las aletas laterales.- D,E. corte transversal a nivel de la pieza media mostrando los centriolos y axonemas respectivamente. al: aleta lateral, ax: axonema, ca: cabeza, cc: canal citoplasmático, ce: centriolo, f: flagelo, m: mitocondria, N: núcleo, pm: pieza media, r: fibras radiales. Barra A: 2 μ m. B: 0.75 μ m C-E: 0.5 μ m.

persiste una capa de cS y algunas SPGA aisladas delineando la pared del lóbulo (Fig. 23A, B, C).

Compartimento Intersticial

El compartimento intersticial se encuentra localizado entre los lóbulos y está compuesto por las células de Leydig, células mioides, macrófagos, fibras colágenas, nervios amielínicos y vasos sanguíneos (Fig. 15B, 18, 20C).

Las células de Leydig (cL) (Fig. 18A, 20C) son células ovales que se disponen en grupos en los espacios adyacentes entre lóbulos, cerca de los capilares. Los núcleos esféricos contienen un nucleolo periférico. El citoplasma se presenta típicamente acidófilo.

Las células mioides (mi) (Fig. 18) son el tipo celular más abundante en el compartimento intersticial. Ellas se encuentran en estrecha proximidad a las fibras colágenas, rodeando los lóbulos. Ultraestructuralmente, el citoplasma está típicamente lleno de microfilamentos que corren en paralelo a lo largo del eje de la célula. El núcleo tiene forma variable y contiene cúmulos de heterocromatina. Las mitocondrias son las organelas más abundantes. También se han observado centríolos y cuerpos multivesiculares.

Los macrófagos (M) (Fig. 18B) se encuentran en grupos discretos o aislados en el intersticio del testículo, cerca de las células de Leydig, células mioides o vasos sanguíneos. Ellos tienen un contorno irregular debido a la presencia de procesos celulares. Bajo MET muestran un núcleo irregular con cromatina periférica relativamente condensada. Presentan mitocondrias y un aparato de Golgi aunque frecuentemente está enmascarado por la presencia de numerosas vacuolas digestivas.

Los nervios amielínicos (na) (Fig. 18A) se observan entre las células mioides. En corte transversal cada nervio está compuesto de numerosos axones amielínicos de diámetro variable rodeados por una vaina conformada por proyecciones de las células de Schwann.

Actividad reproductiva y cambios en el epitelio germinal (EG)

El período de mayor actividad reproductiva en *C. dimerus* tiene una extensión de siete meses, desde septiembre hasta marzo (primavera/ verano) (Fig. 19). Las puestas fueron registradas cada $29,4 \pm 16,2$ (media \pm DS) días promedio durante este período, el intervalo

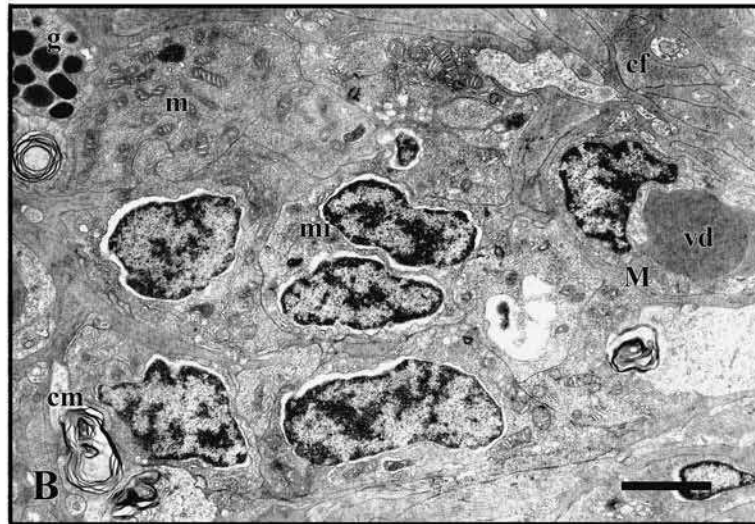
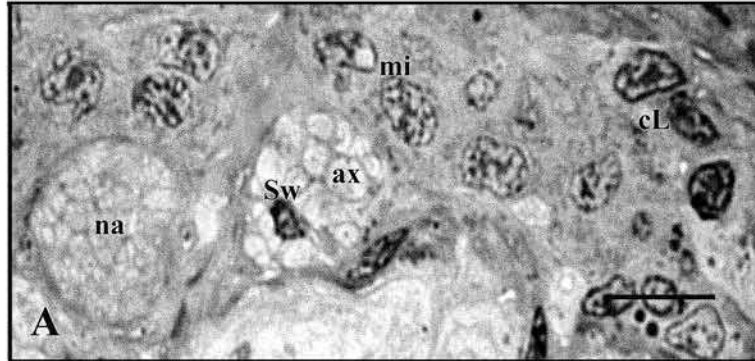


Fig. 18. Compartimiento intersticial del testículo de *C. dimerus* .
 —A. Microscopía óptica. —B. TEM. Barra: (A) 10 μ m, (B) 2 μ m. a, axón;
 cL, célula de Leydig; cm, cuerpo multivesicular; fc, fibras colágenas ;
 g, granulocito; na, nervio amielínico; m, mitocondria con crestas
 lamelares; M, macrófago; mi, célula mioide; Sw, núcleo de célula
 de Schwann; vd, vacuola digestiva;

de tiempo más corto entre puestas sucesivas fue de 13 días. La actividad reproductiva decrece desde abril hasta agosto, período en el cual pueden ocurrir puestas ocasionales (Fig. 19). Los cambios en el IGS mostraron una correlación con la condición reproductiva, comenzando su aumento en septiembre e iniciando su declinación en abril (Fig. 19).

Los cambios que se produjeron en el epitelio germinal, permitieron reconocer cinco clases reproductivas: regresada, maduración temprana, media y tardía (o final) y regresión.

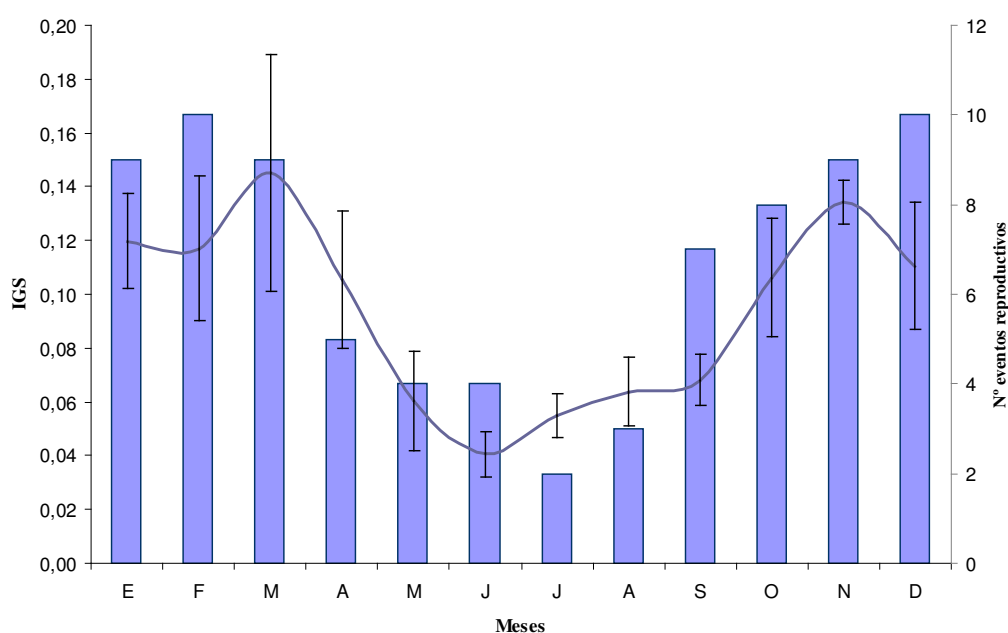


Fig.19. Número de eventos reproductivos (barras) e IGS (línea) a lo largo del año en machos de *C. dimerus*. Las barras del IGS representan la ES.

La clase regresada es una fase proliferativa. Las espermatogonias sufren rápidas y sucesivas divisiones mitóticas. Desde la parte distal de los lóbulos hasta el conducto eferente, se observó un epitelio germinal continuo característico conformado por SPGA rodeadas individualmente por una o más cS o por grupos de SPGB rodeadas por procesos de células de Sertoli formando espermatozoides (Fig. 20A, B). La reacción positiva al anticuerpo nuclear PCNA tanto en células germinales como en células de Sertoli, revelan actividad mitótica (Fig. 20D). Cuando comienza esta fase la luz de cada lóbulo es escasa,

con muy pocos espermatozoides residuales dando a los lóbulos, frecuentemente, la apariencia de cordones celulares sólidos (Fig. 20A).

La clase maduración temprana (Fig. 21A,B) marca el comienzo de las divisiones meióticas, y está definida por un EG continuo compuesto de SPGA y espermatocistos que contienen predominantemente SPCI en distintas etapas de la profase de la primera división meiótica. También se observaron unos pocos espermatocistos que contenían SPCII. Los testículos presentan un aumento tanto en la altura como en ancho debido a que los lóbulos se alargan en esta clase. Éstos tienen una luz discontinua con presencia de espermatozoides residuales.

La clase maduración media está caracterizada por un EG discontinuo cerca del conducto eferente y un EG continuo en la porción distal de los lóbulos (Fig. 22A,C). En el EG discontinuo, alternan áreas compuestas sólo por células de Sertoli con regiones en las que éstas se encuentran asociadas a células germinales, que van desde SPGA hasta SPZ (Fig. 22B). Las divisiones mitóticas de las espermatogonias continúan. La región proximal de los lóbulos testiculares y el conducto eferente comienzan a llenarse de esperma y las luces se anastomosan. De este modo la zona proximal del testículo cambia su función de productora, a almacenadora de espermatozoides. Así, a medida que avanza esta fase de maduración, aumenta la proporción de EG discontinuo como consecuencia de la liberación de SPZ hacia la luz de los lóbulos. Esto se da de modo progresivo hacia la porción distal de dichos lóbulos (Fig. 22A), produciéndose entonces un crecimiento del testículo, en el que los lóbulos se van anastomosando en sentido dorso-ventral (Fig. 12B, 22A).

La clase maduración tardía se caracteriza por la presencia de al menos un lóbulo con EG discontinuo en la zona distal del testículo (Fig. 23A). La morfología de cada lóbulo no varía al unísono, con el avance en esta etapa el EG discontinuo se extiende todo a lo largo de los distintos lóbulos (Fig. 23B,C), de modo tal que la región distal del testículo pasa a ser productora de espermatozoides. Los testículos entonces se vuelven órganos de almacenamiento hacia el final de la maduración. La anastomosis lateral que se inició entre lóbulos adyacentes en la región más dorsal del testículo durante la maduración media, ahora se extiende y se vuelve más evidente. El conducto eferente está lleno de espermatozoides (Fig. 23A). Durante la maduración tardía, cada testículo alcanza su máximo tamaño por el crecimiento de los lóbulos y las espermatogonias continúan

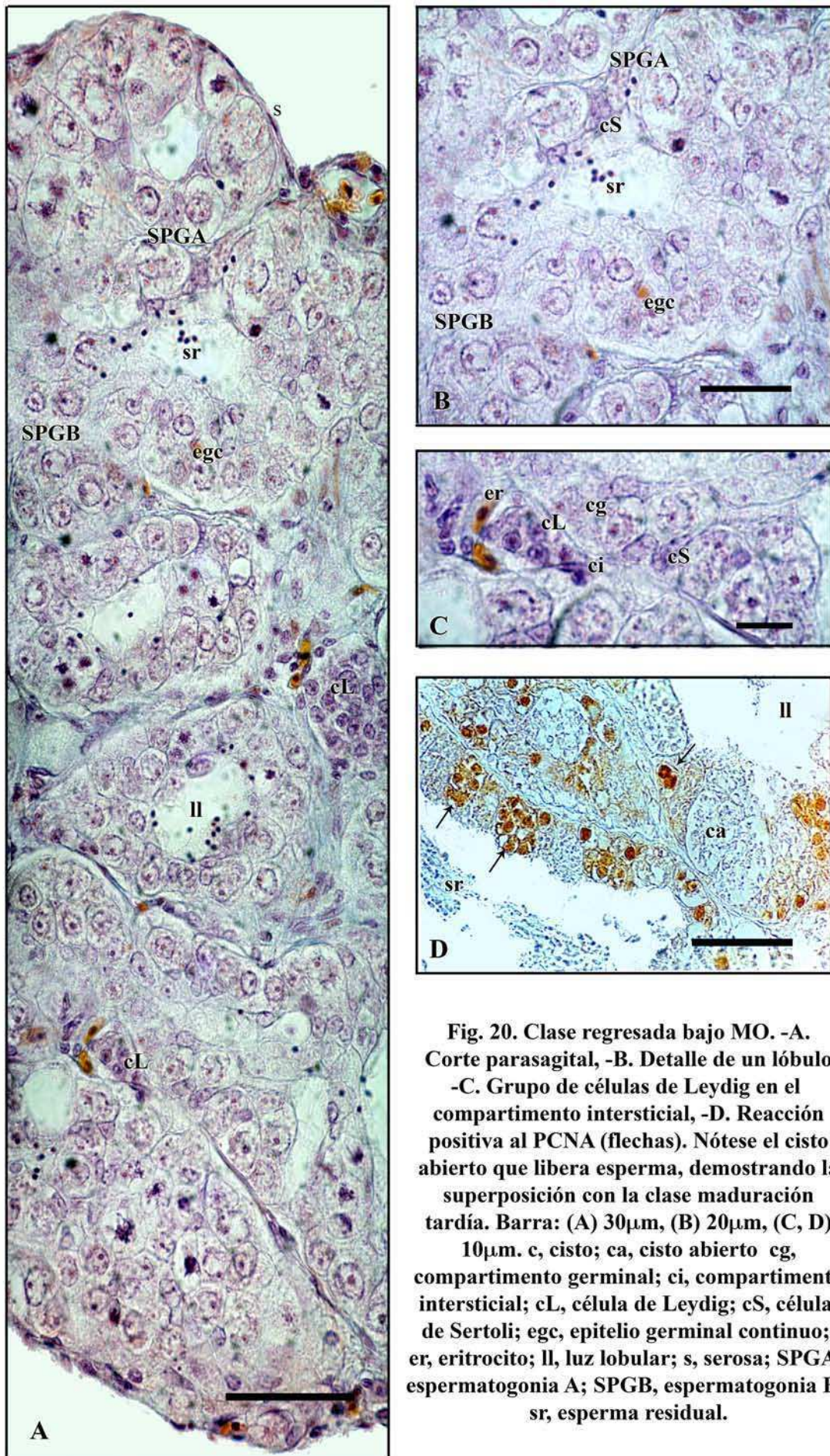


Fig. 20. Clase regresada bajo MO. -A. Corte parasagital, -B. Detalle de un lóbulo, -C. Grupo de células de Leydig en el compartimento intersticial, -D. Reacción positiva al PCNA (flechas). Nótese el cisto abierto que libera esperma, demostrando la superposición con la clase maduración tardía. Barra: (A) 30µm, (B) 20µm, (C, D) 10µm. c, cisto; ca, cisto abierto eg, compartimento germinal; ci, compartimento intersticial; cL, célula de Leydig; cS, célula de Sertoli; egc, epitelio germinal continuo; er, eritrocito; ll, luz lobular; s, serosa; SPGA, espermatozoa A; SPGB, espermatozoa B; sr, esperma residual.

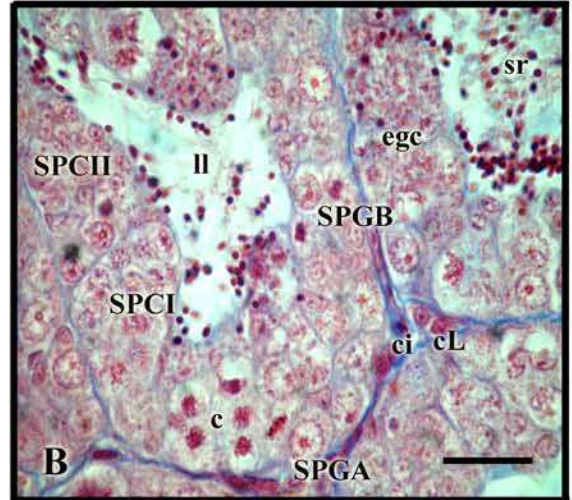
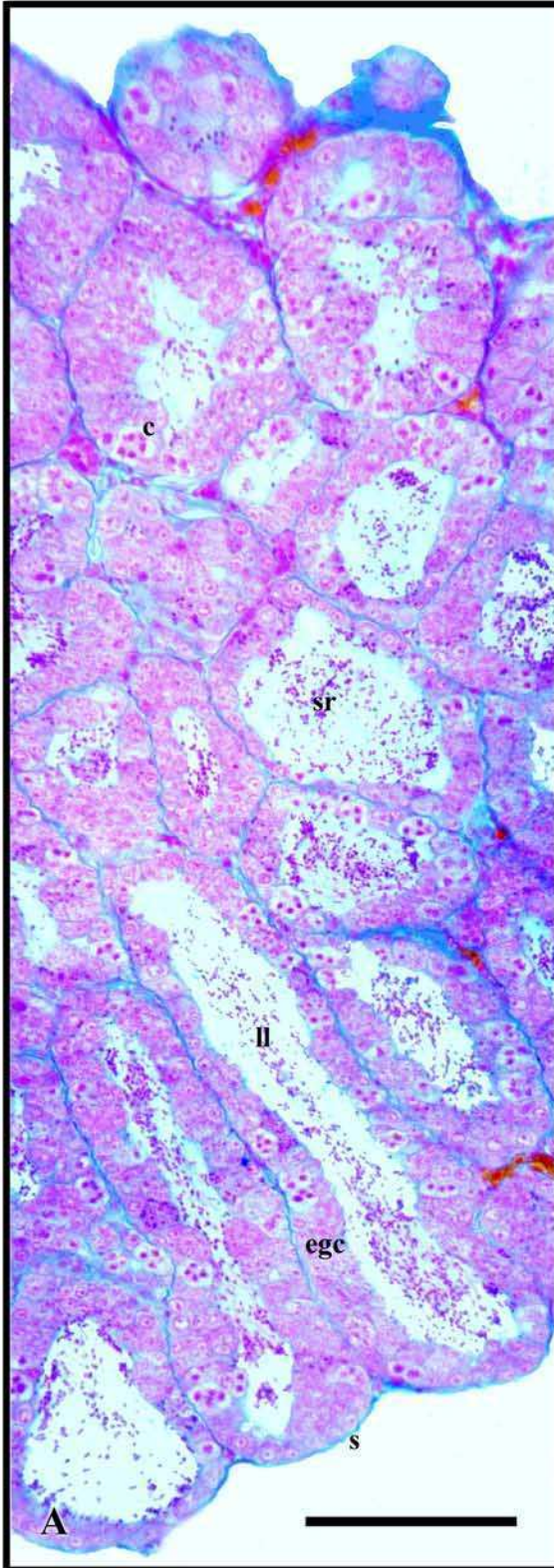


Fig. 21. Testículo de *C. dimerus* en maduración temprana con microscopía óptica.—A. Corte parasagital.—B. Detalle de un lóbulo. Barra: (A) 50 μ m (B) 20 μ m. c, cisto, ci, compartimento intersticial; cL, célula de Leydig; egc, epitelio germinal continuo; ll, luz lobular; s, serosa; SPCI, espermatozoides primario; SPCII, espermatozoides secundario; SPG A, espermatogonia A; SPGB, espermatogonia B; sr, espermatozoides residuales.

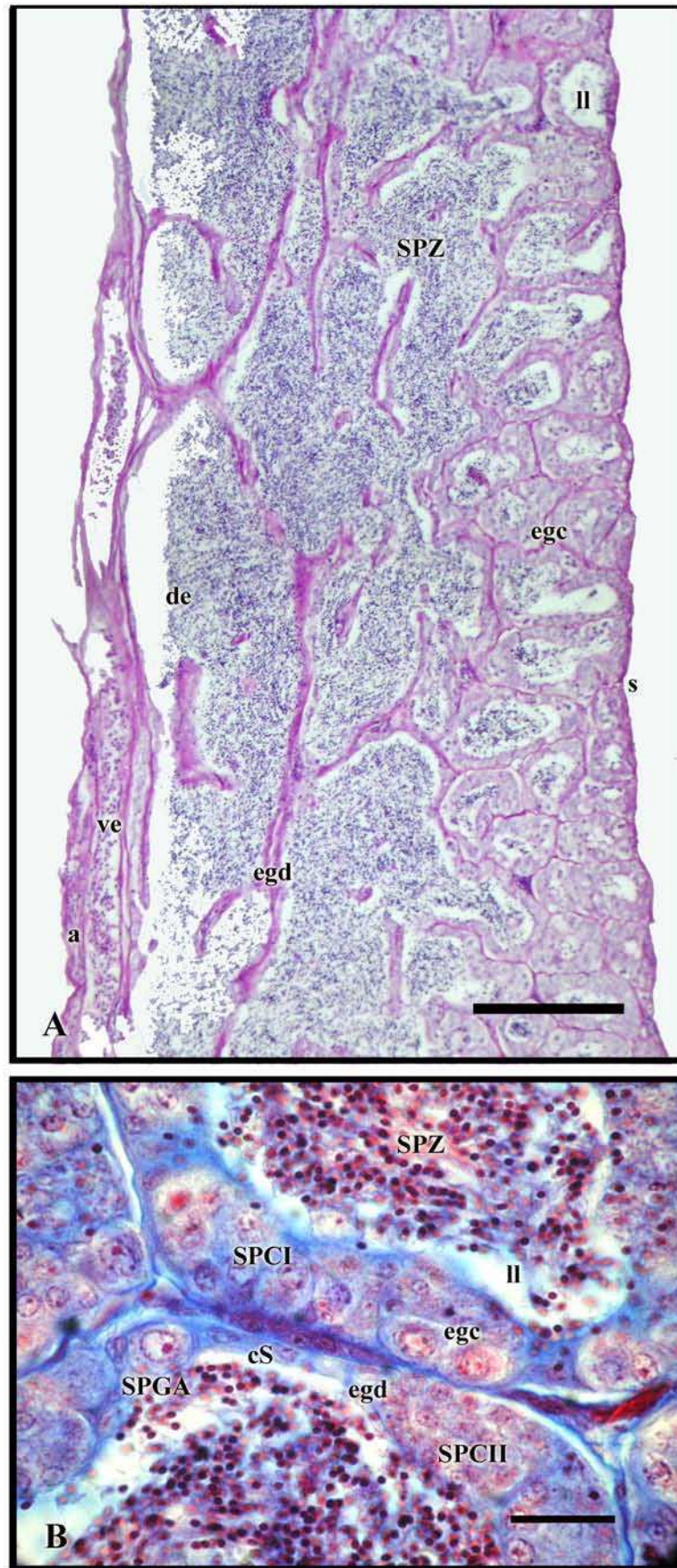


Fig. 22. Testículo de *C. dimerus* en maduración media al MO. A. Corte sagital. B. Detalle del epitelio germinal. Barra: (A) 100 μ m, (B) 20 μ m. a, arteria; c, cisto; cS, célula de Sertoli; de, conducto eferente; egc, epitelio germinal continuo; egd, epitelio germinal discontinuo; II, luz lobular; s, serosa; SPCI, espermatozito primario; spcII, espermatozito secundario; SPGA, espermatozonia A; SPG B, espermatozonia B; SPZ, espermatozoides; ve, vena.

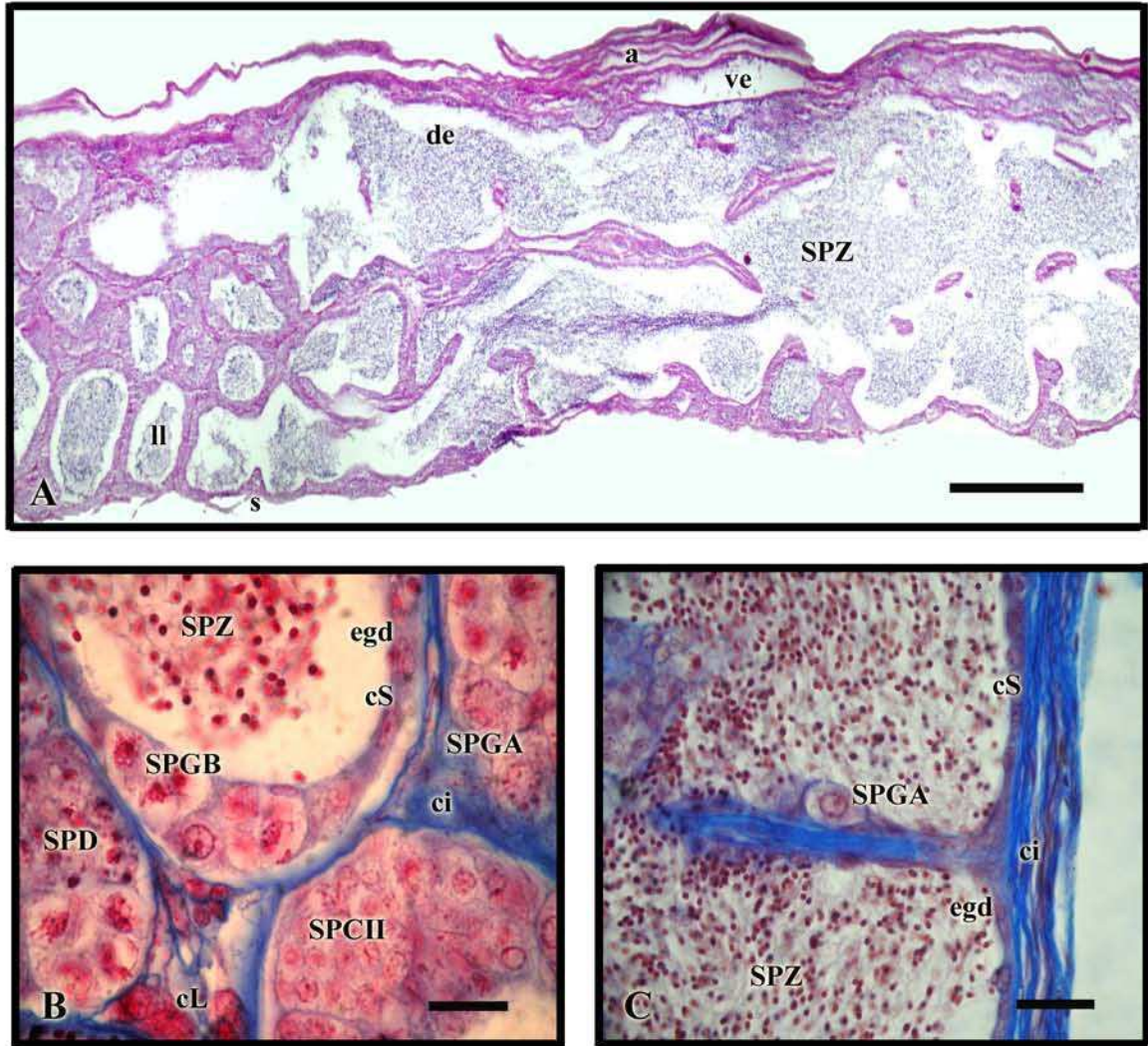


Fig. 23. Testículo de *C. dimerus* en maduración tardía A. Corte sagital. B, C. Detalles de lóbulos. Barra: (A) 100 μ m, (B, C) 20 μ m. a, arteria; ci, compartimento intersticial; cL, célula de Leydig; de, conducto eferente; egd, epitelio germinal discontinuo; ll, luz lobular; s, serose; cS, célula de Sertoli; SPCII, espermatoцito secundario; SPD, espermátida; SPGA, espermatoгония A; SPGB, espermatoгония B; SPZ, espermatozoide; ve, vena.

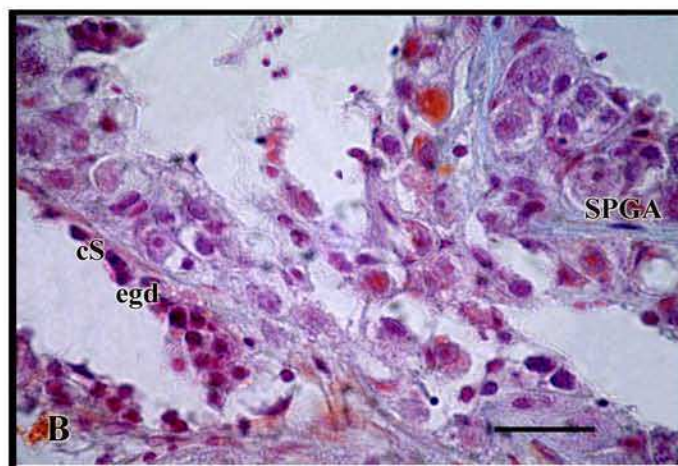
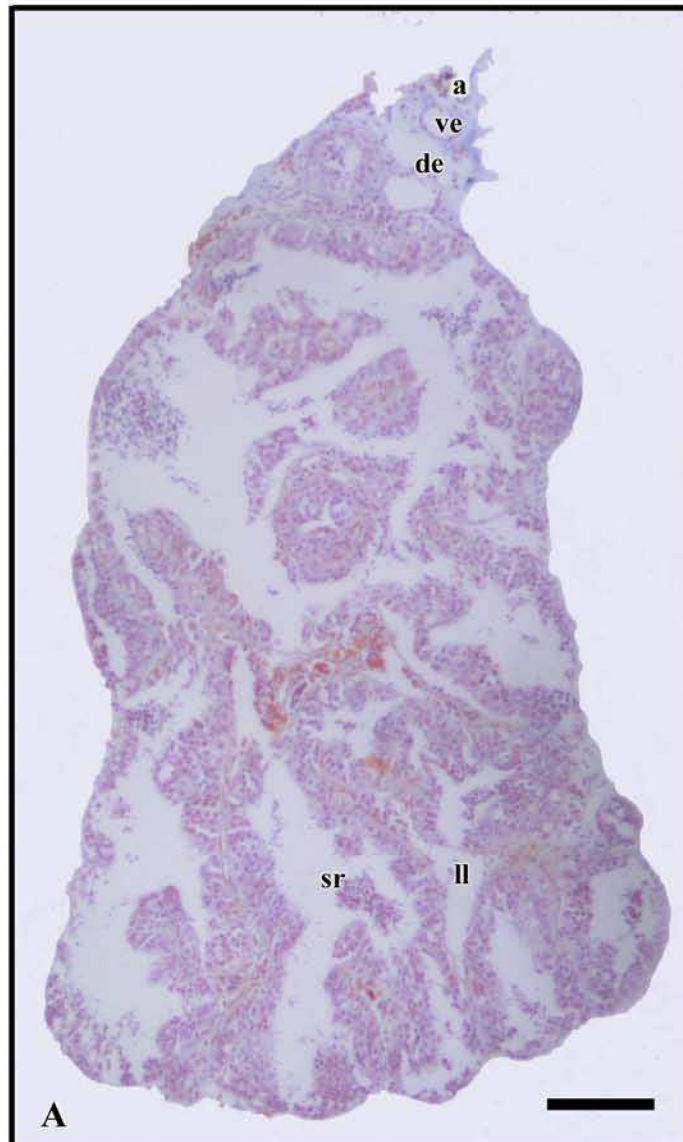


Fig. 24. Testículo de *C. dimerus* en regresión. A- Corte transversal , B- Detalle del lóbulo
 Barra: A 100µm, B 20µm. a, arteria; de, conducto eferente; egd, epitelio germinal
 discontinuo; ll, luz del lóbulo; SPGA, espermatoгония A; sr, esperma residual; ve, vena.

repoblando la gónada.

La clase regresión se observa sólo en aquellos machos que se encuentran fuera de la época reproductiva, los cuales predominan durante la estación de temperatura baja y fotoperíodo corto. Se distingue por la presencia de escasos espermatocistos, algunos de ellos aparentemente en degeneración. El EG discontinuo está compuesto principalmente de cS y SPGA dispersas que persisten luego de la última espermiación. Durante la regresión, la integridad lobular del testículo se observa fuertemente alterada. La presencia de espermatozoides residuales y granulocitos es frecuente (Fig. 24A,B). En esta clase, hay un decrecimiento del IGS, el cual alcanza sus valores mínimos (Fig.19).

Durante la estación de alta actividad reproductiva, cada ciclo pasa por las cuatro primeras clases. La clase regresada se superpone con la clase maduración tardía, por lo tanto, mientras los espermatozoides están siendo liberados, las espermatogonias es encuentran proliferando (Fig. 20D). La clase regresión ocurre únicamente al finalizar el período de reproducción y fue evidente en machos sexualmente inactivos durante la estación de baja actividad reproductiva.

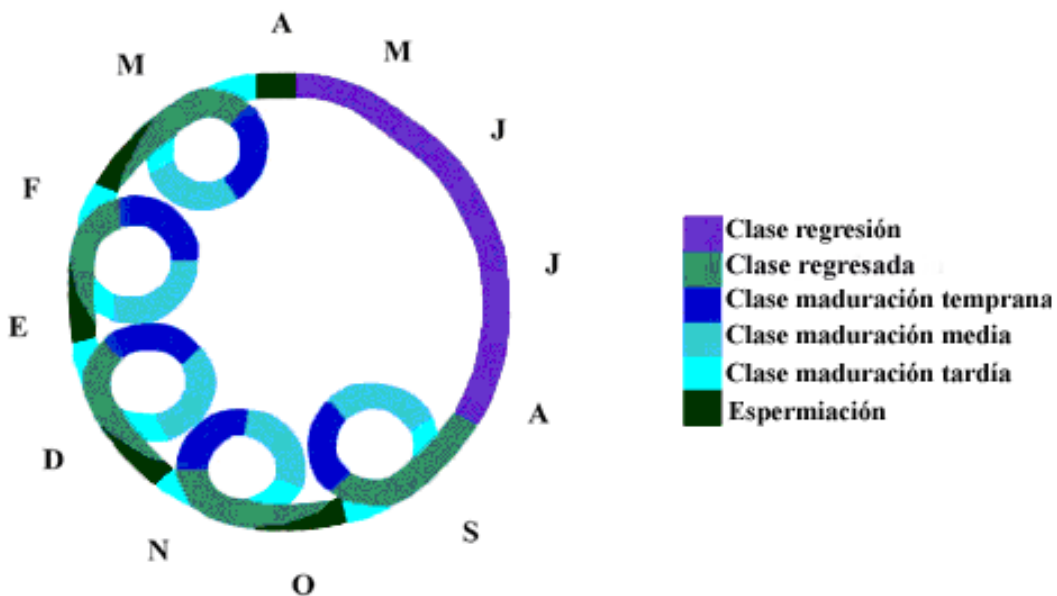


Fig. 25. Esquema del ciclo reproductivo anual de *C. dimerus*, mostrando la secuencia de las distintas clases reproductivas.

En el compartimento intersticial, las fibras colágenas, las células mioides y células de Leydig son fácilmente distinguibles a lo largo de todo el año. Sin embargo las células de Leydig se observan con mayor facilidad desde la fase proliferativa a la fase de maduración temprana, coincidiendo con la ausencia de espermatozoides en el testículo (Fig. 20A,C; 21B).

Discusión

Como en todos los vertebrados, los testículos de los peces están compuestos por dos compartimentos, el compartimento germinal y el intersticial. La espermatogénesis típica de peces y anfibios es del tipo cística (Mattei, 1993; Callard, 1991, 1996; Grier, 1993). En estos grupos la unidad funcional básica del epitelio espermatogénico es el cisto, formado por un grupo de cS que rodean y preservan un clon de células germinales que desarrollan sincrónicamente (Schulz y col., 2009). La estructura del testículo de *C. dimerus* corresponde al tipo lobular irrestricto (Grier, 1981). La distribución espermatogonial irrestricta se caracteriza por la presencia de espermatogonias a lo largo de todo el compartimento germinal (Grier y Uribe Aranzábal, 2009). En esta sección se estudiaron las características de los distintos estadios de las células germinales durante la espermatogénesis de especímenes adultos de *C. dimerus*, desde espermatogonia hasta espermatozoide. Se describieron dos tipos de espermatogonias. Las SPGA fueron las células más grandes, envueltas individualmente por células de Sertoli. Las SPGB se presentan en número de dos o más células por cisto, tienen un tamaño menor que el tipo anterior y se encuentran unidas entre sí mediante puentes citoplasmáticos. Las cS por lo tanto están en contacto con un único clon de células germinales sinciciales a lo largo de toda la espermatogénesis, como propuso Clérot en 1971. Los puentes citoplasmáticos se observan conectando las células germinales desde SPGB hasta SPD, la que más tarde, durante la espermiogénesis, elimina el exceso de citoplasma como cuerpo residual. Estos puentes serían los responsables del desarrollo sincrónico de las células germinales por permitir el intercambio de moléculas entre las células (Gilbert, 2003). Los SPCII son escasos y difíciles de observar, probablemente debido a su vida media corta ya que estas células completan rápidamente su división para dar SPD.

Las lamelas anulares se encuentran en células somáticas que se dividen rápidamente y en células germinales (Bozzola y Russell, 1992). En este estudio éstas fueron observadas en SPG y SPCI como un arreglo citoplasmático de cisternas de membrana apiladas. Además,

se observaron en estrecha asociación con la membrana nuclear, ya sea integrándose a ella o bien siendo liberada a partir de ella. La lamela anular contiene complejos de poro densamente empaquetados con una estructura similar a los complejos de poro de la membrana nuclear. Se cree que la función de la lamela anular es de almacenamiento de complejos de poro nuclear y por lo tanto de membrana nuclear (Stafstrom y Staehelin, 1984). Se discute si, durante la división celular, los trozos de la membrana nuclear fragmentada pueden llegar a ser eliminados de la membrana nuclear que se está reformando y entonces dar lugar a las lamelas anulares en el citoplasma o si se trata de membrana nuclear de repuesto para ayudar a las activas divisiones celulares que se están desarrollando. Por otro lado, Wallace y Selman (1990), postulan que estas lamelas derivan del RER dado que ellas frecuentemente se vieron continuas con dicha organela.

Otra organela característica de las células germinales es la “nuage”, que se presenta como un acúmulo de material electro-denso. Se asume que este material denso, está compuesto por ribonucleoproteínas de vida media larga y mRNA (Knaut y col., 2000; Houwing y col., 2007). Originalmente se pensaba que las “nuages” sólo se encontraban en las células germinales primordiales, sin embargo, también se observaron en oogonias, oocitos, espermatogonias, espermatocitos, y aún en espermátidas de peces (Billard, 1984; Quagio-Grassiotto y Carvalho, 1999; Grier, 2000; Guimaraes y Quagio-Grassiotto, 2001; Lo Nostro y col., 2003b; Ravaglia y Maggese, 2003). En *C. dimerus*, las “nuage” y sus agregados con mitocondrias están presentes desde SPGA hasta SPD, aunque son más representativas en SPGA y SPGB.

En todos los estadios de la espermatogénesis se observaron mitocondrias con crestas lamelares. Las SPGA en particular, también presentaron grandes cantidades de mitocondrias con forma de copa. Según Meijide y col. (2005) la forma de las mitocondrias en las células germinales indiferenciadas parece variar durante los estadios tempranos del desarrollo gonadal. Estas organelas tienen inicialmente forma de copa y poseen crestas tubulares. Subsecuentemente, la forma de las mitocondrias cambia a redonda o alargada, con las típicas crestas lamelares. Esta modificación en la estructura de las mitocondrias puede reflejar un proceso de maduración durante el desarrollo gonadal temprano. En este trabajo se ha observado que las mitocondrias en forma de copa se encuentran en las SPGA de los testículos de individuos adultos.

Los espermatozoides en esta especie corresponden a la categoría acuasperma anacrosomal tipo I. Ellos son liberados al agua, como sucede en peces de fecundación externa; carecen de acrosoma y resultaron de una rotación nuclear que se evidencia por que el eje flagelar es perpendicular a la base del núcleo (Mattei, 1970, 1991; Jamieson, 1991). Además, con microscopía óptica y MET se observó que son biflagelados. En estos casos ambos centriolos son utilizados como cuerpo basal para el desarrollo de los flagelos. Los espermatozoides biflagelados han sido descritos para unas pocas especies de peces teleósteos, incluyendo entre los perciformes al apogónido *Paranocheilus* sp., el zoárcido *Zoarces elongates* y el gobiesócido *Lepadogaster lepadogaster* (Jamieson, 2009). La existencia de SPZ con dos flagelos es aún más excepcional entre los cíclidos. Hasta lo que se sabe hoy, el único cíclido con esperma biflagelado descrito es *Satanoperca jurupari*, un hermafrodita autofecundante con espermatozoides del tipo intraesperma (Matos y col., 2002). El espermatozoide de *C. dimerus* presentó aletas laterales en ambos flagelos. En la pieza media, el plasmalema de cada flagelo desarrolla dos extensiones citoplasmáticas, las aletas, sobre lados opuestos de cada flagelo, una característica observada en la cola de los espermatozoides de distintas especies, incluyendo *S. jurupari* (Matos y col., 2002) y otros perciformes como *Boleophthalmus pectinirostris* (Gobiidae) (Chung, 2008). Las aletas laterales están presentes en la mayoría de los espermatozoides que fecundan externamente salvo en ostariofisios (clados Characiformes, Cypriniformes y Siluriformes) (Burns y col., 2009). El collar mitocondrial está formado por cuatro anillos de nueve mitocondrias redondas dando, en general, un número total de 36.

Quagio-Grassiotto y col. (2003) concluyeron que al menos tres características son observadas exclusivamente en el esperma de los cíclidos: 1) grupos compactos de cromatina filamentosa, 2) una fosa nuclear levemente excéntrica y 3) un alto número de mitocondrias, cerca de diez, que rodean el segmento inicial del flagelo. En este estudio, no se reconocieron ninguna de estas tres características. En *C. dimerus*, los espermatozoides presentan cromatina homogéneamente condensada, una fosa nuclear básicamente central y un número de mitocondrias que excede considerablemente el número de diez. La ultraestructura de los espermatozoides de distintas especies de cíclidos, deben ser analizadas para evaluar el significado filogenético de estos caracteres.

Los espermatozoides están rodeados por procesos de las cS que se unen lateralmente mediante desmosomas y uniones fuertes. Estos procesos envuelven totalmente a las células

germinales a lo largo de toda la espermatogénesis, aislándolas tanto de la membrana basal, claramente observable al MET, como de la luz del lóbulo. La membrana basal, estableciendo esta separación, es una constante a través de la evolución de los vertebrados.

En el citoplasma de las cS de *C. dimerus* se observaron espermatozoides fagocitados. Esta función constituye un mecanismo para eliminar el esperma residual. Dado que esta función la cumplen las cS, no sorprende el hecho de no haber encontrado centros melanomacrofágicos. Hallazgos similares se dieron en testículos de cobias, *R. canadum* (Brown-Peterson y col., 2002), confirmando que la fagocitosis del esperma por macrófagos es mucho menos común que la fagocitosis por cS (Scott y Sumpter, 1989). En el róbalo común, *C. undecimalis*, Grier y Taylor (1998) observaron que los espermatozoides residuales eran fagocitados por los centros melanomacrofágicos en machos postreproductivos.

Como es norma también para los teleósteos, las células de Leydig se encuentran en el componente intersticial del testículo de *C. dimerus*, en estrecha asociación con vasos sanguíneos y ubicadas en los espacios entre los lóbulos. Los vasos sanguíneos contienen elementos figurados (eritrocitos, trombocitos y cuatro tipos de leucocitos: linfocitos, monocitos, heterófilos y eosinófilos), cuyas características morfológicas serán descriptas en el capítulo II. Además de las células de Leydig, Polder (1971) describió otro tipo celular como componente del compartimento intersticial en esta especie (referida como *A. portalegrensis* en la literatura científica de esa época), las “células lipoides”. Ellas acompañaban a, pero diferían de las células de Leydig por la ausencia de gotas sudanófilas en cortes en gelatina coloreados con Negro Sudán y no mostraban ninguna correlación con el comportamiento reproductivo (Polder, 1971). En este estudio, estas células lipoides no fueron identificadas bajo microscopía óptica, sin embargo, a la luz del conocimiento actual, probablemente ellas sean estadios funcionales previos a las células de Leydig completamente diferenciadas y activamente secretoras. El contenido lipídico de las células de Leydig sufre cambios estacionales pronunciados en la mayoría de las especies de teleósteos, ya que son una de las principales fuentes de síntesis de esteroides gonadales (Chung 2008). Sin embargo no se observaron gotas lipídicas en las células de Leydig de *Thalosoma dupurrey* (Hourigan y col., 1991), *Esox lucius* (Grier y col., 1989), *Esox niger* (Grier y col., 1989) y *Oryzias latipes* (Gresik y col., 1973).

El epitelio germinal testicular consiste de células somáticas de Sertoli y de células germinales. El componente sertoliano cumple con los criterios para definirlo como un epitelio (Grier y Lo Nostro, 2000), ya que persiste como una monocapa después de la liberación del esperma a la luz lobular, mientras que los componentes germinales se vuelven aislados, constituyendo el “epitelio germinal discontinuo” (Grier y Taylor, 1998).

Grier y Taylor (1998) y Grier (2002) propusieron, en base a los criterios de los cambios en el epitelio germinal, entre continuo y discontinuo, y a los estadios de las células germinales presentes en el mismo, cinco clases reproductivas durante el ciclo anual reproductivo de los peces perciformes: regresada, maduración temprana, media y tardía (o final) y regresión. En este estudio, se pudieron identificar y describir para *C. dimerus* estas cinco clases reproductivas. Dado que esta especie es ponedora múltiple, ellas no se dan en una secuencia lineal a lo largo de todo el año como sería esperable en una especie con una única puesta anual. La estación de alta actividad reproductiva se extiende a lo largo de siete meses, desde septiembre hasta marzo, durante los cuales las puestas tienen lugar cada $29,4 \pm 16,2$ días, como resultado de un ciclo completo. En estos ciclos sucesivos, no todas las clases reproductivas están presentes, la clase regresión está ausente. Así, en cada estación de alta actividad reproductiva, después de la primera puesta de la serie de puestas que se den en ella, la clase regresada se superpone con la de maduración tardía, entonces, mientras los espermatozoides son liberados del cisto, las espermatogonias están proliferando. Esta simultaneidad se evidenció por la inmunodetección de células en proliferación durante el ciclo reproductivo. Por lo tanto, la clase regresada en *C. dimerus*, puede ser netamente definida al comienzo del período reproductivo, principalmente al final del mes de agosto, mientras que la clase regresión está presente en machos inactivos sexualmente, durante el período de reproducción baja (de abril a agosto). Una dinámica similar se observó en el róbalo común en el cual, la proliferación de las espermatogonias que se preparan para el siguiente evento reproductivo, comienza durante la clase de maduración temprana (Taylor y col., 1998).

En la literatura se encuentran diferentes términos y clasificaciones, para describir la condición reproductiva de los peces. La clasificación propuesta por Grier y Taylor (1998), que considera los cambios de las características histológicas de las gónadas y su

correlación funcional, es la mejor caracterizada. Basados en esta clasificación y con el ánimo de evitar conflictos de nomenclatura, Grier y Uribe Aránzabal (2009) propusieron recientemente que el término “maduración” fuera reemplazado por “desarrollo del epitelio germinal”. Además, la clase regresada fue referida muchas veces como “arrestada”. Sin embargo, Brown Peterson y col. (2002) sugirieron que este término no sea utilizado y acordando con Grier y Uribe Aránzabal (2009) afirmaron que el “estado de arresto” no se aplica a las gónadas de los peces ya que las gónadas de los teleósteos nunca “arrestan”. Para salvar estas diferencias, Brown Peterson y col. (2007) propusieron descartar el uso de los términos regresado y arrestado a favor de “regenerado”. En mi opinión, dado que la espermatogonia sufre rápidas divisiones mitóticas sucesivas durante la llamada clase regresada, referirla como “clase proliferativa” resultaría un término más apropiado y menos confuso ya que describe los eventos que ocurren en este período.

Asociado a los cambios en la época de cría a lo largo del año, el IGS comienza a aumentar en septiembre, al comienzo de la primavera y desciende a partir de abril, en pleno otoño cuando las temperaturas descienden y se acorta el fotoperíodo. Durante los meses de verano, la variabilidad en los valores del IGS fue mayor que en invierno. Esto se debió a los sucesivos ciclos que tienen lugar durante la estación reproductiva alta y por lo tanto los peces pudieron haberse sacrificado en distintas condiciones reproductivas. En contraste, durante el invierno, cuando la actividad reproductiva es mínima, la mayoría de los peces presentan testículos en clase regresión y así la variabilidad en los IGS fue consecuentemente menor.

En la naturaleza, probablemente *C. dimerus* presente una estación de cría más marcada y los eventos reproductivos no ocurran en la estación otoño/invierno. Bajo las condiciones de laboratorio utilizadas en el presente estudio, esta estacionalidad fue atenuada y por lo tanto se registraron eventos reproductivos durante todo el año. Sin embargo la actividad reproductiva fue mucho más baja durante los meses de menor temperatura, con esporádicos eventos de puesta sólo en algunas parejas y los testículos de la mayoría de los machos mostraron la condición de regresión, la cual raramente fue observada en la estación reproductiva alta.

La reproducción en *C. dimerus* está regulada tanto por la temperatura como por el fotoperíodo (Fiszbein y col., 2010) como ocurre en otros teleósteos (Bromage y col 2001;

Cinquetti y Dramas, 2003; Alvarenga y col., 2006; Batlouni y col., 2006; Singh y col., 2010), esto podría explicar los cambios en los IGS y las frecuencias de puestas registradas en este estudio.

Capítulo I Sección B

Efectos de la exposición al xenobiótico 4-tert-octilfenol sobre machos adultos de *Cichlasoma dimerus*

Introducción

Efectos de los contaminantes estrogénicos

Un amplio rango de sustancias químicas introducidas en el ambiente por las actividades del hombre puede producir efectos adversos en las poblaciones humanas y silvestres. El término químicos disruptores endocrinos (EDCs) es aplicado, como ya se mencionara, a un amplio rango de compuestos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas naturales del cuerpo, que regulan la homeostasis, reproducción, desarrollo y comportamiento (Nishi y col., 2002). Entre los EDCs, varios grupos de compuestos químicos tienen efectos semejantes a los estrógenos, denominándoseles xenoestrógenos. Los alquilfenoles polietoxilados (AFE) son una de las clases de surfactantes no iónicos más utilizadas en la manufactura de productos de limpieza, plásticos, pulpa y papel, textiles, agroquímicos, cosméticos y productos alimenticios (Routledge y Sumpter, 1997; Ying y col., 2002a). La degradación primaria de los AFEs en las plantas de tratamiento de desechos o en el medio ambiente genera AFEs de cadena corta y alquilfenoles (AFs), más persistentes, tal como el 4-tert-octilfenol (OF), uno de los más activos biológicamente (Ying y col., 2002a).

Se han encontrado concentraciones de metabolitos de AFE, incluyendo OF y NF, en efluentes de aguas de desecho tratadas, en rangos desde menos de 0,1 µg/l a 369 µg/l en Estados Unidos, entre 6 µg/l y 343 µg/l en España y por encima de 330 µg/l en Inglaterra (Ying y col., 2004). Para América Latina, los análisis de concentraciones de estos compuestos son escasos. Para el sudoeste de San Pablo, Fielder y col. (2006) determinaron concentraciones de AF promedio de 5 µg/kg de peso seco con el OF como alquilfenol predominante. En Argentina, Babay (comunicación personal, 2009) determinó concentraciones de 100 ng/l para muestras de agua del Río de La Plata y de 3 ng/l para las del Lago Nahuel Huapi.

Se sugirió que los niveles de metabolitos de AFEs presentes en el ambiente acuático tal vez superan el umbral necesario para inducir alteraciones endocrinas en organismos silvestres. Estos resultados, concernientes a los efectos sobre la salud humana y el ambiente, son de conocimiento público (Ying y col., 2002a y b). En estudios previos realizados en laboratorio y en el campo se analizaron los efectos de los AFs. Usualmente en estos

trabajos se aplican NF y OF ya que aproximadamente el 80% de los AFs encontrados en el ambiente acuático son NF (Ying y col., 2002a) y el 15 % OF (Bennet y Metcalfe, 1998). La trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, expuesta a concentraciones relevantes OF presenta una reducción en el crecimiento testicular (Jobling y col, 1996) e inducción de la síntesis de Vtg (Pedersen y col., 2003). En medaka, *Oryzias latipes*, el NF tiene una incidencia del 86% en la formación de ovotestis (Gray y Metcalfe, 1997) y el OF inhibe la espermatogénesis de modo tal que los testículos presentan espermatogonias pero no producen espermatoцитos ni espermatozoides. Así mismo, se detectó una correlación entre los niveles de Vtg en suero y el aumento de la concentración del xenoestrógeno (Gronen y col., 1999). Resultados similares se observaron para el róbalo, *Platichthys flesus*, especie en la que se produjo formación de gónadas intersexo (Allen y col, 1999) e inducción de Vtg (Madsen y col., 2006). Se demostró también en el bacalao, *Gadus morhua*, que los AFs influenciaron cambios en las concentraciones plasmáticas de hormonas sexuales e interfirieron con la maduración de los órganos sexuales (Meier y col., 2007). En *C. dimerus*, el OF tiene un efecto estrogénico débil sobre el proceso de diferenciación sexual, con la aparición de un reducido porcentaje de machos intersexos (Meijide, 2007).

Regulación de la espermatogénesis

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es una molécula altamente conservada entre especies de vertebrados y tiene un rol crucial en el control de eventos neuroendocrinos y funciones reproductivas. El rol principal de este neuropéptido es mediar la liberación de gonadotrofinas por parte de la hipófisis. Las gonadotrofinas, luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), son las hormonas hipofisarias más importantes en regular la fisiología testicular. En mamíferos, LH regula la producción de esteroides sexuales por parte de las células de Leydig y FSH regula las actividades de las células de Sertoli, consistente en ser el soporte estructural, nutricional y regulatorio (paracrino) de las células germinales en desarrollo. Las gonadotrofinas de los peces son hormonas esteroideogénicas potentes (Planas y col., 1993). Una explicación posible para la estimulación de la esteroideogénesis de las células de Leydig mediada por FSH es asumir que en los peces, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, las células de Leydig expresan receptores para FSH (FSHR). En el bagre africano, tanto las células de Leydig

como las de Sertoli expresan el gen de FSHR mientras que el receptor para LH (LHR) sólo se expresa en células en Leydig (García-López y col., 2008).

Hay datos disponibles sobre los niveles plasmáticos de LH en distintas especies de peces, sin embargo, la información para los niveles plasmáticos de FSH está restringida sólo a especies de salmónidos (Prat y col., 1996; Gomez y col., 1999; Campbell y col., 2003). En estas especies, los niveles plasmáticos de LH son muy bajos o indetectables durante el comienzo del desarrollo testicular (etapa de proliferación espermatogonial), y se vuelve detectable cuando las células germinales entran en meiosis. Por otro lado, los niveles de FSH aumentan claramente en asociación con la proliferación espermatogonial, decrecen antes de la estación reproductiva y vuelven a aumentar con la espermiación (Campbell y col., 2003).

Las divisiones mitóticas de las espermatogonias se pueden categorizar en una lenta renovación espermatogonial y una rápida proliferación de espermatogonias destinadas a iniciar el camino hacia la meiosis. La renovación de las espermatogonias está regulada por estradiol (E2) en distintas clases de vertebrados. Estudios realizados en la anguila japonesa (Miura y col., 1999), el hucho japonés (Amer y col, 2001) y el medaka (Song y Gutzeit, 2003), entre otros, indican claramente que el E2 es también una hormona masculina y juega un papel fundamental en la renovación de las células madre espermatogoniales. El E2 induce la expresión de genes blanco en las células de Sertoli, vía sus receptores nucleares. Los factores traducidos desde estos genes resultan reguladores de la renovación espermatogonial (Fig. 26).

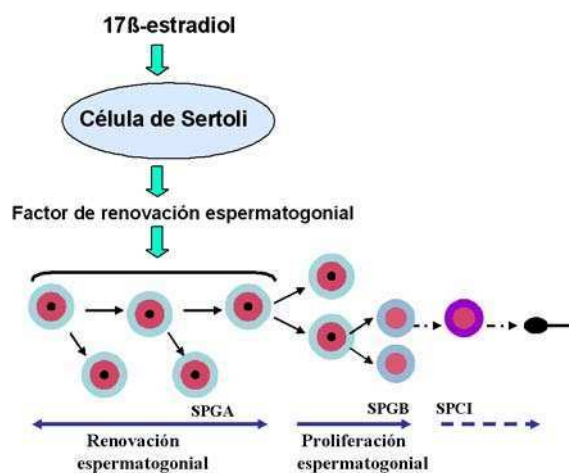


Fig.26. Esquema resumido del posible mecanismo de control de la renovación espermatogonial en peces. Modificado de Schulz y col. (2009)

Para la anguila japonesa, Miura y col. (2003, 2007) identificaron al eSRS34 (homólogo del factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas de mamíferos-PD-ECGF) como un factor de renovación de células madre espermatozonales; así como para el besugo, fueron los fibrinógenos FgB y FgG (Pinto y col., 2006); o para trucha el GSDF (factor derivado de la región somática de la gonada), miembro de la superfamilia TGF (factor de crecimiento transformante β), (Sawatari y col., 2007; Lareyre y col., 2008).

Bajo estimulación gonadotrófica, la mitosis espermatozonal se dispara entonces, desde un camino de lenta autorenovación a una rápida proliferación hacia meiosis, y es a este punto al que se lo refiere como el inicio de la espermatogénesis (Schulz y col., 2009). FSH es el principal regulador durante los estadios tempranos de la espermatogénesis mientras que LH está principalmente involucrada en la maduración de los estadios finales (Fig. 27).

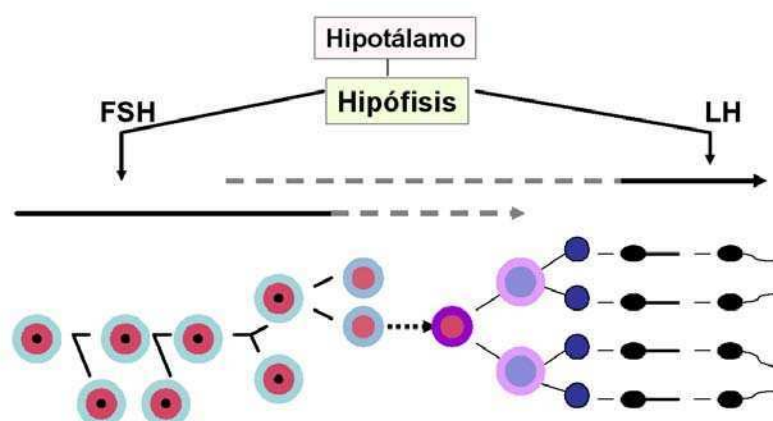


Fig.27. Resumen esquemático del rol de FSH, regulando principalmente la fase mitótica, y de LH, regulando principalmente el proceso durante la fase espermiogénica de la espermatogénesis de peces. Modificado de Schulz y col. (2009).

La inducción hormonal de la espermatogénesis involucra la estimulación de las células de Leydig por gonadotrofinas para producir 11-cetotetosterona (11-KT), el principal andrógeno de los peces teleósteos (Miura y col., 1991a), que activa a las células de Sertoli para que se complete la espermatogénesis. La acción de la 11-KT es mediada por otros factores producidos por las células de Sertoli que a diferencia de las células germinales expresan proteínas receptoras de andrógenos (Ikeuchi y col, 2001). Algunos de estos son factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) y la activina B. En la anguila japonesa, la 11-KT es necesaria para la inducción de la espermatogénesis,

mientras que IGF1 es necesario para la continuación del proceso (Nader y col, 1999). Miura y col. (1991a, 2002) encontraron, para esta misma especie, dos miembros de la superfamilia TGF β , el AMH (factor inhibidor Mülleriano) y la activina B, que juegan un rol fundamental en la iniciación de la espermatogénesis inducidos por 11-KT (Fig. 28). Se observó que la activina B induce la proliferación de las espermatogonias pero es incapaz de inducir meiosis o etapas más avanzadas del desarrollo (Miura y col., 1995). Para otras especies se identificó a AMH como relacionado con el control del desarrollo de las gametas antes de la iniciación de la espermatogénesis en peces, resultando un factor inhibidor de la proliferación rápida de las espermatogonias e inhibiendo la meiosis (Rodríguez-Marí y col., 2005; Halm y col., 2007; Pala y col., 2008, así como Morinaga y col., 2007 y Shiraishi y col., 2008).

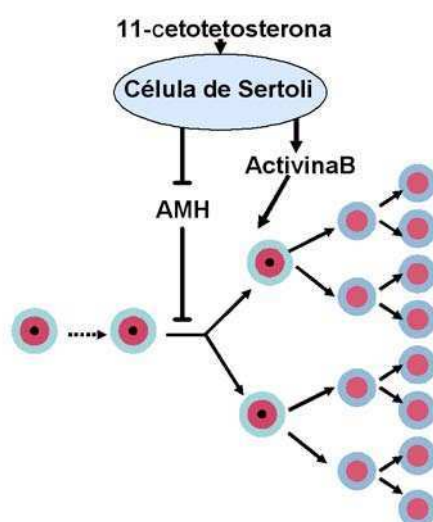


Fig.28. Esquema resumido del posible mecanismo de control del inicio de la proliferación espermatogonial hacia la meiosis en peces. Modificado de Schulz y col. (2009).

Después de la proliferación mitótica, las espermatogonias tipo B entran en la profase meiótica y se diferencian en espermatoцитos primarios. La principal progestina de los peces, DHP (17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona), es indispensable para la iniciación de la meiosis en la espermatogénesis (Fig. 29). DHP y su receptor nuclear están presentes en el testículo en un estadio temprano de la espermatogénesis y DHP induce replicación de ADN en espermatogonias y la expresión de marcadores específicos de meiosis como Dmc1 y Spo11, induciéndolas a entrar en la profase meiótica.

Durante la estación reproductiva, los machos de teleósteos muestran importantes cambios en los niveles plasmáticos de distintas hormonas, los cuales se inician por un incremento en la secreción de LH. Esta gonadotropina induce un aumento en la producción de esteroides testiculares como 11-KT y DHP, los cuales claramente están involucrados en regular la espermiación en peces (Milla y col., 2008; Miura y col., 1991b).

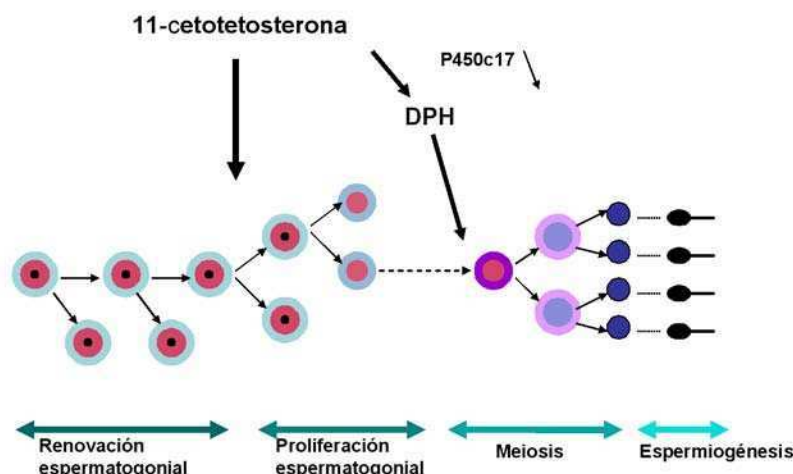


Fig. 29. Esquema resumido de la relación entre 11-KT y DPH en la regulación de la espermatogénesis. 11-KT puede inhibir la expresión de P450c17 facilitando la producción de DPH. Modificado de Schulz y col. (2009).

Vitelogenina (Vtg)

Vtg es una fosfolipoglicoproteína compleja de alto peso molecular producida normalmente en el hígado de las hembras maduras de peces en respuesta a un aumento de los niveles de estrógenos circulantes que precede a la puesta (Arukwe y col., 2000). Básicamente, los estrógenos se unen a una proteína transportadora SHBG (globulinas fijadoras de hormonas esteroideas), entran al hepatocito y se unen al receptor de estrógenos (RE). Este receptor citoplasmático se encuentra como monómero asociado a la hsp90 (proteína de choque térmico 90). En presencia de ligando, el RE se disocia de la hsp 90, se dimeriza y se transloca al núcleo. De este modo se induce la expresión de determinados genes, entre otros los de Vtg, y sus mensajeros se traducen y modifican en el RER. Las proteínas ya modificadas son liberadas al torrente sanguíneo para ser transportadas hasta el ovario,

donde la Vtg circulante es tomada por los oocitos en crecimiento y es un constituyente del vitelo, el cual servirá como fuente de nutrientes para el embrión en desarrollo (Fig. 30).

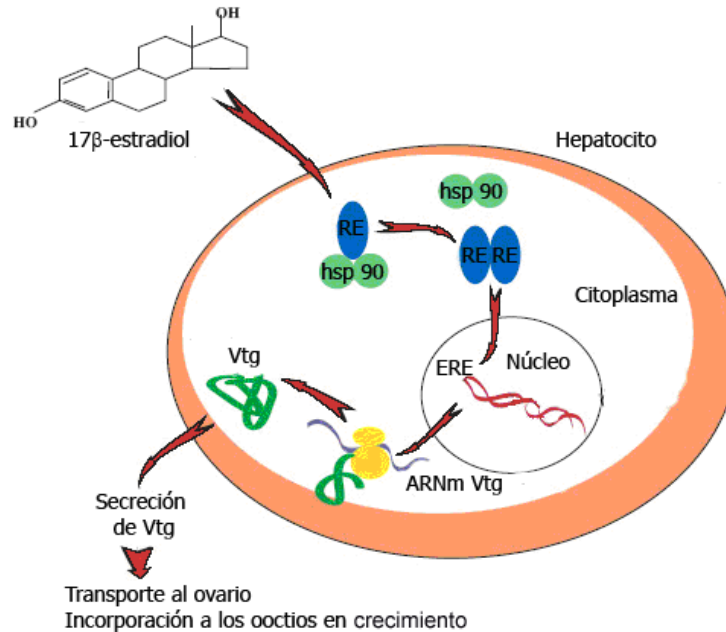


Fig 30. Esquema de la síntesis de vitelogenina (Vtg) en el hepatocito de una hembra adulta de peces teleosteos. ERE, elemento de respuesta a estrógenos; hsp90, proteína de choque térmico 90; RE, receptor de estrógenos. Modificado de Arukue y Goksøyr (2003).

Los peces machos adultos normalmente no producen Vtg, pero ellos poseen el receptor hepático para estrógenos y el gen de la Vtg, que está usualmente silente. Por lo tanto, la síntesis de Vtg en machos puede ser inducida por tratamiento con xenoestrógenos (Flouriot y col., 1997; Gronen y col., 1999; Ackerman y col., 2002; Park y col., 2003; Van den Belt y col., 2003; Knoebl y col., 2004; Meucci y Arukwe, 2005; Arukwe y Røe, 2008). Varias investigaciones de campo han registrado detección de Vtg en plasma de peces macho expuestos a efluentes industriales y domésticos (Sumpter y Jobling, 1995; Harries y col., 1997; Wahli y col., 1998; Nichols y col., 1999; Hashimoto y col., 2000; Folmar y col., 2001). Estos efluentes son conocidos por llevar un amplio rango de compuestos químicos estructuralmente diversos con la capacidad de ejercer acciones estrogénicas. La detección de Vtg en el mucus superficial se ha sugerido como un medio de determinación del sexo en peces donde el dimorfismo sexual está ausente o como un método para evaluar el estado de

madurez de las hembras (Kishida. y col, 1992; Kishida y Specker, 1994, 2000; Takemura y Oka, 1998). Además, se ha propuesto que la posibilidad de detectar Vtg en el mucus superficial podría ser una herramienta exitosa para monitorear la presencia de contaminantes estrogénicos en el ambiente (Moncaut y col., 2003; Meucci y Arukwe, 2005; Van Veld. y col., 2005; Maltais y Roy, 2007; Arukwe y Røe, 2008). Por otro lado, el hígado de los teleósteos es uno de los órganos más sensibles para mostrar alteraciones bioquímicas, fisiológicas y estructurales después de la exposición a distintos tipos de contaminantes ambientales (Hinton y Couch, 1998; Andersson y col., 2007; Pérez Carrera y col., 2007).

C. dimerus es una especie representativa de los teleósteos en la cuenca del Río de La Plata y resulta relevante para los ecosistemas ribereños de Argentina. Debido a la ausencia de estudios respecto de los efectos de los estrógenos ambientales en peces Perciformes de agua dulce en América del Sur, y sabiendo que la especie resulta un modelo dúctil para estudios de laboratorio, incluyendo exámenes ecotoxicológicos, es que se pusieron a prueba en esta sección las siguientes hipótesis.

Hipótesis

- 1.- La exposición crónica de machos de *C. dimerus* a 4-tert-octilfenol (OF), induce síntesis de vitelogenina, altera los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas, inhibe el crecimiento testicular, produce anormalidades en el testículo y da lugar a intersexos.
- 2.- Los efectos estrogénicos del OF se manifiestan de manera concentración-dependiente.
- 3.- La concentración de OF en el agua de ensayo decae con el tiempo, así las concentraciones experimentales reales son menores que las nominales.
- 4.- Tras ensayos de depuración, los peces manifiestan una recuperación de la patología generada por la exposición al xenoestrógeno.

Objetivos

- 1.- Analizar el efecto de la exposición a OF sobre las características reproductivas de machos de *C. dimerus*, utilizando como parámetros finales de evaluación los niveles de vitelogenina en plasma y mucus superficial y las características histológicas de hígado y testículo.
- 2.- Determinar si los efectos a la exposición varían según la concentración del compuesto en el agua de ensayo.
- 3.- Evaluar la caída en la concentración de OF en el agua de ensayo a lo largo del tiempo.
- 4.- Analizar si los efectos de la exposición crónica se revierten al transferir a los peces a agua libre de OF.

Materiales y Métodos

Los individuos adultos de *C. dimerus* utilizados en este estudio se aclimataron durante un mes a las condiciones de laboratorio luego de la captura y antes de dar inicio a los experimentos, que se implementaron durante los meses de noviembre y diciembre, estación de alta actividad reproductiva.

La sustancia a ensayar, el 4-tert-octilfenol (OF) (Anexo II) (pureza 97%), se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las concentraciones de OF utilizadas en los experimentos se seleccionaron en base a estudios preliminares para otras especies de peces teleósteos y un ensayo de toxicidad aguda sobre la especie de estudio (CL 50-96 h, concentración letal 50 a 96 h).

Ensayo de toxicidad letal aguda

Con el objeto de determinar el intervalo de concentraciones a ser utilizadas en los ensayos de toxicidad, se realizó un ensayo preliminar de búsqueda de rango. Para ello, un total de 30 individuos adultos (Peso total = $39,7 \pm 1,9$ g) se distribuyeron en acuarios de vidrio de 40 l bajo condiciones reguladas de temperatura, fotoperíodo y características del agua (Anexo III). Se dispusieron a razón de 5 peces por pecera de experimentación, las cuales carecían

de grava en el fondo y elementos de ornamentación, a fin de minimizar la superficie de adsorción del compuesto a evaluar. Las concentraciones nominales de exposición fueron: 250, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/l}$ de OF, más los grupos control y control de solvente. El recambio del agua de ensayo se realizó cada 24 h durante 4 días. Se preparó una solución madre de OF disuelto en etanol absoluto, a partir de ésta se añadieron a los acuarios las alícuotas necesarias para obtener las concentraciones deseadas de OF. La concentración del solvente no superó el 0,01 % (v/v). La solución madre se hizo una única vez y durante el transcurso del ensayo se almacenó a 4°C en oscuridad. Los peces no fueron alimentados durante el transcurso del experimento. Se registró la mortalidad diariamente, retirando los ejemplares en los que no se observaba movimiento opercular.

En base a los resultados obtenidos y trabajando de manera similar, se realizó la determinación de la CL50 del OF para individuos adultos de esta especie (N= 60, peso total = $41,3 \pm 2,4\text{g}$). Las concentraciones nominales seleccionadas fueron: 400, 500, 600 y 700 $\mu\text{g/l}$ de OF, más un control de solvente. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, ubicando 4 ejemplares por acuario. La mortalidad se registró cada 24 h. A partir de estos registros se calculó la CL50 aplicando una transformación Probit (Finney, 1971).

Ensayos subcrónicos

Un total de 32 peces (24 machos y 8 hembras) se pesó y se midió su longitud total (LT) (hembras: $27,14 \pm 8,95\text{g}$ y $10,5 \pm 1,17\text{ cm}$; machos: $50,15 \pm 11,50\text{g}$ y $12,78 \pm 0,98\text{ cm}$). Los peces se ubicaron en acuarios de 100 l a $26,5 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,3, con 12:12 h de fotoperíodo y una densidad promedio de 3,6 g/l. Los acuarios estaban bien aireados y provistos de una capa de grava en el piso. Los peces se alimentaron una vez por día con alimento comercial peleteado (Tetra®).

Previamente al comienzo de la exposición, grupos de tres machos y una hembra se transfirieron a acuarios de 50 l bajo las mismas condiciones físicas y alimenticias con excepción de la capa de grava sobre el fondo, la cual fue removida. Antes de dar inicio al tratamiento, los animales fueron aclimatados durante una semana a las nuevas condiciones. Los peces se expusieron a concentraciones nominales de 0 (control de solvente: etanol 0,01%), 30, 150 y 300 $\mu\text{g/l}$ OF. Los tratamientos se hicieron por duplicado. La exposición a OF fue realizada durante 60 días bajo condiciones semiestáticas, efectuando

los cambios del agua de ensayo dos veces por semana (cada 84 h promedio). Las soluciones madre se prepararon una vez por semana, disolviendo el OF en alcohol etílico 100% y se almacenaron en oscuridad a 4°C. Durante cada renovación de agua, pequeñas alícuotas de solución madre se adicionaron al agua de ensayo con el objeto de obtener las concentraciones deseadas de OF y de modo tal que la concentración del solvente no superara el 0,01 % (v/v).

Al final del experimento, se tomaron cuidadosa y rápidamente, muestras de mucus y de sangre, luego que los peces fueran sedados con “fish calmer” (dosis: 4 gotas/l; ingredientes activos: acetona, dimetilcetona, alfa metil quinolina; Jungle Hypno, USA). El mucus se obtuvo raspando la superficie del cuerpo con una espátula de acero inoxidable y depositándolo en tubos de microcentrífuga conteniendo igual volumen de buffer fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4 con Tween 20 y 2,5µl de PMSF 1mM (fenilmetilsulfonil fluoruro, un inhibidor de proteasas). Después de la centrifugación a 2500g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se separó y almacenó a -20°C. La sangre periférica se extrajo de la vena caudal con una aguja heparinizada de un calibre de 25 x ½ pulgada, unida a una jeringa de 1 ml. A cada muestra se le adicionaron 2,5µl de PMSF. Para obtener el plasma, se las centrifugó a 2500g por 15 min a 4°C y los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C. Inmediatamente después, los peces fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia, y el hígado y las gónadas fueron rápidamente removidos. Las muestras se fijaron para subsecuentes exámenes histológicos e inmuno histoquímicos.

El experimento se repitió al año siguiente en la misma época, respetándose en todo los protocolos aplicados.

Determinación de las concentraciones reales de OF en el agua de ensayo

Una situación común en los experimentos de laboratorio es la gran discrepancia existente entre las concentraciones nominales y las medidas en los exámenes químicos del agua de ensayo. Por lo tanto, con el objeto de evaluar la evolución temporal de las concentraciones reales de OF, éstas se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia molecular, siguiendo la aproximación de Ahel y Giger (1993) y Ahel y col. (1985).

La columna empleada fue una PRP-1 de 250x4,1 mm, tamaño de partícula 10µm y poro de

100Å de diámetro (Hamilton, USA), y la elusión fue hecha con una mezcla de metanol/agua 80:20, a un tasa de flujo de 0,8 ml/min. El detector fue acondicionado a una longitud de onda de excitación de 230 nm y a una de emisión de 300 nm. Se tomaron muestras de 50ml de agua de los acuarios control y de los de concentración nominal de 150µg/l OF cada 24 h durante la última semana del experimento. En frascos de vidrio oscuro y con el agregado de 0,5ml de formaldehído 37% v/v, se preservaron en heladera hasta su procesamiento. El mismo consistió de una extracción del contenido de materia orgánica en fase sólida (SPE) sobre columnas de C18 con elusión de metanol, antes de la inyección en el HPLC. Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa Konikrom 5.2 (Konik Instruments, Spain). Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibración de área de pico en función de la concentración, empleando el método de cuadrados mínimos a partir de la inyección de soluciones estándar, las cuales se prepararon diariamente adicionando cantidades conocidas de OF al agua de los recipientes control y procesadas de igual modo que las muestras. Para cada conjunto de muestras replicadas se calcularon la media y la desviación estándar después de la interpolación del área del pico cromatográfico de OF en la curva de calibración ($R^2=0,99$).

Inmunoblot

Las muestras de plasma y mucus superficial se analizaron por electroforesis vertical en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS/PAGE) usando un gel concentrador (5%) y un gel separador (8%), seguida por Western blot (WB). Las muestras fueron diluidas en buffer conteniendo Tris/ClH 0,3M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 12%, β-mercaptoetanol 11% y azul de bromofenol 0,2%. Cantidades iguales de proteínas (20µg), medidas por el método de Lowry y col. (1951), se cargaron en cada calle. La masa molecular se estimó utilizando un estándar de masa molecular precoloreado (Invitrogen), sembrado en paralelo en una calle por cada gel. La corrida electroforética se realizó a 100V constantes hasta que el frente de corrida alcanzara el extremo del gel. Posteriormente a la separación por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Pharmacia) por 90 min a 4°C y 100V en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 187 mM, metanol 20% (v/v)). Las uniones de membrana inespecíficas se bloquearon con TTBS (Tris-ClH 100 mM, NaCl 0,9%, Tween

20, 0,1%, pH 7,5) en leche en polvo descremada 5%, toda la noche a 4°C. Para la inmunodetección de las Vtg, las membranas fueron incubadas con un antisuero primario anti-Vtg de perca generado en conejo (donado por el Dr. Bernhard Allner, Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie, Wiesbaden, Alemania; Hennies y col., 2003) en una dilución 1:3000 en TTBS, por 90 min a temperatura ambiente. Este antisuero ya demostró ser efectivo para detección de Vtg en *C. dimerus* (Moncaut y col., 2003). Después de 5 min de lavado en TTBS, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con biotina (Vector Lab., Burlingame, CA, USA), diluido 1:1000, por 1 h y lavadas otra vez, seguido por incubación con ABC (complejo avidina-biotina-peroxidasa) (Dako, Carpintería, CA, USA) diluido 1:3000 por 1 h en oscuridad, para amplificar la señal de la inmunomarca. La inmunoreactividad se reveló incubando con 3,3' diaminobenzidina (DAB) 0,1% en buffer Tris 0,1M, pH 7,6 y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0,02%. Como controles específicos se realizaron la preadsorción del antisuero con Vtg pura de carpa comercial (Biosense Lab A.S., Norway) antes de la incubación y la omisión del antisuero primario. Así mismo, muestras de plasma y mucus superficial (20–30µg de proteína) se cargaron directamente en la membrana de nitrocelulosa para realizar la técnica de Dot blot (DB). Una vez secas las membranas, el bloqueo inespecífico, la incubación y la inmunodetección, se realizaron trabajando como se describió anteriormente para la técnica de WB. Se efectuó un control negativo por omisión del antisuero primario.

Inmunohistoquímica

Las piezas de hígado se fijaron en formaldehído 10% (pH 7,4) en buffer fosfato 0,1M a temperatura ambiente, se incluyeron en parafina y se seccionaron a 6µm en micrótopo.

Los cortes fueron desparafinados, hidratados, lavados por 10 min en PBS 0,1mM, pH 7,6, y luego tratados con H₂O₂ 3% por 10 min para bloquear la actividad de la enzima peroxidasa endógena. Después del lavado, los cortes se trataron con bloqueador de proteínas (leche descremada en polvo, 5% en PBS) por 40 min. Posteriormente se incubaron con antisuero primario, anti-Vtg de perca diluido 1:500 por 1 h. Luego, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Sigma Chemical Co., USA) diluido 1:300 por 1 h y a continuación fueron incubados con el complejo ABC (Vector Lab.) por 1 h. Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. La

inmunodetección se visualizó utilizando DAB 0,1% en buffer Tris 0,1M, pH 7,6 y H₂O₂ 0,02%. Los cortes se contrastaron débilmente con hematoxilina de Carazzi, se deshidrataron y montaron con DPX como medio anhidro. Las micrografías se tomaron con un fotomicroscopio Nikon Microphot FX. Los cortes control fueron tratados con PBS en lugar del antisuero primario.

Microscopía óptica

Para las técnicas histológicas estándar, piezas de ovarios, testículos e hígados fueron fijadas en líquido de Bouin por 12 h a 4°C y luego preservadas en alcohol etílico 70%. Las muestras se incluyeron en parafina o glicol metacrilato (Leica Historesin) y se seccionaron a 6µm y 4µm, respectivamente. Los cortes se colorearon con Hematoxilina–Eosina (H&E). Otras pequeñas piezas de gónadas se fijaron en glutaraldehído 3% en buffer fosfato 0,1M, pH 7,4, post-fijadas en tetróxido de osmio 1% en buffer fosfato 0.1M (pH 7,4) por 2 h e incluidas en resina Spurr. Los cortes semifinos de 2 µm fueron coloreados con azul de toluidina. Las micrografías se tomaron con un fotomicroscopio Nikon-Microphot FX.

Hormonas esteroideas

Se tomaron muestras de sangre de animales control y machos expuestos (n= 3 por tratamiento) al iniciarse el ensayo (t₀), a los 30 días de exposición (t₃₀) y al finalizar el mismo (t₆₀). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 15 min para la obtención de plasma (sobrenadante). La cuantificación de esteroides utilizando sistemas heterólogos fue tercerizada. Para ello, los plasmas se fraccionaron y 200µl se conservaron a -20°C hasta su envío al Centro de Estudios Microbiológicos y Análisis Clínicos (CemLab, provincia de Buenos Aires). Los niveles de testosterona (T, Active® Testosterone RIA DSL44000, Diagnostic System Laboratorios, Inc., Webster, TX, EE.UU.) y estradiol (E₂, cobas® Estradiol II, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) en plasma se midieron mediante radioinmunoensayo y electroquimioluminiscencia respectivamente.

Los denominados “niveles de testosterona” en este trabajo refiere a niveles de andrógenos, ya que el anticuerpo utilizado en la cuantificación presenta un 45% de reacción cruzada con 11-cetotestosterona, uno de los andrógenos más comunes en peces.

Ensayos de recuperación

Se realizaron dos ensayos subcrónicos en los que se evaluó si los efectos inducidos por OF en los testículos eran reversibles. A la vista de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se eliminó, en esta etapa, la concentración de exposición a 30 µg/l OF.

Ensayo 1: Se utilizaron 15 peces que se dispusieron a razón de 5 ejemplares (4 machos y 1 hembra) en acuarios de 50 l bajo las mismas condiciones utilizadas en los ensayos subcrónicos. Una vez aclimatados, los animales se expusieron durante 60 días, bajo condiciones semiestáticas (con recambio cada 84 h promedio) a las siguientes concentraciones: 0 (control solvente), 150 y 300 µg/l. Transcurrido el período de tratamiento, se renovó el medio por agua libre de OF, en la que los peces se mantuvieron con un recambio realizado también cada 84 h. Al día 30 en agua sin compuesto se sacrificaron 2 machos por tratamiento y sus gónadas se procesaron para evaluación histológica, el resto de los peces se mantuvieron en medio libre de OF y se evaluó su comportamiento reproductivo a lo largo del tiempo.

Ensayo 2: Se trabajó con un total de 35 peces que se ubicaron a razón de 4 machos y una hembra por acuario de 50 l. Luego del período de aclimatación los peces se expusieron, de la manera habitual, a: 0, 150 y 300 µg/l de OF (con un único acuario control y 3 réplicas por cada concentración). Transcurridos los 60 días de tratamiento, se renovó el medio por agua libre de OF, con recambios realizados también cada 84 h. A intervalos de 7 días (7, 14 y 21 días), se sacrificó un macho de cada pecera y sus gónadas se procesaron para evaluación histológica. Los peces restantes se mantuvieron para completar la evaluación testicular y estudiar su capacidad reproductiva (formación de parejas, puesta y eclosión de larvas).

Análisis estadístico

Para determinar si hubo diferencias en el peso y la longitud de los animales, como consecuencia de la exposición al compuesto en estudio, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas estableciendo el nivel de significancia en $P < 0,05$. El análisis de los datos se realizó mediante el uso del programa Statistica 7.

Resultados

Ensayo de toxicidad letal aguda

El valor de CL50-96h (umbral de letalidad incipiente, Anexo IV a) de OF para adultos de *C. dimerus* calculado por el método Probit fue 547,21 µg/l con un límite superior de 581,51 µg/l y otro inferior de 512,02 µg/l. Los valores de mortalidad de los organismos de las tres réplicas correspondientes a cada concentración se trataron conjuntamente. Los valores de la mortalidad por concentración y los resultados del método se presentan en el Anexo IV b. Los valores de LOEC (del inglés: lowest observed effects concentration; concentración más baja a la que se observan efectos) y NOEC (del inglés: no observed effects concentration; concentración más alta a la que no se observan efectos) para mortalidad estimados a partir de las concentraciones ensayadas coincidieron con las dos concentraciones más bajas de la serie, es decir 500 y 400 µg/l respectivamente.

En los tratamientos control no se registró mortalidad y los individuos presentaban aspecto y comportamiento saludables. En la concentración de 400 µg/l, si bien la supervivencia fue del 100%, se registraron alteraciones consistentes en aletargamiento y pérdida de equilibrio. Los individuos que sobrevivieron al tratamiento de 500 µg/l presentaron efectos adversos como aletargamiento, pérdida de equilibrio y se curvaban lateralmente, ante estímulos externos reaccionaban espasmódicamente; en ésta y en concentraciones mayores, esta sintomatología se exacerbaba y los individuos morían.

Supervivencia y crecimiento durante la exposición subcrónica

Todos los peces, tanto los control como los expuestos a OF sobrevivieron al ensayo subcrónico. El análisis estadístico indicó que el peso y la longitud de los individuos en los diferentes tratamientos no varió significativamente durante el curso del experimento ($P > 0,05$). Sin embargo, más allá de la mitad del período de tratamiento, se observó que los peces resultaron progresivamente indiferentes a la oferta de alimento en los acuarios con concentraciones de 150 y 300 µg/l del compuesto.

Detección de vitelogenina (Vtg)

Se realizó una identificación cualitativa de Vtg usando técnicas de Western blot (WB) y Dot blot (DB). La Vtg fue detectada en hembras vitelogénicas y en todos los peces tratados con OF. En los machos control, como era esperado, no se observaron las correspondientes bandas de proteínas (Fig. 31). En el WB del plasma de las hembras control vitelogénicas, la Vtg apareció como una banda mayor de 115 kDa y tres bandas adicionales de 158, 99 y 73 kDa (Fig. 31A). Sin embargo sólo las bandas correspondientes a 115 y 73 kDa fueron encontradas en las muestras de mucus (Fig. 31B). La Vtg se detectó tanto en el plasma como en el mucus superficial de los peces machos expuestos a OF, donde además de las cuatro bandas de Vtg antes mencionadas, se observaron otras bandas inmunoreactiva (ir) para Vtg (Fig. 31A, B).

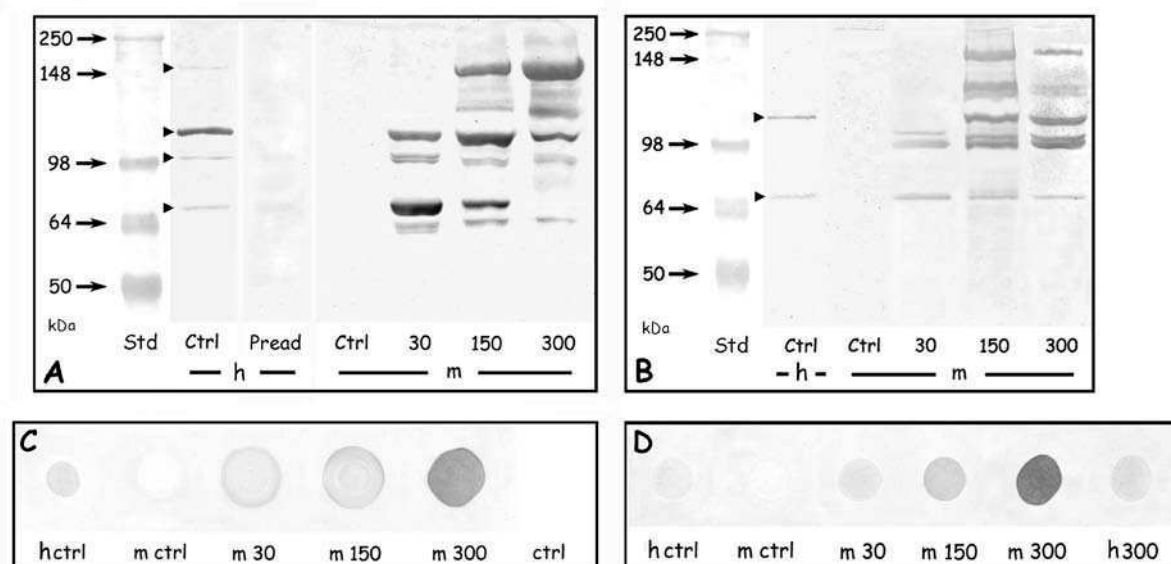


Fig. 31. Inmunodetección de Vtg en muestras de plasma y mucus de adultos de *C. dimerus* expuestos a 0 (Ctrl), 30, 150 y 300 $\mu\text{g/l}$ de OF durante 60 días. Western blot en plasma (A) y mucus (B). Cada calle representa el plasma o el mucus superficial de un individuo representativo. Las puntas de flecha indican Vtg de hembras vitelogénicas control. El reemplazo del antisuero primario por TTBS suprimió la inmunoreactividad para Vtg (no mostrado). Std: estándar de masa molecular de amplio rango precoloreado; Pread: control de preadsorción. Cuando el plasma de las hembras control fue preadsorbido con Vtg fue evidente la supresión de la inmunoreactividad. El análisis por Dot blot reveló la presencia de Vtg en plasma (C) y en mucus superficial (D) en hembras control (h ctrl) y machos (m) y hembras (h) tratados. Ctrl, control negativo. La omisión del antisuero primario resultó en la ausencia de inmunoreactividad.

El análisis de DB demostró ser un método exitoso y fácil para detectar la presencia de Vtg, puesto que permitió inmunodetección de esta proteína en las muestras de plasma y mucus de los machos expuestos a OF (Fig. 31C, D).

En los cortes de hígado de los machos control no se observó ninguna inmuno reacción para Vtg (detalle de Fig. 32A). En cambio, los cortes de hígado de las hembras y de los machos tratados con OF mostraron cantidades sustanciales de Vtg-ir acumulada. En los machos expuestos a 30 $\mu\text{g/l}$ de OF, la ir-Vtg estuvo sólo presente en el sistema vascular hepático (detalle de Fig. 32B), mientras que los machos tratados con 150 ó 300 $\mu\text{g/l}$ de OF presentaron grandes cantidades de material ir-Vtg ocupando el citoplasma de los hepatocitos (detalle de Figs. 32C, D).

Histología hepática

C. dimerus posee hepatopáncreas, un rasgo común entre ciertas familias de teleósteos. Bajo el microscopio óptico, el parénquima hepático de los machos control mostró un ordenamiento longitudinal de los hepatocitos que aparecían como cordones ordenados alrededor de los sinusoides. Las células hepáticas tenían forma poliédrica con núcleo basal y usualmente un nucleolo. La membrana nuclear resultó débilmente basófila mientras que el citoplasma contenía principalmente material eosinófilo. En el citoplasma de los hepatocitos se evidenció una cantidad moderada de lípidos. Por esta razón, el método de H-E demostró la presencia de muchas estructuras vacuoladas dentro de estas células (Fig. 32A). El tejido pancreático aparece alrededor de los vasos sanguíneos mayores esparcido entre el tejido hepático.

La inspección macroscópica del hepatopáncreas de los machos tratados con OF demostró que éste era más blando, más friable y claro que aquel de los machos control. Su examen histológico reflejó que los elementos celulares presentaban características asimilables a las del período de vitelogénesis activa en las hembras. A bajas concentraciones de OF, el parénquima hepático no difirió de aquel de los animales control (Fig. 32A, B). A altas concentraciones de OF, el núcleo de los hepatocitos estaba ligeramente agrandado. Las células aparecían hinchadas y su citoplasma mostraba mayor basofilia, mientras que el delineamiento celular resultó confuso, desplegando formas irregulares (Fig. 32C, D).

Histología gonadal

El examen histológico de los testículos reveló efectos adversos progresivos sobre la

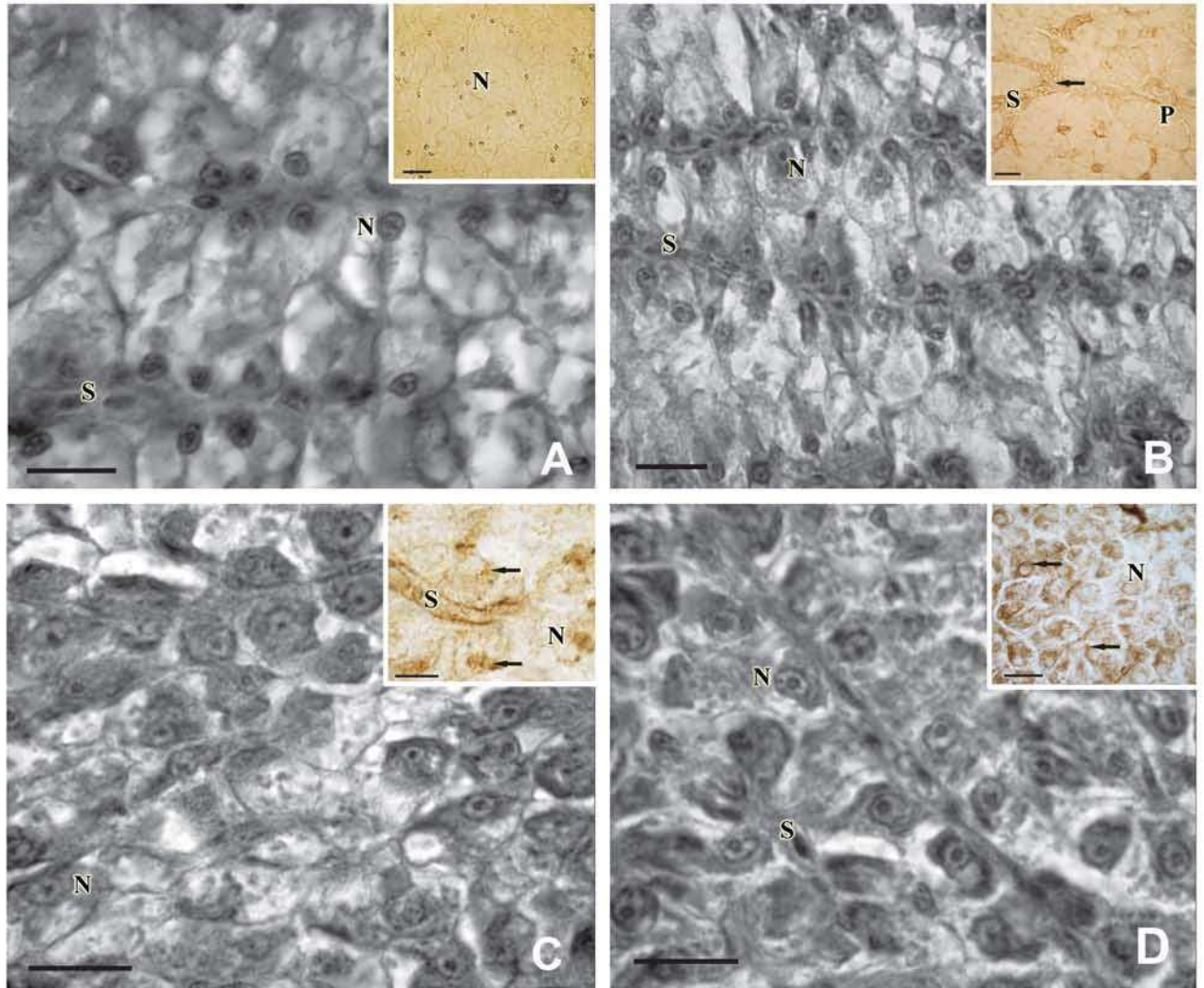


Fig. 32. Corte transversal de hígado. (A) control y (B-D) machos tratados con 30 µg/L, 150 µg/L y 300 µg/L de OF. H&E. En el parénquima hepático, los hepatocitos presentan un arreglo longitudinal alrededor de los sinusoides. Los hepatocitos muestran una morfología alterada y un aumento de la basofilia a concentraciones progresivamente mayores de OF. Detalles: muestran la localización de material acumulado inmunoreactivo a Vtg (flechas). N, núcleo del hepatocito; P, células pancreáticas; S, sinusoides. Barras: 15 µm (A-D), 16 µm (detalles).

estructura testicular como consecuencia de la exposición a concentraciones crecientes de OF. En las réplicas del mismo tratamiento se observaron características morfológicas similares. En los testículos de los peces control, estaban presentes todos los estadios de la espermatogénesis (Fig. 33A). Los lóbulos testiculares contenían tanto espermatogonias como numerosos espermatocistos con estadios tempranos (espermatocitos) y tardíos (espermátidas) de la espermatogénesis. Se observó preponderancia de esperma en la luz lobular, mientras que en la pared lobular se encontraban espermatogonias y espermatocistos con espermatocitos (Fig. 33A, B). Los testículos de los machos expuestos a 30 $\mu\text{g/l}$ de OF presentan características semejantes a aquellos de los controles (Fig. 33C, D). En los machos expuestos a 150 $\mu\text{g/l}$ de OF, los testículos preservaron su estructura lobular pero se observó un aumento de fibrosis intersticial. Dentro del epitelio germinal los espermatocistos eran más difíciles de identificar. Sin embargo, se observaron tanto espermatogonias como espermatocitos y espermátidas. Además se identificaron granulocitos eosinófilos (Fig. 33E, F). El tejido gonadal de los machos tratados con 300 $\mu\text{g/l}$ de OF reveló una desorganización de la estructura lobular, así como ausencia de espermatocistos. La mayor parte de los testículos presentó aspecto de sacos limitados por abundante tejido intersticial fibroso y presencia de esperma en la luz. Más aún, la anormalidad de la espermatogénesis fue evidenciada por la progresiva degeneración del epitelio germinal. Las células de Sertoli presentaban aspecto escamoso y se podían encontrar algunas espermatogonias dispersas a través del epitelio germinal remanente (Fig. 33G, H).

Los ovarios de las hembras tratadas con OF no se diferenciaron histológicamente de los ovarios de las hembras control.

Comportamiento reproductivo

Los peces control mostraron el comportamiento reproductivo típico de la especie, con formación de pareja y eventos de puesta acordes a la época del año y a la situación de ensayo. En el tratamiento de 30 $\mu\text{g/l}$ de OF el registro de puestas descendió marcadamente mientras que a concentraciones mayores los peces modificaron su comportamiento de modo tal que en ningún caso se registraron eventos reproductivos (Fig. 34).

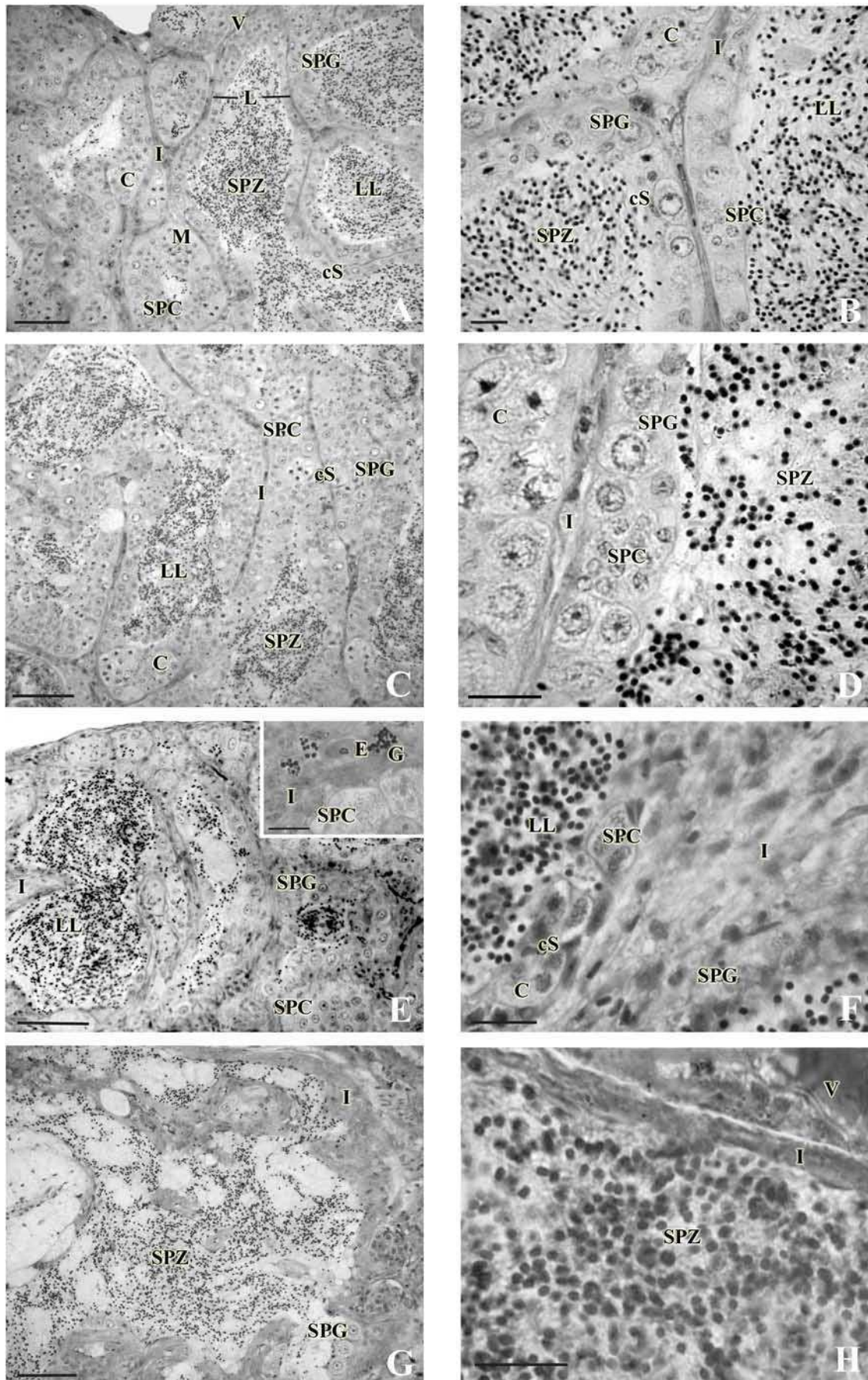


Fig. 33. Corte transversal de testículo de machos (A, B) control y (C–H) tratados con OF. Los testículos de los controles (A, B) y de los expuestos a 30 µg/L OF (C, D) mostraron una arquitectura lobular con cistos que contienen todos los estadios de la espermatogénesis. En los testículos de los machos tratados con 150 µg/L OF se observa fibrosis intersticial (E, F), mientras que aquellos expuestos a 300 µg/L de OF evidencian un desarreglo de la organización lobular y una espermatogénesis anormal con ausencia de cistos (G, H). C: cisto, cS: célula de Sertoli, I: tejido intersticial, L: lóbulo, LL: luz lobular, M: célula en división, SPC: espermatocito, SPG: espermatogonia, SPZ: espermatozoides, V: vaso sanguíneo. Barra: 60µm (A, C, E, G); 15 µm (B, D, H, F). Coloraciones: H&E (A–H). Detalle: muestra granulocitos coloreados con azul de toluidina; barra: 8µm. E: eritrocito; G: granulocito.

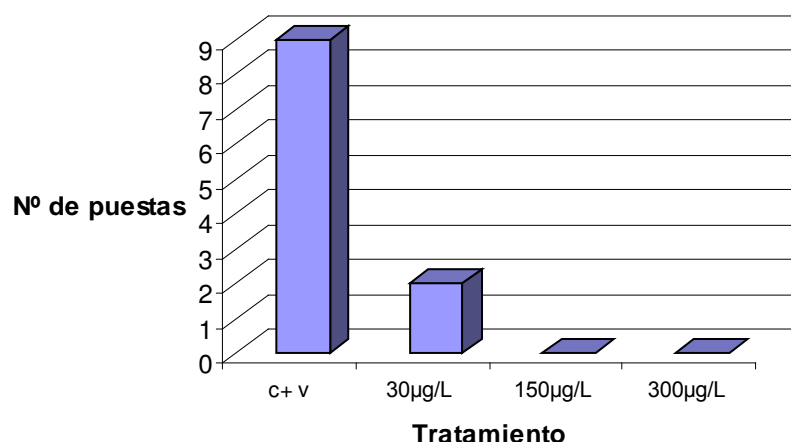


Fig. 34. Número de eventos reproductivos totales registrados durante el ensayo subcrónico.

Concentración de OF en el agua

En la tabla 1 se indican las concentraciones de OF medidas en réplicas de muestras de agua de ensayo tomadas cada 24 hs del grupo tratado con la concentración nominal de 150 µg/l. Las concentraciones iniciales de OF nominal y real estuvieron en gran concordancia. La concentración real de OF descendió con el tiempo. En las muestras tomadas a las 72hs, la concentración de OF declinó marcadamente a, aproximadamente un 20% de las concentración inicial. No se detectó OF en las muestras de los grupos control.

Concentración nominal de OF		150 µg/l
Tiempo (h)	Concentración real (µg/L)	%
0	151,1 ± 0,8	100,7 ± 0,6
24	59,7 ± 2,5	39,8 ± 1,7
48	49,5 ± 0,6	33,0 ± 0,4
72	30,8 ± 1,7	20,5 ± 1,1

Tabla 1. Concentraciones reales de OF en el agua de acuario durante la última semana del experimento. Las mediciones se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 hs tras la adición de OF. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de las concentraciones obtenidas en dos muestras del tratamiento con 150 µg/l. En % se indican los valores de la concentración de OF medidos, expresados como el porcentaje de la concentración nominal.

Hormonas esteroideas

En general, las concentraciones plasmáticas basales de las hormonas esteroideas estudiadas, T y E₂, mostraron considerables variaciones individuales. Sin embargo, los resultados obtenidos tras el tratamiento con OF evidencian una clara influencia sobre los niveles en sangre de ambas hormonas, los cuales mostraron una importante caída con el transcurso del tiempo de exposición (Fig. 35).

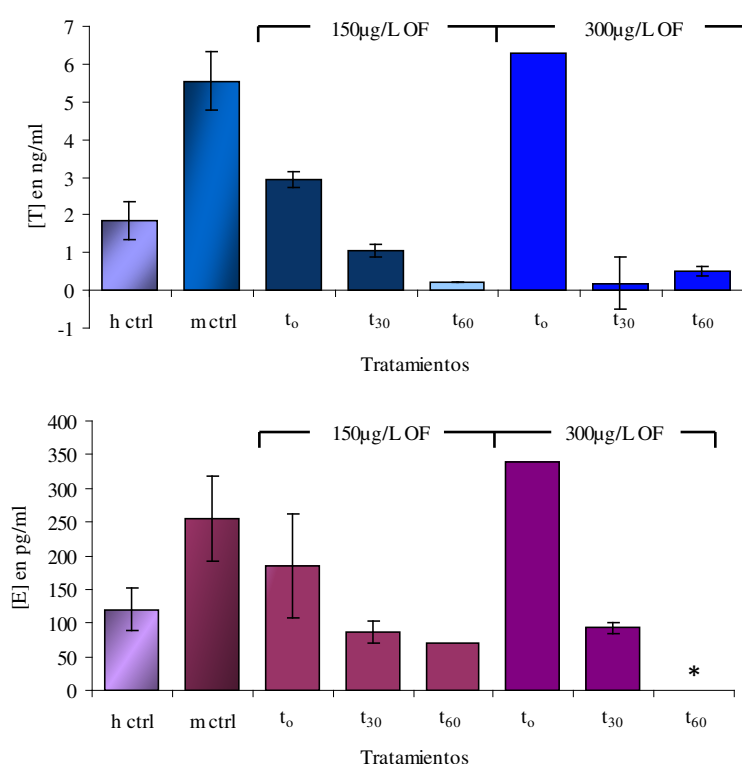


Fig. 35. Concentraciones plasmáticas de T y E₂ en animales control y machos tratados con 150 y 300 µg/l de OF expresadas como media ± DS. h ctrl, hembra control; m ctrl, macho control; t₀ valores iniciales; t₃₀ valores a los 30 días de exposición; t₆₀ valores al finalizar el período de exposición; (*) ausencia de registro.

Ensayo de recuperación

El estudio histológico de los testículos de peces transferidos a agua limpia, tras haber sido tratados con OF, mostraron una sorprendente recuperación. En el primer ensayo se observó que los testículos de machos mantenidos 30 días en medio prístino presentaban un aspecto

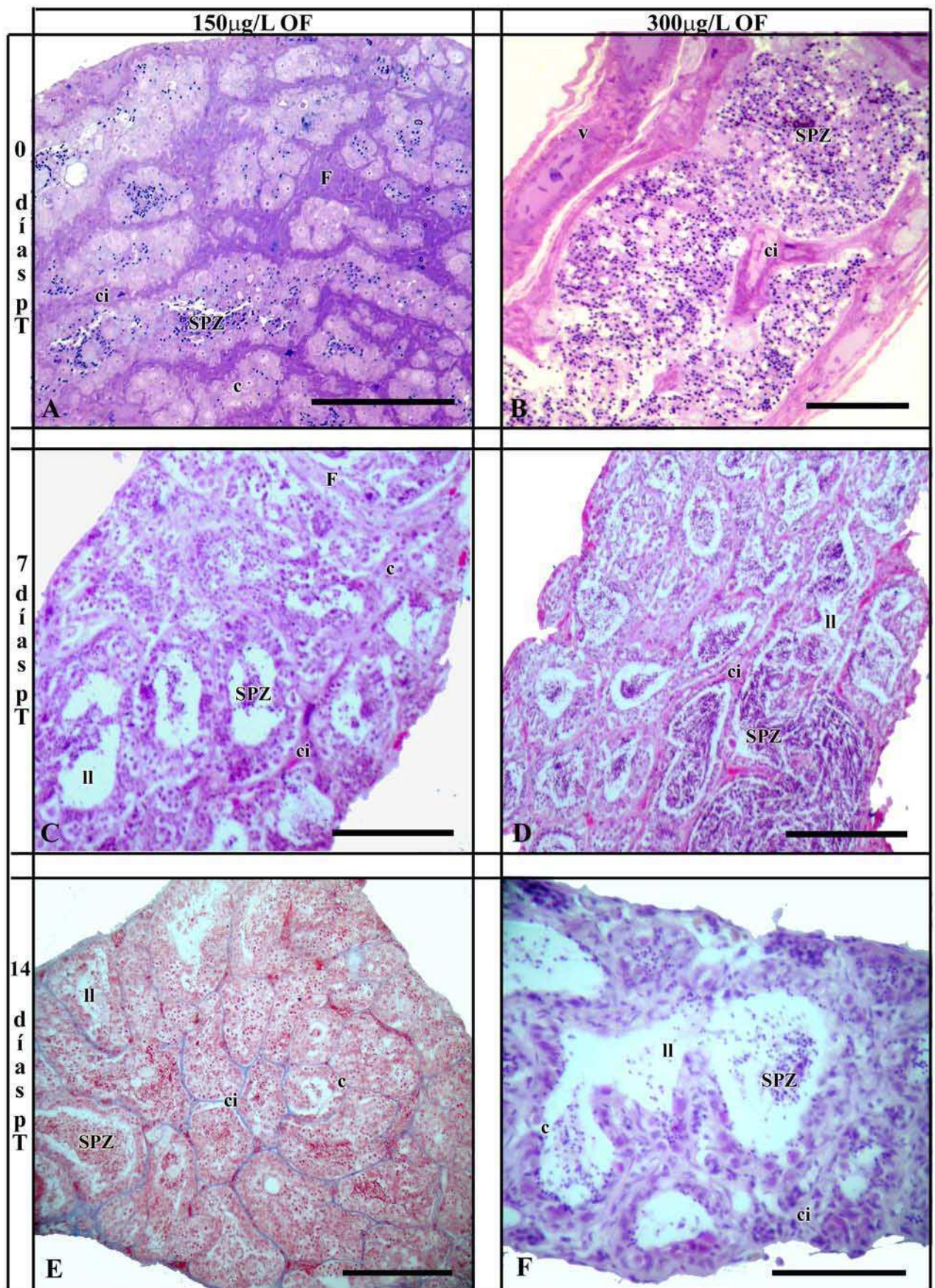


Fig. 36. Cortes de testículos de *C. dimerus* mostrando la recuperación histológica a la exposición a las distintas concentraciones de OF tras los distintos tiempos, en días, en agua libre de la sustancia ensayada. c: cisto, ci: compartimento intersticial, F: fibrosis, ll: luz del lóbulo, pT: post-tratamiento; SPZ: espermatozoides. Barra: 100 μ m.

histológico normal, independientemente del tratamiento, comparable al de los individuos del control de solvente. En este grupo control, la actividad reproductiva fue típicamente alta durante todo el experimento. En los recuperados de la concentración de 150 $\mu\text{g/l}$ OF, no se registró formación de parejas y hubo que separar a los individuos por las interacciones agresivas generadas entre ellos. Durante el proceso de depuración, los individuos tratados con 300 $\mu\text{g/l}$ OF no tardaron en formar pareja y se obtuvo una puesta exitosa (con eclosión de larvas) a los 54 días.

En el segundo ensayo, los animales expuestos a 150 $\mu\text{g/l}$ de OF, mostraron a nivel histológico una disminución gradual de la fibrosis testicular a partir del séptimo día post-tratamiento, hasta la recuperación total al día 21 (Figs.36A, C y E). En machos tratados con 300 $\mu\text{g/l}$ de OF la organización testicular lobular irrestricta comenzó a restablecerse a partir del séptimo día en agua libre de compuesto. El proceso de depuración permitió que el epitelio germinal comenzara a proliferar a partir de las escasas espermatogonias y células de Sertoli remanentes del tratamiento (Figs.36B, D y F).

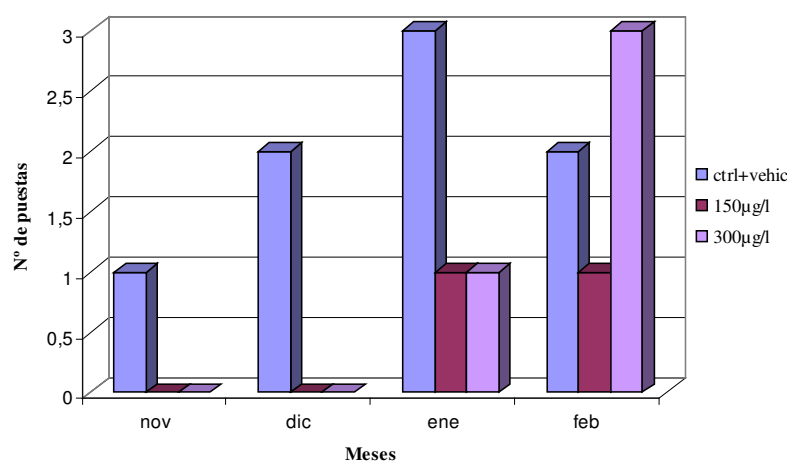


Fig. 37. Número de puestas exitosas registradas en parejas recuperadas del tratamiento con OF, a lo largo del tiempo en agua libre de compuesto (meses: enero/febrero). c+v: tratamiento control-vehículo; 150 $\mu\text{g/l}$ y 300 $\mu\text{g/l}$: concentraciones de OF de los tratamientos.

El estudio de la capacidad reproductiva se siguió en las tres parejas formadas en medio libre de OF, una por cada tratamiento. La funcionalidad testicular se evidenció a los 28 días en medio libre de OF, cuando se registró el primer desove viable. La primer puesta de oocitos fue registrada a los 6 días en medio libre de OF, sin embargo los machos no tuvieron

capacidad fecundante y esos oocitos murieron. Esta situación se repitió tres veces más, hasta el día 28, en el que las dos parejas depuradas de los tratamientos con el xenoestrógeno, lograron huevos viables. Los individuos iniciaron así el ritmo reproductivo esperable para la época del año en que se realizaron los experimentos (noviembre/diciembre: época de alta actividad reproductiva) (Fig. 37).

Discusión

En el presente estudio, la exposición de machos adultos de *C. dimerus* al xenobiótico OF indujo la presencia de vitelogenina tanto en el plasma como en el mucus superficial. Además, se evidenció daño testicular después del tratamiento con altas concentraciones de OF. Estos resultados confirman que, en esta especie, el OF imita los efectos del 17β -estradiol (Moncaut y col., 2003), estimulando la síntesis de Vtg y por lo tanto actúa como un xenoestrógeno. Diversos efectos estrogénicos del tratamiento con OF fueron registrados en especies de varios órdenes de teleósteos: Cyprinodontiformes, guppy (*Poecilia reticulata*) (Bayley y col., 1999); Beloniformes, medaka (*Oryzias latipes*) (Gronen y col., 1999; Knörr y Braunbeck, 2002); Siluriformes, bagre marrón (*Ameiurus nebulosus*) (Holland Toomey y col., 1999); Cypriniformes, pez cebra (*Danio rerio*) (Van den Belt y col., 2001, 2003); Salmoniformes, trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Van den Belt y col., 2003); Pleuronectiformes, lenguado (*Platichthys flesus*) (Madsen y col., 2006). Dentro de los Perciformes sólo tres especies fueron estudiadas: el gobio (*Pomatoschistus minutus*) (Robinson y col., 2004), la viudita (*Zoarces viviparus*) (Rasmussen y Korsgaard, 2004; Andreassen y col., 2005; Rasmussen y col., 2005) y el silago (*Sillago japonica*) (Yoon y col., 2008), todos ellos marinos. Hasta donde se sabe, este es el primer registro de las acciones del OF en un pez perciforme de agua dulce y sudamericano.

En este estudio, la Vtg de *C. dimerus* se detectó utilizando un antisuero heterólogo generado contra Vtg de la perca (*Perca fluviatilis*) (Hennies y col., 2003). La validación de las reacciones cruzadas está basada en el hecho de que tanto *C. dimerus* como *P. fluviatilis* son Perciformes. En las hembras vitelogénicas, la preadsorción del antisuero con Vtg resultó en una marcada disminución de la inmunoreactividad para todas las bandas inmunoreactivas, confirmando la especificidad del antisuero para Vtg. Además, el antisuero probó ser efectivo para la detección de Vtg en otras especies no Perciformes

(Hennies y col., 2003; Allner, com. pers.). Los patrones de inmuno-reactividad mostraron una reacción específica sólo en las muestras de hembras vitelogénicas y en los machos expuestos a OF, mientras que las muestras de los machos control y de las hembras no vitelogénicas no presentan inmunoreactividad.

En las muestras de plasma de las hembras vitelogénicas control se detectaron una banda principal de 115 kDa y tres adicionales de 158, 99 y 73 kDa, mientras que en el mucus sólo estuvieron presentes las bandas de 115 y 73 kDa. La expresión de Vtg en esta especie parece ser altamente dependiente del momento del ciclo reproductivo en el cual se toman las muestras, por lo cual el plasma y el mucus de hembras control no vitelogénicas no mostraron la presencia de Vtg. Dado que los ciclos ováricos en *C. dimerus* son relativamente cortos y que los intervalos entre puestas suelen ser tan breves como de 29 días promedio, se esperaba que las hembras estuvieran en diferentes estadios de la vitelogénesis hacia el fin de los 60 días del período de exposición, lo cual explicaría la presencia o ausencia de Vtg en hembras, según la etapa del ciclo ovárico en la que se encontraban al momento de extraer la muestra. En *C. dimerus*, la proteína ir-Vtg principal tiene una masa molecular (115 kDa) ligeramente menor que en otras especies de teleósteos como trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) (Johnsen y col., 1999), carpita cabezona (*Pimephales promelas*) (Parks y col., 1999), espadita (*Xiphophorus maculatus*) (Kinnberg y col., 2000), pez cebra (*D. rerio*) (Segner y col., 2003), carpita (*Phoxinus oxycephalus*) (Park y col., 2003), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Meucci y Arukwe, 2005) y el catostómido (*Moxostoma hubbsi*) (Maltais y Roy, 2007), en los cuales los rangos de la masa molecular de Vtg van de 134 a 200 kDa. En los machos expuestos a altas concentraciones de OF, además de la proteína de 115 kDa resultó evidente una banda ir-Vtg de 158 kDa. Esta proteína podría corresponder a precursores de Vtg de alto peso molecular que no se procesaron totalmente, siendo liberados a la circulación por el tratamiento con altas concentraciones de OF. Por otra parte, en muchos estudios se observa con frecuencia la presencia de bandas ir-Vtg adicionales de bajo peso molecular, que son habitualmente ignoradas cuando se realizan los análisis de WB. Estas proteínas podrían corresponder a productos de degradación de la Vtg. La estabilidad de esta fosfolipoproteína de alto peso molecular es muy variable entre especies; en algunas es altamente estable, mostrando sólo una banda inmunoreactiva con la técnica de WB, mientras que en otras especies se detectan bandas adicionales similares a las presentes en

este estudio, sugiriendo una alta labilidad de la Vtg (Silversand y col., 1993; Parks y col., 1999; Brion y col., 2000; Hennies y col., 2003). Algunas de estas bandas adicionales también pueden representar variantes de Vtg, ya que se han descrito al menos dos genes de Vtg en teleósteos (Utarabhand y Bunlipatanon, 1996; Matsubara y col., 1999).

La presencia de Vtg en muestras de mucus de animales tratados podría deberse al hecho de que la piel puede servir como ruta de excreción, ya que en los machos, esta proteína carece de un sitio donde depositarse (ovario) y elevadas concentraciones de Vtg circulante podrían agotar la vía normal de eliminación. La acumulación de altas cantidades de Vtg en el cuerpo tanto de peces macho como hembra puede tener efectos nocivos, ya que altas concentraciones de Vtg han sido asociadas con fallas renales y tasas aumentadas de mortalidad (Herman y Kincaid, 1988). Arukwe y Røe (2008) encontraron que el tratamiento con nonilfenol en salmón del atlántico no sólo causó la presencia de Vtg en la piel, sino también la expresión de Vtg y del mRNA del receptor de estrógenos en células epidérmicas. Esto sugiere que la piel, sumado a su rol de vía de excreción del excedente de Vtg, es también capaz de sintetizar Vtg en respuesta a xenoestrógenos. Se sabe que las larvas de algunas especies de peces cíclidos se alimentan del mucus epidérmico de sus parentales, tanto el macho como la hembra (Noakes, 1979). En estas especies, la Vtg está presente en el mucus superficial de los padres (Kishida y Specker, 1994) junto con otras sustancias no-nutrientes como prolactina, hormona de crecimiento y tiroxina (Schütz y Barlow, 1997). Aunque este comportamiento de mordisqueo de las larvas está limitado a pocas especies de teleósteos, la presencia de Vtg en el mucus superficial podría ser evolutivamente significativa y estar relacionada con la nutrición.

En peces machos, la producción de proteínas precursoras de vitelo es considerada un biomarcador sensible de exposición a compuestos estrogénicos (Sumpter y Jobling, 1995). La presencia de Vtg se evalúa usualmente en muestras de plasma sanguíneo. En este estudio, se amplían los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación (Moncaut y col., 2003), que demostró que la inyección intraperitoneal de 17β -estradiol induce niveles detectables de Vtg en el mucus superficial de *C. dimerus*. Basados en esta propiedad, más tarde se desarrollaron métodos para la evaluación de niveles de Vtg en mucus de otros teleósteos (Van Veld y col., 2005; Maltais y Roy, 2007). Así mismo, la inducción de Vtg en mucus se registró también en juveniles del salmón del Atlántico tras la exposición a NF en agua de desecho (Meucci y Arukwe, 2005). Por lo tanto, la detección de Vtg en el

mucus superficial de peces expuestos a xenoestrógenos representaría un método sensible y no invasivo para evaluar la presencia de desorganizadores endocrinos en el ambiente acuático. Esta técnica sencilla y rápida podría constituir entonces una herramienta útil para ensayos de monitoreo. Además, por ser una aproximación no invasiva, beneficiaría a las especies protegidas o en peligro, las cuales no pueden ser sometidas a algunos de los métodos destructivos comúnmente utilizados (Fossi. y col, 1999; Maltais y Roy, 2007).

Numerosos estudios ecotoxicológicos indican que el hígado de los vertebrados es uno de los órganos más ampliamente estudiados, dado que es el sitio de detoxificación de xenobióticos. En condiciones naturales, el citoplasma de las células hepáticas de los machos contiene un gran número de gránulos de glucógeno, mientras que en hembras ponedoras, el retículo endoplasmático rugoso ocupa la mayor parte del citoplasma celular, indicando procesos de síntesis activa (Yamamoto y Egami, 1974). Histológicamente, los hepatocitos de machos de *C. dimerus* tratados con OF presentan características similares a aquellos de hembras vitelogénicas. Los cambios morfológicos de los hepatocitos asociados con la acumulación Vtg incluyeron una intensa basofilia del citoplasma, la cual refleja un desarrollo significativo del retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi y un aumento del tamaño nuclear que probablemente resulta de la intensa síntesis de Vtg. La evaluación inmunohistoquímica usando un antisuero heterólogo contra Vtg permitió identificar células productoras de Vtg en el parénquima hepático de hembras vitelogénicas y machos expuestos a OF. Esto confirmó la identidad de la proteína acumulada en el citoplasma de los hepatocitos como Vtg y mostró que estas células activas se distribuyen difusamente en el órgano completo.

La histopatología es empleada como una herramienta para evaluar los efectos tóxicos de los xenobióticos. En este estudio, la observación histológica de los testículos de los peces expuestos a OF reveló que el grado de daño testicular está relacionado con la concentración. La exposición a 30 µg/l de OF no produjo efectos aparentes en una evaluación a nivel de microscopía óptica. El tratamiento con 150 µg/l de OF produjo un aumento de la fibrosis intersticial, mientras que la exposición a 300 µg/l de OF causó un desarreglo de la organización lobular del testículo y una marcada reducción en la identificación de células de Sertoli y cistos. En los peces tratados con las concentraciones más altas de OF, los lóbulos parecían sacos de tejido intersticial fibroso llenos de espermatozoides. Estos cambios estructurales son indicativos del daño a la

espermatogénesis y consecuentemente a la funcionalidad del testículo, tal como quedó evidenciado por el registro de desoves exitosos sólo en el tratamiento con 30 µg/l de OF, así como en los ensayos de recuperación, donde los primeros desoves post-tratamiento no fueron viables. De manera similar a los efectos observados en *C. dimerus*, la exposición a concentraciones comparables de NF resultaron en una reducción del número de cistos que contenían los distintos estadios de la espermatogénesis en machos de platyfish *X. maculatus* (Kinnberg y col., 2000). Los mecanismos por los cuales el OF causa los efectos observados sobre los testículos de *C. dimerus* no son claros y necesitan investigaciones adicionales.

Las sustancias químicas estrogénicas pueden actuar indirectamente vía el eje hipotálamo–hipofisario–gonadal, alterando la síntesis y/o secreción de GnRH y/o gonadotropinas (Trudeau. y col, 1993; Christiansen y col., 1998), o también pueden actuar directamente sobre los testículos. Los efectos directos pueden ser tanto citotóxicos, cuando la alteración es causada por daño a las células del testículo, o endocrinos, en los cuales las funciones específicas de las células, por ejemplo las células de Sertoli, son alteradas debido a un mal funcionamiento endocrino (Kime, 1999). La falla en la función de las células de Sertoli sería especialmente crítica durante la espermatogénesis, cuando las células germinales están progresando hacia la meiosis. Dos de las funciones más importantes de las células de Sertoli son la formación del cisto y la regulación de la espermatogénesis, entonces es probable que la alteración de estas células haya resultado en la ausencia de cistos en plena estación de alta actividad reproductiva observada en los ejemplares de *C. dimerus*. Otra función de las células de Sertoli es la secreción y regulación de la composición del líquido seminal. Rasmussen y Korsgaard (2004) demostraron que en *Z. viviparus* la exposición a OF inhibe la producción del fluido seminal y modifica su composición bioquímica, impidiendo que el semen sea liberado. Así entonces podríamos explicar el aspecto de sacos cargados de esperma que presentaron mayoritariamente los machos de *C. dimerus* expuestos a altas concentraciones de OF, donde los espermatozoides habrían quedado atrapados en los espacios limitados por el tejido intersticial.

En la dorada (*Sparus aurata*) y en el pez cebra (*Danio rerio*), se registró que la exposición a estrógenos inhibió la espermatogénesis por impedir la división de las espermatogonias, y por lo tanto el desarrollo más allá de este estadio (Condeça y Canario, 1999; Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2005). En *C. dimerus*, el OF podría estar actuando de manera

similar, lo cual explicaría la ausencia de cistos conteniendo espermatoцитos y/o espermátidas, ya que estos estadios de las células germinales habrían terminado la espermatogénesis y las nuevas espermatogonias no habrían podido iniciar la división meiótica. Esta interpretación estaría respaldada por los valores hormonales registrados durante el tratamiento. El descenso de los niveles de E₂ y T pudo haber producido una caída en la renovación de las espermatogonias e impedido su avance a la profase meiótica. Sin embargo, en este estudio no se puede aventurar un análisis certero, ya que a un N bajo se adiciona el hecho que, algunas de las muestras de plasmas correspondientes a la concentración de exposición de 300µg/l de OF se gelificaron impidiendo su dosaje. Claramente la caída en los valores de E₂ y T deberá ser confirmada con futuras evaluaciones en este sentido.

Los compuestos estrogénicos podrían también ejercer sus efectos directamente sobre el testículo mediante la inhibición de la síntesis de andrógenos (Trudeau y col., 1993). En los testículos de algunos teleósteos y elasmobranquios se han identificado receptores de estrógenos (Betka y Callard, 1998; Miura y col., 1999), que mostraron afinidad por los xenoestrógenos (Loomis y Thomas, 1999). Rasmussen y col. (2005) demostraron que un antiestrógeno (ZM 189,154) puede abolir algunas de las alteraciones inducidas por OF en testículos de *Z. viviparus*, proporcionando evidencia de que algunos de estos efectos pueden estar mediados por receptores de estrógenos.

Los granulocitos acidófilos, un tipo de células fagocíticas, son reclutadas por el testículo en respuesta a necesidades fisiológicas bajo condiciones experimentales. Por lo tanto, no fue sorprendente hallar un gran número de este tipo de células en los testículos de peces expuestos a altas concentraciones de OF, ya que ellas podrían estar asociadas con la involución que estaba teniendo lugar en ese órgano.

En términos generales las sustancias muestran una toxicidad similar para un grupo taxonómico particular (algas, invertebrados y peces) y tipo de ensayo (ejemplo: crónico o agudo). Estas consideraciones son importantes al momento de interpretar la sensibilidad de las especies a determinados compuestos. La CL50-96 h de OF para *Pimelaphales promelas* fue de 290 µg/l bajo un sistema de flujo constante, valores similares de 260 µg/l se calcularon para *Leuciscus idus* en ensayos semiestáticos y de 280 a 300 µg/l para *Fundulus heteroclitus* (Brooke y col., 2005). En este estudio, para individuos adultos de *C. dimerus* se determinó la CL50-96 h en 547,21 µg/l., el cual resulta un valor comparable al de otras

especies de peces. El 4-*tert*-OF es clasificado como “peligroso para el ambiente” con la siguiente frase “R50/53: muy tóxico para organismos acuáticos, puede causar efectos adversos a largo plazo en el ambiente acuático”. Esta clasificación se basa (entre otros datos) en 48-h/96-h L (E) C50 <1 mg/l (Directive 67/548/EEC, EU, 2004) (Brooke y col., 2005).

Durante los experimentos de exposición a compuestos químicos en los que se emplea un sistema de renovación semiestático, la diferencia entre las concentraciones nominales y reales medidas en los acuarios de exposición tienden a ser especialmente notables. En este estudio, las concentraciones de OF utilizadas descendieron a menos del 50% respecto de la concentración nominal durante las primeras 24 h y resultaron de sólo un 20% al momento de la renovación del agua. Esta tendencia al descenso del OF se determinó por medidas tomadas en el tratamiento de 150 µg/l; y se ajustó a estudios previos realizados en ésta y otras concentraciones, tanto de OF como de otros compuestos estrogénicos. Meijide (2007) midió caídas del mismo rango en la concentración de OF trabajando con concentraciones de 10 y 100 µg/l. Kinnberg y col. (2000) en un experimento similar, registraron una caída de la concentración de NF comparable, con un promedio del 15–23% de la concentración nominal en un período de 3 días. Igualmente, Metcalfe y col. (2001) encontraron que las concentraciones de estradiol y ethinyl-estradiol medidas en el agua tras un período de 48 h fue en promedio del 43% y 29% de la concentración nominal respectivamente, mientras que Balch y Metcalfe (2006) registraron una disminución al 29% de la concentración nominal de NF en el mismo período. Los mecanismos por los cuales se da la caída de estos compuestos estrogénicos en el agua de ensayo pueden incluir, la incorporación de los peces, la adsorción al vidrio, la degradación microbiana y la fotólisis (Ekelund y col., 1993; Ahel y col., 1994; Lewis y Lech, 1996). Si bien este estudio revela que las concentraciones reales del compuesto disminuyeron notoriamente en los acuarios, la exposición a contaminantes a pulsos regulares como los utilizados en este estudio resultan ecológicamente relevantes, ya que los peces no están usualmente expuestos a concentraciones constantes de tóxicos en el ambiente. Además, esto indica que los efectos registrados bajo estas condiciones están siendo producidos por exposición a concentraciones considerablemente más bajas que los valores nominales. Los dos productos principales de la degradación de alquilfenoles polietoxilados son el OF y el NF, ambos ubicuos en el ambiente acuático. El NF es el alquilfenol (AF) preponderante,

constituyendo el 80% de los AFs encontrados en el agua superficial y los sedimentos (Ying y col., 2002a). En comparación, la cantidad de OF corresponde a aproximadamente el 15% del aporte de alquilfenoles (Bennett y Metcalfe, 1998). Si bien la potencia estrogénica del OF es mayor que la del NF (White y col., 1994), esto ha sido frecuentemente pasado por alto en estudios ecotóxicológicos debido a su menor uso. Una de las estrategias para la reducción del riesgo del NF, considera el empleo de otros alquilfenoles, particularmente el OF. El NF puede ser realmente sustituido por el OF en la mayoría de sus aplicaciones, como ocurre en USA, sin embargo su uso como sustituto ocasiona un nivel de riesgo similar que debe ser evaluado (Brooke y col., 2005).

Las concentraciones de OF usadas en el presente estudio abarcan el rango de concentraciones registradas en Norte América e Inglaterra. En ríos y lagos de los países desarrollados, las concentraciones de AFs raras veces exceden los 20 µg/l (Blackburn y Waldoock, 1995; Bennie y col., 1997), aunque en ríos que reciben cantidades significativas de efluentes industriales y/o domésticos, los niveles del contaminante pueden alcanzar de 600 a 1000 µg/l en el punto de vertido (Warhurst, 1995; Ying y col., 2002a). En efluentes de plantas de tratamiento de desechos cloacales, las concentraciones de estos compuestos generalmente están en el rango de 10–300 µg/l (Bennie, 1999). Los AFs son lipofílicos (Ahel y Giger, 1993) y por lo tanto tienden a asociarse con la materia orgánica en el sedimento, alcanzando aquí concentraciones mayores que en el agua superficial (Ying y col., 2002a). En América del Sur, es escasa la información acerca de los niveles de AFs en el medio acuático. Sin embargo, dado que las actividades industriales no están bien reguladas en las naciones de América del Sur, probablemente los niveles ambientales de estos xenobióticos sean altos. En la naturaleza, se deben tener en cuenta otros factores cuando se evalúa la exposición estrogénica de los organismos. Estos incluyen la duración de la exposición, la bioacumulación y la presencia de otros compuestos químicos. Si bien los efectos adversos sobre los testículos registrados en este estudio ocurren a altas concentraciones nominales, los peces fueron expuestos sólo durante dos meses. Probablemente, efectos similares puedan ser observados después de largas exposiciones a concentraciones menores. Por sus propiedades lipofílicas, los AFs tienden a acumularse en los organismos acuáticos. Para peces, se han registrado factores de bioconcentración (medida de la acumulación de un contaminante en los tejidos, resultante del cociente entre las concentraciones del xenobiótico en el organismo y la del medio circundante) por

encima de 1300 (Ekelund y col., 1990; Ahel y col., 1993). Otros compuestos estrogénicos usualmente presentes en el ambiente pueden tener efectos aditivos con los AFs. En este sentido, es posible que los AFs puedan tener efectos adversos sobre el sistema reproductivo de los peces machos tanto por ellos mismos como por su contribución al conjunto de estrógenos ambientales (Kinnberg y col, 2000).

El factor de bioconcentración del OF en músculo, ovario, y testículo de *Scardinius erithrophthalmus* fue de 24, 85 y 169 respectivamente, sin embargo los residuos fueron rápidamente depurados de estos tejidos (Pedersen y Hill, 2002). La reversibilidad de los efectos estrogénicos de compuestos químicos naturales y sintéticos, a nivel reproductivo, resulta de particular interés para una evaluación de riesgo a nivel poblacional. Jespersen y col. (2010) demostraron que la depuración de *Z. viviparus* tratados con OF tuvo efectos positivos en hembras y embriones, no así en machos feminizados, en los que la transferencia a agua libre de compuesto no revirtió los efectos. En *C. dimerus*, los efectos histopatológicos del OF sobre los testículos son reversibles y la recuperación se da relativamente rápido. Los adultos recuperan su capacidad fecundante obteniéndose una F1 viable a los 28 días en medio libre de compuesto. Estudios de recuperación evaluando Vtg en plasma realizados en el laboratorio (Regueira, 2008) demostraron ausencia de bandas inmunoreactivas a partir del día 28 post-tratamiento y las muestras de mucus mostraron una recuperación más temprana ya que no se encontraron bandas a partir de los 14 días post-exposición. Es importante tener en cuenta estos hechos en estudios de monitoreo y evaluación de riesgo en poblaciones acuáticas. En el ambiente, podría considerarse que los efectos nocivos inducidos por pulsos de OF serían temporales y no predicen impacto a nivel poblacional al menos en términos de detrimento reproductivo. Sin embargo, la extrapolación de estos resultados al campo debe realizarse con sumo cuidado considerando las concentraciones existentes en el ambiente y en el marco de investigaciones que contemplen además duración de la exposición, bioacumulación y la presencia de otros compuestos químicos.

En conclusión, el presente estudio revela una acción de tipo estrogénica del OF en machos de *C. dimerus*. Ésta se basa en la inducción de la síntesis de Vtg, un efecto clásicamente observado con 17β -estradiol. Además, el daño en la morfología testicular indica que el OF fue capaz de disminuir la capacidad reproductiva de los machos de esta especie, si bien estos efectos fueron revertidos una vez que se suspendió la exposición al compuesto. Estas

evidencias sugieren que son necesarias futuras evaluaciones del OF y otros AFs como disruptores endocrinos en peces teleósteos de América del Sur, y sus efectos sobre la dinámica de las poblaciones de especies afectadas. Las conclusiones de este y otros estudios relacionados deberían tener impacto en la sociedad y ser la base para el establecimiento de leyes específicas sobre control ambiental.

Capítulo II Sección A

**Caracterización de células sanguíneas y parámetros
hematológicos de *Cichlasoma dimerus***

Introducción

La sangre de los peces

La sangre se puede considerar un tejido conectivo fluido dado que está constituida por células (denominadas en conjunto elementos figurados) y una sustancia intercelular líquida, el plasma sanguíneo (Geneser, 2000). El volumen del fluido sanguíneo de los peces ocupa entre el 2 y el 4% de su volumen corporal, a diferencia de otros vertebrados en los que representa del 5 al 8% (Brown, 1993). Una característica del tejido sanguíneo es que su formación no se produce *in situ* sino en diferentes órganos dependiendo de la clase de vertebrado (Charpentier, 1999). En los teleósteos el tejido linfóide del riñón cefálico y el tejido intertubular del cuerpo del riñón son hematopoyéticos, el bazo también cumple esta función así como la de banco sanguíneo temporal, el hígado está involucrado en la hematopoyesis durante las etapas larvales y con la producción de anticuerpos (Yokote en Hibiya, 1982).

Los elementos figurados

La sangre de los peces es similar a la de otras clases de vertebrados. Típicamente los elementos figurados incluyen eritrocitos nucleados, leucocitos agranulocitos (monocitos y linfocitos) y granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos, los dos últimos, en muy bajos niveles) y trombocitos. Los eritrocitos maduros contienen abundante hemoglobina y presentan citoplasma rosado o amarillento en extendidos coloreados con Giemsa. El tamaño y número de los eritrocitos muestran una considerable variación entre especies y dependiendo de la condición fisiológica, puede variar marcadamente dentro de la misma especie. Una función bien conocida e importante de los eritrocitos es su rol en el transporte y distribución de oxígeno y metabolitos a los tejidos (Yokote en Hibiya, 1982). En general más del 90% del oxígeno transportado desde el epitelio respiratorio hacia los capilares de los tejidos es transportado por la hemoglobina contenida en los eritrocitos. La cantidad de oxígeno transportada por unidad de volumen de sangre está determinada por: el número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina en ellos, la propiedad de unir oxígeno de la hemoglobina (la cual está modulada por el ambiente intraeritrocitario) y la prevalencia de

la presión parcial de oxígeno. El transporte de dióxido de carbono, por otro lado, depende del número de eritrocitos por unidad de volumen de sangre, de la actividad de la anhidrasa carbónica en ellos, del pH del eritrocito y del plasma. Ellos influyen el equilibrio entre el dióxido de carbono y el bicarbonato, el transporte de aniones bicarbonato a través de la membrana del eritrocito, la disponibilidad de grupos amino para unir dióxido de carbono oxidable en la sangre (principalmente en hemoglobina) y la capacidad buffer de los eritrocitos y el plasma (Nikinmaa,1990).

Los leucocitos están relacionados con funciones de defensa: el sistema inmune innato, que sirve como primer mecanismo de defensa, está compuesto principalmente por los monocitos y los granulocitos, mientras que el sistema inmune adquirido está conformado por linfocitos B y T, que aparecen más tarde en la vida, normalmente después del consumo de alimento (Rombout y col., 2005).

Los trombocitos tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la hemostasia ya que su función principal es la coagulación de la sangre; también están involucrados en la fagocitosis y otras posibles funciones inmunológicas (Köllner y col., 2004; Passantino y col., 2005).

Los parámetros hematológicos

Los índices hematológicos son parámetros importantes para evaluar el estado fisiológico de los peces. Sus cambios dependen de la especie, la edad, el momento del ciclo, el estado de madurez y las condiciones de salud (Blaxhall, 1972; Wedemeyer y col., 1983; Golovina y Trombicky, 1989; Zhiteneva y col., 1989; Bielek y Strauss, 1993; Golovina, 1996; Luskova 1997; Vosyliené, 1999; Hrubec y col., 2001).

Estos índices están estrechamente relacionados con la respuesta del animal al ambiente, de este modo, el medio donde viven los peces ejerce cierta influencia sobre las características hematológicas (Gabriel y col., 2004). Ellos han sido empleados para monitorear efectivamente la respuesta de los peces a los estresores y así su estado de salud bajo tales condiciones adversas. Por lo tanto, pueden proveer información diagnóstica substancial una vez que los valores de referencia son establecidos bajo condiciones estandarizadas.

La evaluación del hemograma comprende el recuento de glóbulos rojos (RGR: total de glóbulos rojos en millones por microlitro), la determinación del hematocrito (HTC:

porcentaje de glóbulos rojos en relación con el volumen sanguíneo total), la concentración de hemoglobina (Hb: gramos de hemoglobina por decilitro de sangre), los índices hematimétricos derivados de los anteriores, como el volumen corpuscular medio, VCM; la hemoglobina corpuscular media, HCM y la concentración de hemoglobina corpuscular media, CHCM; así como el conteo del total de glóbulos blancos (RGB: en miles por microlitro), su recuento diferencial y la evaluación de los extendidos coloreados de sangre periférica (Campbell, 2004).

La población de eritrocitos en la sangre periférica de los peces está compuesta principalmente por eritrocitos maduros, pero normalmente también se observa un número de células inmaduras. Si bien se pueden distinguir distintos estadios del desarrollo en los eritrocitos inmaduros circulantes, estas células son colectivamente conocidas como reticulocitos. El número de estos reticulocitos en la sangre varía según la especie así como por la edad del individuo, estación y condiciones ambientales. Sin embargo, bajo condiciones similares se observa un número de reticulocitos aproximadamente constante entre animales de la misma especie (Hibiya, 1982).

Las diferencias observadas en ciertos índices hematológicos se correlacionan con el estilo de vida del pez. Los nadadores más activos tienen niveles de Hb y RGR más altos, mientras que los lentos, formas menos activas, tienen niveles menores para estos parámetros (Eisler, 1965). Por otra parte, las distintas especies expresan valores de Hb que se relacionan inversamente con la cantidad de O₂ disuelto en el ambiente en el que viven. Así, peces de aguas heladas, presentan concentraciones de Hb significativamente menores al promedio que se da en especies de aguas cálidas. Un caso llamativo es el de los miembros de la Fam. Channichthyidae, que incluye especies antárticas carentes de eritrocitos y hemoglobina en sangre así como de mioglobina en músculos y su supervivencia se debe a las temperaturas extremadamente bajas, al agua bien oxigenada, la respiración cutánea y un volumen sanguíneo alto (Nelson, 2006).

Dada la importancia que están ganando las técnicas hematológicas para evaluar la salud de los peces, tanto en acuicultura como en investigaciones ecotoxicológicas de monitoreo ambiental, es que se plantearon las siguientes hipótesis

Hipótesis:

- 1.- Las células sanguíneas de *Cichlasoma dimerus* son semejantes a las de otros teleósteos en cuanto a los tipos celulares presentes y su morfología.
- 2.- Los valores de los parámetros hematológicos de *C. dimerus* se corresponden con aquellos de otras especies de peces.

Objetivos

- 1.- Obtener conocimientos básicos sobre la hematología de *C. dimerus*.
- 2.- Caracterizar las distintas células sanguíneas a nivel óptico y electrónico.
- 3.- Determinar los valores de referencia del hemograma de esta especie bajo condiciones estandarizadas.

MATERIALES Y METODOS

Los individuos adultos de *C. dimerus* utilizados en este estudio provinieron de Esteros del Riachuelo, Corrientes, Argentina. Los peces se pesaron y midieron (LT: longitud total) (hembras: $27,14 \pm 8,95$ g y $10,5 \pm 1,17$ cm, LT; machos: $50,15 \pm 11,5$ g y $12,78 \pm 0,98$ cm, LT) y se pusieron en acuarios a $26,5 \pm 1^\circ$ C, con un foto-período de 12:12 horas y una densidad promedio de 6,4 g/l. Los acuarios estaban bien aireados y provistos con una capa de grava sobre el fondo. Los peces se alimentaron una vez por día con alimento balanceado comercial (TetraCichlid®).

La manipulación de los peces fue particularmente delicada para evitar el estrés previo a la extracción de sangre. Los especímenes se anestesiaron por inmersión en agua con Fish Calmer (Ingredientes activos: acetona, dimetilcetona, alfa metil quinolina; Jungle Laboratories, Cibolo, Texas, USA), y la sangre periférica se extrajo de la vena caudal con una aguja heparinizada de calibre 25 x 1/2", unida a una jeringa de 1 ml (Fig. 38).

Luego de la extracción, los peces se ubicaron transitoriamente en peceras individuales para su recuperación. Inmediatamente después de cada extracción, las muestras de sangre se procesaron de la siguiente manera:



Fig. 38. Extracción de sangre periférica de la vena caudal de un individuo previamente anestesiado.

Para microscopía óptica, los frotis de sangre se secaron al aire, luego se fijaron en metanol absoluto por 3' a temperatura ambiente y se colorearon con Giemsa al 10% en PBS, hematoxilina-eosina o PAS (Martoja y Martoja, 1970; Pearse, 1980). Los preparados se examinaron y fotografiaron con un fotomicroscopio Nikon Microphot FX. Las mediciones de las dimensiones de los distintos elementos figurados se realizaron con un ocular que incluía una escala micrométrica.

Para microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron pellets de células sanguíneas por centrifugación (400g, 10 min., 4°C) que se fijaron en glutaraldehído 3% en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4) por 2 hs. El pellet luego se lavó con buffer fosfato 0,1M y se post-fijó con tetróxido de osmio 1% en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4) por 2 hs. Subsecuentemente se lavó en agua destilada, se deshidrató en una serie de alcoholes de gradación creciente y acetona y finalmente se embebió en resina Spurr. Las secciones realizadas con un ultramicrotomo Sorvall MT2-B se colorearon con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo y se examinaron bajo un microscopio Zeiss EM 109 T. Para orientación y análisis se utilizaron secciones semifinas, coloreadas con azul de toluidina.

Dentro de las dos horas de realizadas las extracciones, las muestras de sangre se procesaron para RGR, RGB y HTC.

El RGR consiste en determinar el número de glóbulos rojos por microlitro de sangre, a partir de un volumen convenientemente diluido (Kaplow, 1955). Éste y el RGB más los trombocitos (Natt y Herrick, 1952) se realizaron en cámara de Neubauer (Fig. 39).

La cámara presenta dos retículos de 3 mm de lado, en los que se realizan los recuentos. Cada retículo consta de 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm de lado y por ende de 1 mm² de superficie. El cuadrado central tiene una depresión de 0,1 mm respecto de la superficie, por lo tanto su volumen es de 0,1 mm³. Éste puede tener dos aspectos: en la cámara de Neubauer tradicional, está dividido en 16 cuadrados medianos y cada uno de ellos se halla dividido a su vez en 25 cuadrados pequeños (400 cuadrados pequeños en total), de los cuales los que forman la 5ª columna y la 5ª fila están divididos al medio. En cambio, en la cámara de Neubauer modificada el cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos y cada uno de ellos está dividido en 16 cuadrados pequeños (400 cuadrados pequeños en total). Cualquiera sea la cámara empleada, el cuadrado grande central es el utilizado en el recuento eritrocitario. Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas están divididos en 16 cuadrados medianos y en ellos se realiza el conteo de leucocitos (Fig. 38).

Para el recuento celular, se coloca el cubre-cámara y se introduce entre este y la cámara la sangre, previamente diluida, por capilaridad. Se deja reposar 2 min antes de realizar el recuento. Una vez contadas las células se calcula la concentración en la muestra original, considerando: la dilución de la muestra realizada para el sembrado, la cantidad de cuadrados considerados, el número de células contadas y el volumen de muestra debajo de cada cuadrado.

$$\text{Eritrocitos / l} = N \times (400 / 80) \times 10 \times 200 \times 10^6$$

Donde: N= eritrocitos contados en 80 de los 400 cuadrados pequeños

10 = factor de volumen

200 = factor de dilución

$$\text{Leucocitos / l} = N \times (1/4) \times 10 \times 20 \times 10^6$$

Donde: N= leucocitos (+ trombocitos) contados en los 4 cuadrados grandes.

10 = factor de volumen

20 = factor de dilución

El conteo diferencial de los distintos glóbulos blancos y trombocitos se realizó sobre frotis de sangre coloreados con Giemsa. Por cada 1200 eritrocitos contados al azar en X campos, se determinó el número de trombocitos y de los diferentes tipos de leucocitos sobre cada frotis y se calculó un porcentaje promedio relativo. Los valores absolutos se obtuvieron

multiplicando estos porcentajes por el valor de RGB + trombocitos tomado del hemocitómetro. El número de trombocitos fue sustraído del recuento de RGB + trombocitos obteniéndose así el total de RGB. Se hicieron réplicas de los conteos para cada muestra de sangre.

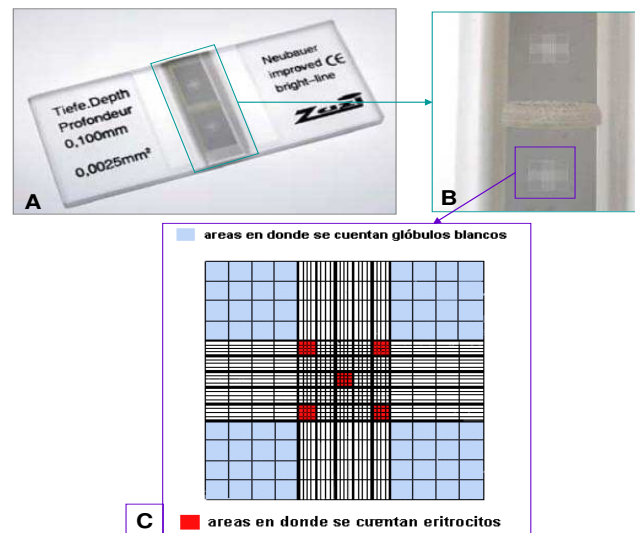


Fig. 39. Cámara de Neubauer: A- Vista de frente con la zona central remarcada; B- Detalle en el que se observan los dos retículos grabados en la zona central. C-Esquema detallando uno de los retículos, se señalan en rojo los cuadrados medianos para RGR y en celeste los cuadrados grandes para RGB.

Los valores del hematocrito se determinaron por el método estándar de microhematocrito y se expresó como porcentaje. Para ello, muestras de sangre por duplicado se cargaron en tubos capilares heparinizados. Estos se sellaron en el extremo más próximo a la sangre con plastilina, se midió la longitud de los capilares ocupada con sangre (como control ante eventuales pérdidas durante el procedimiento) y se centrifugaron a 12.000 rpm por 5' en una centrífuga para hematocrito. La lectura se realizó con un lector de hematocrito (Fig. 40). Para esto se coloca el capilar de manera que el fondo de la columna de eritrocitos coincida con la línea 0, se desplaza el capilar hacia la derecha o izquierda hasta que el tope de la columna de plasma coincida con la línea 100 del lector. El valor lo dará aquella línea que pase a nivel del tope de eritrocitos.

La concentración de hemoglobina se determinó utilizando el método de la cianometahemoglobina. La hemoglobina presente en la muestra se oxida a metahemoglobina en presencia de ferricianuro que a su vez se combina con iones cianuro a

pH 7,2 convirtiéndose en cianometahemoglobina, un compuesto muy estable. Su absorbancia se midió espectrofotométricamente a 540 nm (hemogloWiener reactive,

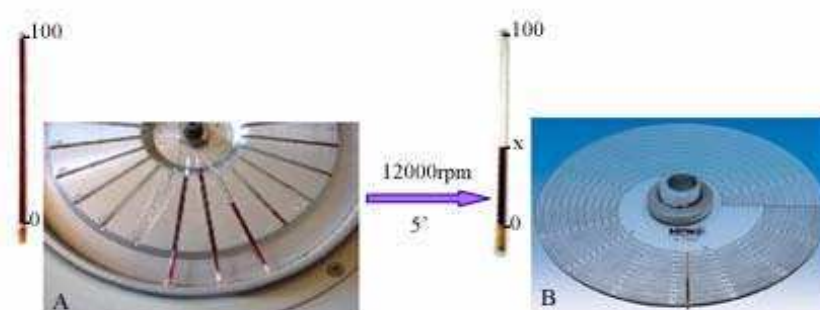


Fig. 40. Determinación del valor de HTC por centrifugación de la sangre anti-coagulada (A) y lectura directa en porcentaje según el nivel X que alcanza la masa globular (B).

Wiener Lab.) y es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina. Se realizó el control de la linealidad del fotómetro efectuando una curva de calibración de cinco puntos. Una alícuota de 16 μ l de sangre se adicionó con micropipeta a 4 ml de reactivo. Las muestras para la prueba de hemoglobina se centrifugaron para remover el material nuclear disperso. Luego se midió la absorbancia al espectrofotómetro contra el blanco del reactivo.

Cálculo de los resultados:

$$Hb_{\text{muestra}} = f \times (\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})$$

$$\text{Con el factor } f = Hb_{St} \times (\text{Absorbancia } 16\mu l_{St} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})^{-1}$$

donde Hb_{St} es la concentración en g/l de la hemoglobina correspondiente al lote de hemogloWiener Standard.

La hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y el volumen corpuscular medio (VCM) fueron calculados de acuerdo con Seiverd (1964). Estos índices eritrocitarios relacionan el HTC, la Hb y RGR del siguiente modo:

$$HCM \text{ (pg)} = Hb \text{ (g/l)} / RGR \text{ (cél./l)}$$

$$CHCM \text{ (g/l)} = Hb \text{ (g/l)} / HTC \text{ (l/l)}$$

$$VCM \text{ (fl)} = HTC \text{ (l/l)} / RGR \text{ (cél./l)}$$

Los intervalos de referencia se determinaron considerando los valores menores y mayores obtenidos para cada parámetro.

Las diferencias en los parámetros hematológicos entre hembras y machos se analizaron estadísticamente por el test t de Student.

Resultados

Caracterización de los tipos celulares

Por MO y MET se distinguieron y caracterizaron los siguientes elementos figurados: eritrocitos, trombocitos y cuatro tipos de leucocitos: linfocitos, monocitos, heterófilos y eosinófilos (Figs. 41 y 42; Tabla 2).

Los eritrocitos son células biconvexas con citoplasma homogéneo, acidófilos y con un montículo central correspondiente a la posición del núcleo oval. Este núcleo, localizado centralmente, contiene cromatina condensada. Los eritrocitos tomaron un color alilado en preparaciones coloreadas con Giemsa, azules con azul de toluidina y no se colorearon con PAS (Figs. 41A, F). Ultraestructuralmente, el núcleo es fuertemente heterocromático, mientras que el citoplasma es altamente electrodenso y contiene pocas organelas, sólo se observaron vesículas redondas (Fig. 42A).

Los trombocitos son las células más abundantes después de los eritrocitos. Presentaron diferentes morfologías en los frotis, desde fusiformes a ahusados u ovals, con un núcleo oval de posición central. Frecuentemente se observaron agrupados, pero también como células aisladas. El citoplasma de los trombocitos no se coloreó con Giemsa, pero con azul de toluidina tomó una débil coloración azul (Fig. 41A). Bajo MET, el núcleo exhibió bloques prominentes de heterocromatina que lo atraviesan. La membrana citoplasmática presentó frecuentemente un aspecto aserrado, las organelas eran escasas. Sólo se observó un gran gránulo, rodeado por membrana, próximo al núcleo. Entre el contenido del gránulo y la membrana que lo rodea se observó un espacio claro (Fig 42B).

Los linfocitos son células pequeñas, redondas. Estas células basófilas poseen un gran núcleo esférico localizado centralmente que ocupa la mayor parte de la célula. El citoplasma conformó un delgado anillo periférico de color azul claro; el núcleo era rico en heterocromatina y su color fue violeta en preparaciones teñidas con Giemsa (Fig. 41B). Ultraestructuralmente, los linfocitos presentaron procesos celulares con forma de dedo. Su

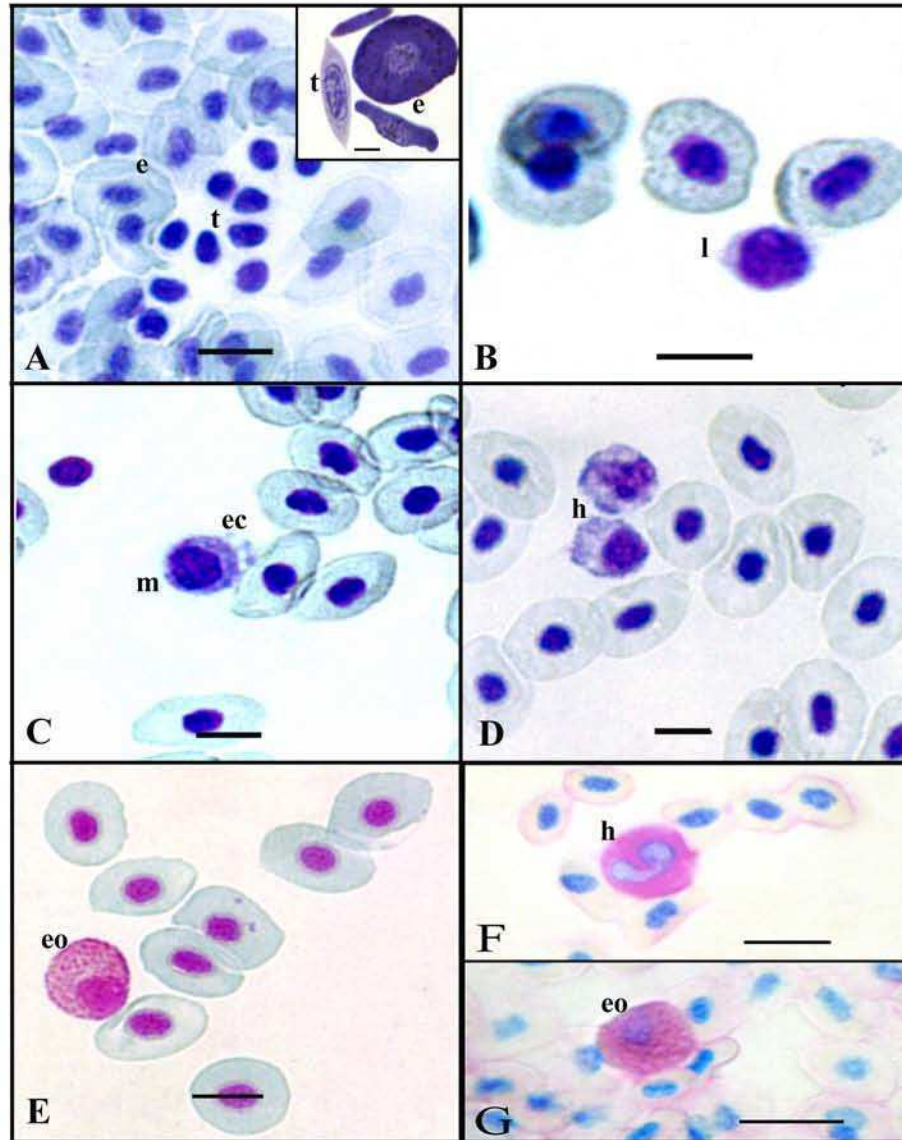


Fig. 41. Microscopía de luz, micrografías de sangre periférica: A) e, eritrocito; t trombocito. Escala 7 μ m. Detalle con azul de toulidina. Escala 2,5 μ m. A-E) Giemsa. B) l, linfocito. Escala 6 μ m. C) m, monocito. Escala 5 μ m. D) h, granulocito heterófilo. Escala 5 μ m. E) eo, granulocito eosinófilo. Escala 6 μ m. F-G PAS. F) Granulocito heterófilo. Escala 6 μ m. G) Granulocito eosinófilo. Escala 8 μ m. ec, extensiones citoplasmáticas.

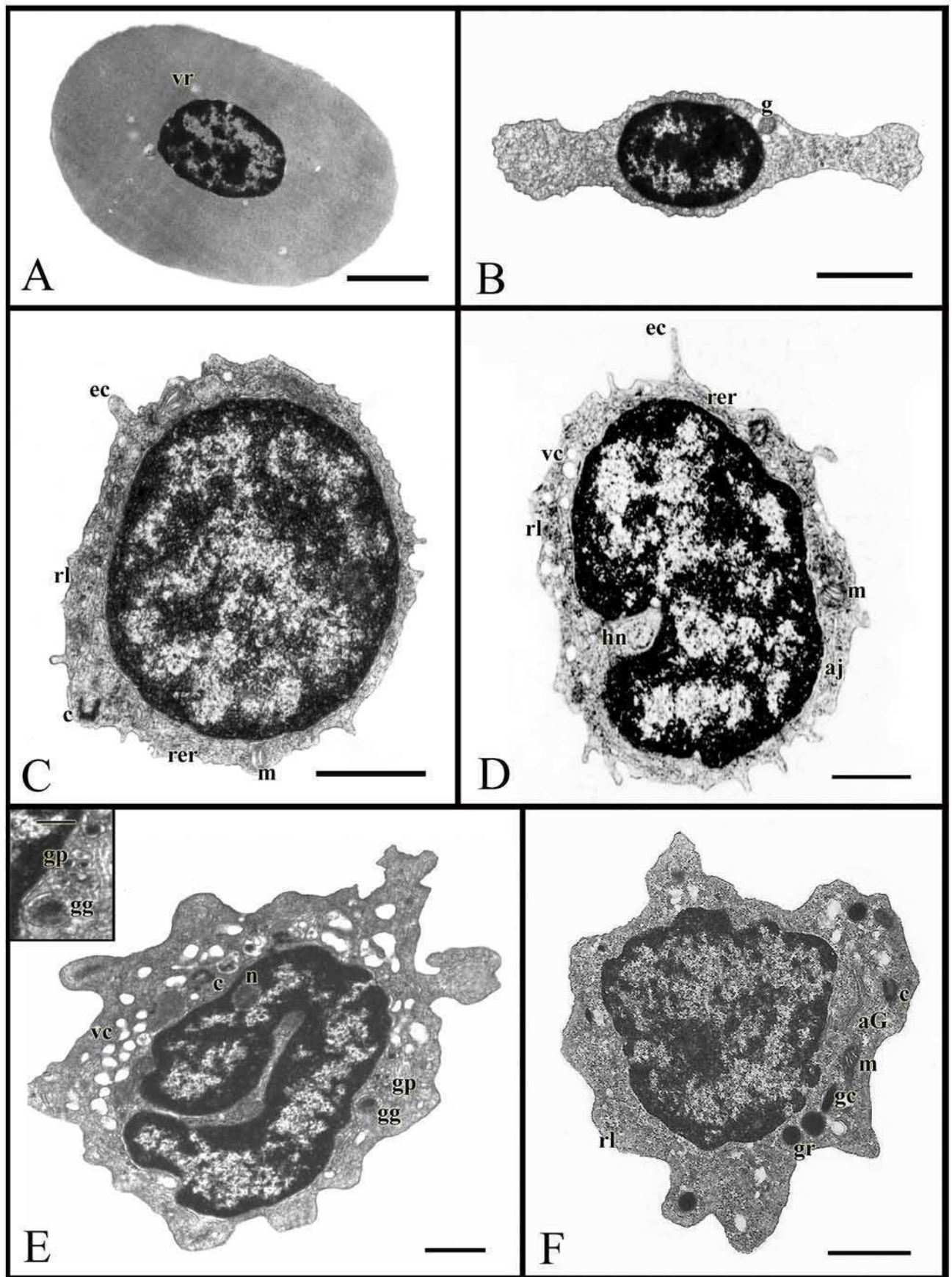


Fig. 42. MET, micrografías de sangre periférica. A) Eritrocito. Escala 2 μ m. B) Trombocito. Escala 2 μ m. C) Linfocito. Escala 1 μ m. D) Monocito. Escala 1 μ m. E) Granulocito heterófilo. Escala 1 μ m. Detalle de gránulos. Escala 0,12 μ m. F) Granulocito eosinófilo. Escala 2 μ m. aG, aparato de Golgi; aj, área clara juxtannuclear; c, centriolo; ec, extensiones citoplasmáticas; g, gránulo; gc, gránulos cilíndricos; gg, gránulo grande; gp, gránulo pequeño; gr, gránulos redondos; hn, hendidura nuclear; m, mitocondria; n, nucleolo; rer, retículo endoplasmático rugoso; rl, ribosomas libres; vc, vesículas claras; vr, vesículas redondas.

Tabla 2: Características al microscopio óptico de las células sanguíneas de *C. dimerus*

Tipo celular	Tamaño celular(μm)	Forma celular	Citoplasma	Forma del núcleo
Eritrocito	9,4-10 X 6,2-7,3	biconvexo	rosa	oval
Trombocito	8,0-8,9 X 2,1-2,7	fusiforme, ahusado u oval	halo traslúcido	oval
Linfocito	3,4-4,7	redondo	delgado anillo celeste pálido	esférico, conspicuo
Monocito	4,0-7,1	redondo	celeste grisáceo, homogéneo	excéntrico, arriñonado a bilobulado
Heterófilo	5,0-9,5	redondo	violeta claro, con granulaciones delicadas	excéntrico, bilobulado
Eosinófilo	4,8-9,5	redondo	grandes gránulos acidófilos	redondo o bilobulado, excéntrico

gran núcleo central contenía cúmulos densos de heterocromatina y un nucleolo. En el delgado anillo de citoplasma se observaron numerosos ribosomas libres, mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi y el centríolo (Fig. 42C).

Los monocitos son células redondas u ovals, caracterizadas por un núcleo prominente, excéntrico, de forma arriñonada a bilobulada. Estas células exhibieron bajo MO, un núcleo azul-púrpura y un citoplasma agranular, azul grisáceo después de la coloración con Giemsa. La región periférica está irregularmente delineada debido a la presencia de extensiones citoplasmáticas, características de las células activamente fagocíticas (Fig. 41C). Bajo MET, el citoplasma presentó mitocondrias, ribosomas libres, numerosas vesículas claras, retículo endoplasmático rugoso y complejo de Golgi. Los centríolos estaban usualmente ubicados en una hendidura nuclear. Se observó un área yuxtannuclear clara. Los monocitos también contenían heterofagosomas, confirmando su actividad fagocítica (Fig. 42D).

Granulocitos:

Los heterófilos son células grandes y levemente basófilas, con un delineado irregular debido a la presencia de cortos procesos citoplasmáticos. El núcleo tenía forma de herradura y era bilobulado (Fig.41D). La coloración de PAS demostró la presencia de glicógeno en el citoplasma de este tipo celular (Fig. 41F). Ultraestructuralmente, el citoplasma contenía gránulos redondos a elongados, así como numerosas vesículas claras, algunas de las cuales exhibieron contenido. Ocasionalmente se observó el aparato de

Golgi. El retículo endoplasmático rugoso fue poco prominente. Se distinguieron dos poblaciones de gránulos con diferente aspecto ultraestructural. Algunos de ellos eran pequeños, ovales a redondos y contenían material homogéneo electrodenso, mientras que otros eran grandes y redondos, y mostraron un corazón electrodenso heterogéneo. En ambos tipos de gránulos, el contenido estaba rodeado por un halo claro. El núcleo presentó bloques grandes periféricos de heterocromatina y un nucleolo prominente (Fig. 42E).

Los eosinófilos son células grandes, redondas, frecuentemente delineadas de forma irregular. Ellas tienen un núcleo redondo, a veces bilobulado. El citoplasma estaba lleno de gránulos acidófilos que ocasionalmente ocultaban al núcleo (Fig. 41E). Como los heterófilos, los eosinófilos son células que dieron positivo para la reacción de PAS (Fig. 41G). Ultraestructuralmente, sus núcleos presentaron cúmulos de heterocromatina y un nucleolo localizado centralmente. Su citoplasma presentó un aparato de Golgi yuxtannuclear, vesículas claras y ribosomas libres. Se observaron dos tipos de gránulos: esféricos y cilíndricos. Ambos mostraron un contenido electrodenso homogéneo, rodeado por un halo periférico claro (Fig. 42F).

Análisis hematológico

Los resultados del análisis hematológico se presentan en la tabla 3. Esta incluye las medias y los intervalos de referencia para cada uno de los diferentes parámetros evaluados. Se observa baja cantidad de linfocitos y se encontró que el número de heterófilos/ μl es alto en relación con el de linfocitos.

El análisis estadístico (t de Student, $P < 0,005$) indicó que no hay diferencias significativas entre los parámetros hematológicos de machos y hembras.

Discusión

El estudio de los parámetros hematológicos y de los aspectos estructurales de las células sanguíneas de los peces está readquiriendo un interés creciente en los últimos años ya que

son de particular importancia para la acuicultura y la evaluación de las condiciones sanitarias del medio ambiente acuático. El mejoramiento del conocimiento actual sobre la hematología de los peces requiere una combinación de métodos cuantitativos y morfológicos.

Los eritrocitos son las células predominantes en la gran mayoría de las especies de peces. Está ampliamente aceptado que los peces, como muchos otros vertebrados, tienen un modelo común de leucocitos, consistente en trombocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos.

En esta sección, se caracterizaron microscópicamente las células sanguíneas y se analizaron los índices hematológicos de *C. dimerus* bajo condiciones ambientales estandarizadas.

Los eritrocitos maduros de *C. dimerus* muestran un tamaño promedio y un aspecto ultraestructural similar a aquellos descritos para eritrocitos de otras especies de peces, y como en todas las especies examinadas hasta este momento, ellos son los elementos figurados preponderantes encontrados en la sangre (Watson y col., 1963; Hartman y Lessler, 1964; Conroy, 1972; Blaxhall y Daisley, 1973; Javaid y Akhtar, 1977; Nakamura y Shimozawa, 1984; Rowley y col., 1988; Groff y Zinkl, 1999; Esteban y col., 2000; Hrubec y col., 2000; Ueda y col., 2001; Kori-Siakpere y col., 2005; Tavares-Dias y Ruas de Morais, 2006; Ranzani-Paiva y col., 2008), (Tabla 5).

Los trombocitos son el tipo de célula más abundante después de los eritrocitos, representando más del 50% de los leucocitos circulantes (Ueda y col., 1997). Sin embargo, algunos autores no incluyen a los trombocitos dentro de los leucocitos circulantes (Hrubec y col., 2000, 2001; Örün y Erdemli, 2002; Ranzani-Paiva y col., 2003). Cuando los frotis se realizan lentamente, o cuando la sangre se coagula parcialmente antes de extenderla, los trombocitos frecuentemente se agregan y adoptan un aspecto irregular. Sin embargo, cuando la sangre se extrae con un anticoagulante adecuado, como citrato de sodio o heparina, los trombocitos aparecen ovoides o con forma de huso y este es, presumiblemente, su aspecto normal *in vivo* (Rowley y col., 1988). Los agregados de trombocitos, observados en algunos de los frotis utilizados para conteo indican que la sangre está parcialmente coagulada a pesar del uso de anticoagulante. Como resultado, el conteo de este tipo celular es el que presenta mayor dispersión ya que las células no están

Tabla 3: Parámetros hematológicos en <i>C. Dimerus</i>.			
Análisis	Media \pm DS	Intervalo de referencia	Tamaño de la muestra (N)
RGR ($10^6/\mu\text{l}$)	$3,08 \pm 0,97$	1,68 – 4,27	30
RGB ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$12,18 \pm 3,84$	6,64 – 18,59	30
HTC (%)	$31,33 \pm 4,97$	22,5 – 39,12	30
Hemoglobina (g/dl)	$6,82 \pm 1,04$	5,23 – 8,33	18
VCM (fl)	$110,27 \pm 38,16$	70,14 - 198	30
HCM (pg)	$24,48 \pm 8,28$	14,51 – 40,59	18
CHCM (g/dl)	$22,32 \pm 3,85$	17,43 – 30,31	18
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$4,68 \pm 1,47$	2,55 - 7,14	30
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$2,19 \pm 0,69$	1,19 – 3,34	30
Heterófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$3,43 \pm 1,08$	1,87 – 5,24	30
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$1,87 \pm 0,59$	1,02 – 2,85	30
Trombocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	$31,55 \pm 9,95$	17,2 – 48,15	30

uniformemente distribuidas. En los trombocitos de los teleósteos se registró una única población de gránulos bajo MET (Cannon y col., 1980 a) y éstos muestran un espacio claro entre su contenido y la membrana que lo rodea, la cual es característica de los lisosomas (Daems y col., 1972). El grado de granulación y vacuolización es variable y esto ha llevado a que en algunos trabajos se sugiera la existencia de subpoblaciones (Zapata y Carrato, 1980; Pica y col., 1983). De acuerdo con Rowley y col. (1988), esta variación probablemente representa diferentes estadios de maduración de este tipo de célula o bien alguna heterogeneidad funcional dentro de los trombocitos. En *C. dimerus*, se observa dentro de cada trombocito un gran gránulo citoplasmático, como el descrito para *Ictalurus punctatus* por Cannon y col. (1980a). Otro aspecto ultraestructural prominente de los trombocitos es el aspecto aserrado de su membrana citoplasmática. Con microscopía óptica, los trombocitos de *C. dimerus* son reconocidos fácilmente respecto de los linfocitos por su aspecto morfológico y por su tamaño, como está indicado en la Tabla 2. En contraste, otros autores mencionan sus dificultades en distinguir trombocitos de linfocitos de acuerdo con su morfología y tamaño (Rowley y col., 1988; Esteban y col., 2000). Comparando con otras especies de peces resultó que los trombocitos de *C. dimerus* son de tamaño similar al observado por Nakamura y Shimozawa (1984) en el medaca, *Oryzias latipes*.

Los linfocitos son usualmente el tipo de leucocito más común presente en la sangre de los peces, alcanzando hasta el 85% de la población de leucocitos, excluyendo los trombocitos (Groff y Zinkl, 1999). Varios autores han mostrado gran interés en los leucocitos de los peces teleósteos respecto de su morfología y valores absolutos. Sus investigaciones revelaron una gran diversidad de aspectos morfológicos en algunos tipos de leucocitos (Srivastava, 1968; Blaxhall y Daisley, 1973; Ezzat y col., 1973; Ellis, 1976; Ferguson, 1976; Imagawa y col., 1989; Ueda y col., 1997; Veiga, 1999). Además el mismo tipo de leucocito ha sido descrito con distintos nombres por diferentes autores. Por lo tanto la nomenclatura concerniente a leucocitos de teleósteos es confusa (Ueda y col., 2001). Los linfocitos de *C. dimerus* son semejantes en tamaño y morfología a aquellos de *Dicentrarchus labrax* (Esteban y col., 2000). Bajo MET, ellos muestran extensiones citoplasmáticas en forma de dedos (Fig. 41 C). En *C. dimerus*, los linfocitos son menos abundantes que en otras especies (Tabla 5).

La nomenclatura utilizada para describir monocitos en peces es variable. Los monocitos

han sido llamados hemoblastos y macrófagos (Barber y col., 1981), mientras que otros autores han sido incapaces de encontrar monocitos (Blaxhall y Daisley, 1973). Hay relativamente pocos estudios morfológicos sobre monocitos de peces y están limitados a microscopía óptica (Cannon y col., 1980b; Page y Rowley, 1983; Ueda y col., 2001; Valenzuela y col., 2003) y electrónica (Nakamura y Shimozawa, 1984; Esteban y col., 2000; Hrubec y col., 2000). Los monocitos de *C. dimerus* muestran un aspecto ultraestructural semejante a aquellos de *O. latipes* (Nakamura y Shimozawa, 1984) y *D. labrax* (Esteban y col., 2000). Comparando con la última especie, también son similares en tamaño.

En los peces hay granulocitos de tres tipos: los heterófilos y eosinófilos son mucho más comunes, mientras que los basófilos son más raros (Tabla 4). Muchos autores reconocen a los heterófilos como el tipo más frecuente de granulocito. La ocurrencia de eosinófilos y en particular basófilos, es frecuentemente cuestionada (Ellis, 1977; Rowley y col., 1988). El pez dorado, *Carassius auratus* fue el pez más comunmente estudiado y todos los estudios registraron la presencia de granulocitos heterófilos y eosinófilos. Sin embargo, la presencia de basófilos es discutida. Watson y col. (1963) y Weinreb (1963) comentaron la presencia de basófilos pero tuvieron dificultad en encontrar tales células en la sangre periférica. Si bien Garavini y Martelli (1981) registraron la presencia de basófilos, no dan detalles sobre la estructura o abundancia relativa y no muestran micrográficas para este tipo celular. Weinreb (1963) registró en el pez dorado que los heterófilos son los granulocitos más frecuentemente encontrados, pero no proporciona datos cuantitativos. Bielek (1981) y Cenini (1984) registraron la presencia de los tres tipos de granulocitos en otro ciprínido investigado, la carpa común, *Cyprinus carpio*. Entre estos dos autores hay un acuerdo general respecto de la identificación de heterófilos, eosinófilos y basófilos y la interpretación de la subestructura granular (Tabla 4). En los salmónidos, los granulocitos heterófilos son los predominantes, mientras que eosinófilos y basófilos están presentes en muy bajo número o ausentes (Tabla 4). De acuerdo con Canon y col. (1980 a, b) sólo los heterófilos están presentes en la sangre del siluriforme *I. punctatus*, aunque Williams y Warner (1976) identificaron eosinófilos y basófilos en estudios realizados con microscopía óptica (Tabla 4). En *Scardinius erythrophthalmus* (Rowley y col., 1988) y en *Pleuronectes platessa* (Ferguson, 1976), han encontrado sólo granulocitos heterófilos (Tabla 4). En la sangre de *Oreochromis niloticus*, Ueda y col. (2001) identificaron los tres tipos de

granulocitos, sin embargo Rodrigues Bittencourt y col. (2003) no lograron encontrar basófilos y eosinófilos en esta tilapia, bajo condiciones de cultivo semi-intensivas (Tabla 4). En *C. dimerus*, se registró la presencia de heterófilos y eosinófilos, mientras que no se encontraron los basófilos (Tabla 4).

El estudio citoquímico de las células sanguíneas de *O. niloticus* demostró la presencia de glicógeno en el citoplasma de los heterófilos, trombocitos, linfocitos y monocitos (Ueda y col., 2001). En *C. dimerus*, sólo los heterófilos y eosinófilos fueron PAS positivo.

Los heterófilos de *I. punctatus*, han sido caracterizados ultraestructuralmente por tener un citoplasma lleno de gránulos con aspecto de varilla, los cuales en las formas maduras tienen en el centro una estructura de apariencia cristalina o estriada (Cannon y col., 1980 a). Subestructuras similares se encontraron en los gránulos de los heterófilos de *B. pholis* (Rowley y col., 1988), *P. platessa* (Ferguson, 1976) y *Morone saxatilis* (Bodammer, 1986). En estas especies, el citoplasma de los heterófilos presenta una única población de gránulos. Garavini y Martelli (1981) afirman que dos tipos de gránulos se forman en los heterófilos maduros e inmaduros del goldfish. En *C. carpio*, la subestructura de los gránulos de los heterófilos es semejante a aquella de los gránulos de los eosinófilos de *C. auratus* (Page y Rowley, 1983). En *C. dimerus*, los heterófilos son el tipo de granulocito encontrado con más frecuencia y tienen características ultraestructurales similares a las de *D. labrax* (Esteban y col., 2000). Sin embargo, en los heterófilos de *D. labrax* se describen tres tipos de gránulos mientras que los de *C. dimerus* presentan dos tipos.

Los eosinófilos de *C. dimerus* son células grandes, siendo excedidas en tamaño sólo por aquellas de la carpa común, *C. carpio* (Groff y Zinkl, 1999). Ellos comparten características similares con los eosinófilos de *D. labrax* (Esteban y col., 2000) y presentan dos tipos de gránulos.

En perciformes como *Tilapia zilli*, el estudio de las características hematológicas normales reveló predominancia de linfocitos y heterófilos, seguida por monocitos y eosinófilos (Ezzat y col., 1973). Por otro lado, en *Oreochromis aureus* fue registrado un alto porcentaje de heterófilos, monocitos y linfocitos (Silveira y Rigos, 1989), mientras en *O. niloticus*, también en condiciones normales, los heterófilos y linfocitos predominaron, seguidos por monocitos y raramente basófilos y eosinófilos (Ueda y col., 1997). Para *Centropomus parallelus*, nuevamente linfocitos y heterófilos resultaron predominantes, con una marcada superioridad numérica de los primeros, los monocitos fueron los otros elementos

cuantificados (Ranzani-Paiva y col. 2008). Los tipos más abundantes de leucocitos encontrados en la sangre periférica de *C. dimerus* fueron los linfocitos y heterófilos (Tabla 3), como se demostró también en *Pimelodus maculatus* (Ribeiro, 1978), *Synbranchus marmoratus* (Nakamoto y col., 1991), *Mugil platanus* (Ranzani-Paiva, 1995) y *Oncorhynchus mykiss* (Ranzani-Paiva y col., 1998). Un modelo similar fue registrado en *C. carpio* y *C. auratus* (Groff y Zinkl, 1999), *Oreochromis hybrid* (Hrubec y col., 2000), *Morone hybrid* (Hrubec y col., 2001), *Capoetta trutta* (Örün y Erdemli, 2002), *Salminus maxillosus* (Ranzani-Paiva y col, 2003), *Brycon amazonicus* (Tavares-Dias y Ruas de Morais, 2006) y *Centropomus parallelus* (Ranzani-Paiva y col., 2008) aunque la tasa relativa cambia de acuerdo con las especies (Tabla 5).

Bajo las condiciones empleadas en este estudio, el número de linfocitos resultó del mismo orden de magnitud que el de los heterófilos. Respecto de éstos últimos, el número obtenido en esta investigación concuerda con el registrado en el goldfish *C. auratus* (Groff y Zinkl, 1999). En *C. dimerus* se registró un bajo recuento de linfocitos comparando con los contados en otras especies (Tabla 5). De acuerdo con Campbell (2004), es probable que las condiciones de baja densidad y la óptima calidad del agua resultaran en una situación saludable que inhibió la linfocitosis que suele producirse durante el proceso de curación de infecciones parasitarias, enfermedades inflamatorias y virales.

Comparada con otras especies, *C. dimerus*, presenta valores medios semejantes para HTC y Hb y débilmente altos para RGR, aunque estos valores de RGR resultaron exactamente iguales que los registrados en *Morone* híbrido y *C. parallelus* (Tabla 5). A nivel de estos parámetros no se encontraron variaciones estadísticamente significativas entre sexos.

Los índices de eritrocitos VCM y HCM tienen un amplio rango de variación fisiológica. El VCM de *C. dimerus* es similar al de *C. auratus* y *Oreochromis* híbrido, mientras que el HCM concuerda con los de *Morone* híbrido, *Oreochromis* híbrido y *P. obscura* (Tabla 5). Arnold (2005) discute que en elasmobranquios, el RGR manual carece de la precisión necesaria para una valoración correcta de anemia o para calcular correctamente los valores de VCM y HCM. Blaxhall y Daisley (1973), trabajando con teleósteos, también concluyeron que el conteo manual de RGR provee errores y sugirieron que HTC y Hb podrían ser los mejores parámetros para la valoración de la anemia en peces.

El conocimiento de las características hematológicas es una herramienta importante que puede ser utilizada como un índice efectivo y sensible para monitorear los cambios fisiológicos y patológicos en los peces (Kori-Siakpere y col., 2005). Estudios previos sobre hematología en peces revelaron que la interpretación de los parámetros sanguíneos es bastante dificultosa ya que las variaciones en el tejido sanguíneo son causadas tanto por factores internos y como externos. Es bien sabido que los datos hematológicos son afectados por el modo de extracción, las técnicas de laboratorio, las variaciones estacionales, el tamaño del individuo, las propiedades genéticas, el sexo, la densidad de población, la falta de alimento, el estrés ambiental y el transporte (Ezzat y col., 1973; Denton y Yousef, 1975; Fourtie y Hatting, 1976; Van Vuren y Hatting, 1978; Hardig y Høglung, 1984; Wilhem y col., 1992; Örün y Erdemli, 2002; Arnold, 2005; Kori-Siakpere y col., 2005). Por esta razón, hay que ser cuidadosos cuando se establecen los intervalos de referencia y se hacen comparaciones.

En resumen, los resultados de esta investigación proveen una contribución al conocimiento de las características de las células sanguíneas y de los parámetros hematológicos del pez cíclido *C. dimerus*, bajo las condiciones normales empleadas en este estudio. Esta investigación puede ser de utilidad como una herramienta para monitorear el estado de salud de ésta y de otras especies de peces relacionadas. La evaluación de los parámetros hematológicos permitirá la detección temprana de patologías clínicas así como la presencia de alteraciones en el ambiente.

Tabla 4: Heterogeneidad de los granulocitos en teleósteos

Especie	Heterófilo	Eosinófilo	Basófilo	Referencia
<i>Salmo trutta</i>	+	-	+	Catton 1951
“	+	-	-	Blaxhall y Daisley 1973
<i>Onchorhynchus nerka</i>	+	-	-	Watson y col. 1956
<i>Carassius auratus</i>	+	+	+	Watson y col. 1963
	(5.1)	(2.2)	(0.2)	
“	+	+	+	Weinreb 1963
“	+	+	-	Davies y Haynes 1975
	(37.3)	(36.8)		
“	+	+	-	Javied y Akhtar 1977
	(5.8)	-1		
“	+	+	-	Barber y Westermann 1978
“	+	+	+	Garavini y Martelli 1981
“	+	+	+	Groff y Zinkl, 1999
	(5 ± 1.32)	(0.3± 0.13)	(0.2 ± 0.29)	
<i>Cyprinodon variegatus</i>	-	+	-	Gardner y Yevich 1969
		(5.3)		
<i>Fundulus heteroclitus</i>	-	+	-	Gardner y Yevich 1969
<i>Salmo gairdneri</i>	+	-	-	Klontz 1972
“	+		-	Barber y Westermann 1978
“	+	-a	-	Bielek 1981
<i>Salmo salar</i>	+	+	-	Conroy 1972
		(0.5)b		
<i>Pleuronectes platessa</i>	+	-	-	Ellis 1976
	(7)			Ferguson 1976 a
<i>Ictalurus punctatus</i>	+	±	+	Williams y Warner 1976
“	+	-	-	Cannon y col. 1980 a ,b
<i>Tinca tinca</i>	+	+	+	Bielek 1981
<i>Chaenocephalus aceratus</i>	-	+	-	Barber y col. 1981
<i>Cyprinus carpio</i>	+	+	+	Bielek 1981
“	+	+	+	Cenini 1984
“	+	+	+	Groff y Zinkl, 1999
	(3-10)	(0.5-1.0)	(0.5-1.5)	
<i>Morone saxatilis</i>	+	?	?	Bodammer, 1986
<i>Blennius folis</i>	+	-	-	Rowley y Ratcliffe, 1988
	(21.8)			

Tabla 4: continuación				
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	+	-	-	Rowley y col., 1988
	(19.7)			
<i>Dicentrarchus labrax</i>	+	+	-	Esteban y col., 2000
<i>Oreochromis hybrid</i>	+	+	-	Hrubec y col., 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	+	+	+	Ueda y col., 2001
<i>Oreochromis niloticus</i>	+	-	-	Rodrigues B. y col., 2003
<i>Sorubim cuspicaudus</i>	+	+	+	Correa Negrete y col., 2009
<i>Clarias gariepinus</i>	+	+	-	Adeyemo y col., 2009
<i>Cichlasoma dimerus</i>	+	+	-	Rey Vázquez y Guerrero, 2007

Tabla 5: Hemogramas de distintas especies de peces teleósteos (intervalo de referencia o media \pm DS).

Especies	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Carassius auratus</i>	<i>Oreochromis hybrid</i>	<i>Morone hybrid</i>	<i>Capoeta trutta</i>	<i>Salminus maxillosus</i>	<i>Parachanna obscura</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	<i>Centropomus parallelus</i>	<i>Cichlasoma dimerus</i>
Parámetro	Media \pm DS o intervalo	Media \pm DS	Intervalo de referencia	Intervalo de referencia	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS
HTC (%)	33.4 \pm 1.51	22.3 \pm 1.04	27-37	29-36	26.05 \pm 2.38		19 \pm 3.8	28,0 \pm 3,3	33,5 \pm 2,46	31.33 \pm 4.97
Hb (g/dl)	8.2 \pm 0.36	6.7 \pm 0.25	7.0-9.8	7.3- 9.4	7.9 \pm 0.24		5.7 \pm 1.24	6,6 \pm 0,6	6,17 \pm 0,41	6.82 \pm 1.04
VCM (fl)	202 \pm 5.5	137 \pm 2.6	115-183	78-102	149.71 \pm 2.28(μ l ³)	-	132.84 \pm 5.56 (μ l ³)	220,0 \pm 16,4	90,56 \pm 5,05	110.27 \pm 38.16
HCM (pg)	49.1	42 \pm 1.4	28.3-42.3	19-25	45.4 \pm 1.8	-	39.89 \pm 17.36			24.48 \pm 8.28
CHCM (g/dl)			22-29	22-27	30.32 \pm 0.8 (%)		29.08 \pm 5.9 (%)	24,0 \pm 16,4	18,47 \pm 0,52	22.32 \pm 3.85
RGR (x 10 ⁶ / μ l)	1.67 \pm 0.08	1.61 \pm 0.81	1.91-2.83	3.15-4.22	1.74 \pm 0.12	-	1.67 \pm 0.708	1,27 \pm 0,19	3,75 \pm 2,05	3.08 \pm 0.97
RGB (10 ³ / μ l)	37.8 \pm 2.88*	52.3 \pm 4.88*	21.5-154.7	12.1-13.1	17.65 \pm 2.15		19.07 \pm 7.4	13,32 \pm 7,68	51,21 \pm 16,24	12.8 \pm 3.84
Limfocitos (10 ³ / μ l)	32.26-35.15	26.7 \pm 2.89	6.8-13.64	9.2-21.8	13.1 \pm 0.01	53.1 \pm 1.4	-	5,68 \pm 4,0	42,33 \pm 13,64	4.68 \pm 1.47
Heterófilos (10 ³ / μ l)	1.13-3.78	2.3 \pm 0.56	0.5-9.873	0.1-2.4	2.56 \pm 0.12	33.3 \pm 1.3	-	5,38 \pm 2,1	6,99 \pm 3,37	3.43 \pm 1,08
Monocitos (10 ³ / μ l)	0.19-0.76	0.2 \pm 0.1	0.4-4.3	0.2-2.5	1.9 \pm 0.07	5.8 \pm 0.4	-	2,16 \pm 2,49	2,01 \pm ,95	2.12 \pm 0.69
Eosinófilos (10 ³ / μ l)	0.19-0.38	0.1 \pm 0.1	0.035-1.645	0-1.6	0.075 \pm 0.005	2.2 \pm 0.1	-			1.87 \pm 0.59
Trombocitos (10 ³ / μ l)	12.6 \pm 3.5	19.4 \pm 3.9	25-85.2	19.5-74.5	0.691 \pm 0.03	-	-	30,69 \pm	11,09 \pm 6,98	31.55 \pm 9.95
Referencia	Groff y Zinkl, 1999	Groff y Zinkl, 1999	Hrubec y col., 2000	Hrubec y col., 2001	Örün y Edermil, 2002	Ranzani-Paiva y col., 2003	Kori-Siakpere y col., 2005	Tavares-Dias y Ruas de Morais, 2006	Ranzani-Paiva y col., 2008	Rey Vázquez y Guerrero 2007

*RGB incluye trombocitos

Capítulo II Sección B

**Cambios hematológicos inducidos por xenobiótico en
*Cichlasoma dimerus***

Introducción

Los cambios en el ambiente acuático afectan directamente la homeostasis de los organismos que lo habitan provocándoles estrés. Éste en los peces puede ser inducido por distintos factores abióticos ambientales, interacciones bióticas o actividades relacionadas con el hombre. En caso de estrés leve, usualmente el balance interno se restaura, pero bajo condiciones severas o prolongadas de estrés, los mecanismos compensatorios se pueden agotar y como consecuencia se producen alteraciones fisiológicas que pueden, eventualmente, llevar a la muerte (Witeska, 2005).

La reacción al estrés involucra distintos cambios fisiológicos, incluyendo variaciones en la composición de la sangre y el sistema inmune. Los índices hematológicos y discrasias eritrocitarias (variaciones dimensionales, morfológicas y tintóreas de los glóbulos rojos), están estrechamente relacionados con la respuesta del animal al ambiente, de este modo permiten evaluar el estado fisiológico de los peces y se utilizan para la detección de cambios fisiopatológicos en diferentes condiciones de estrés (Nussey, 1995).

Los estudios que analizan los cambios en los parámetros hematológicos y los evalúan como biomarcadores asociados al estrés hemodinámico inducido por xenobióticos proveerán información diagnóstica substancial una vez establecidos los valores de referencia bajo condiciones estandarizadas. Una gran variedad de factores intrínsecos y extrínsecos causan variaciones normales y anormales en estos datos. Por este motivo, a pesar de los avances en la medicina de los peces en los últimos años, la interpretación de los valores hematológicos frecuentemente se ve dificultada por la ausencia de valores de referencia confiables y la confusión que se genera a partir de la gran diversidad de especies de peces (Clauss, 2008).

Los elementos de la serie roja, pueden aumentar o disminuir su número y volumen, así como el HTC y los niveles de Hb citoplasmática, dependiendo de los factores que estén actuando. El número de eritrocitos puede aumentar rápidamente como resultado de la contracción del bazo (Caldwell y Hinshaw 1994) y de este modo nuevas células se descargan a la circulación en pocos minutos (Houston y col., 1996). En caso de estrés por hipoxia se suelen observar células circulantes en división (Murad y col. 1993), hecho considerado patológico en peces y fisiológico para reptiles y algunos anfibios. Las

alteraciones del ambiente también impactan en el sistema inmune de los peces y consecuentemente afectan la resistencia a las enfermedades (Cuesta y col., 2011); así como el número de trombocitos (Casillas y Smith, 1977) y en la velocidad de coagulación que suele verse acelerada proporcionalmente al grado de las situaciones de estrés (Ruis y Bayne, 1997).

El análisis hematológico se está transformando en una práctica de rutina en la cría intensiva de peces ya que en acuicultura se necesita información segura para la identificación y el control de situaciones de estrés y/o enfermedades que puedan afectar el rendimiento en la producción (Rehulka y col., 2004; Tavares-Dias y Moraes, 2006). Kori-Siakpere y col. (2009) determinaron que el permanganato de potasio, un quimioterapéutico frecuentemente utilizado en criaderos, no se debe aplicar indiscriminadamente ya que produjo una disminución significativa en la concentración de hemoglobina, como así también del HTC y RGR en juveniles de *Clarias gariepinus*. Además, el uso de estas técnicas está ganando importancia en investigaciones toxicológicas y de monitoreo ambiental. Distintos estudios han utilizado a la hematología como biomarcador de exposición a pesticidas (Girón-Pérez y col., 2008; Velisek y col., 2009; Modesto y Martinez, 2010), a metales (Vosylienė, 1996a, 1996b; Witeska, 2005; Hoyle y col, 2007) y otros agentes estresantes (déficit nutricional, manejo en criaderos, agentes infecciosos y ambientales) (Vosylienė y Kazlauskienė, 1999; Clauss y col., 2008).

Los índices hematológicos se presentan entonces, como una herramienta importante para el monitoreo de distintos aspectos de la salud de los peces, por este motivo es que se pusieron a prueba en esta sección las siguientes hipótesis.

Hipótesis

- 1.- La exposición crónica de *Cichlasoma dimerus* a dosis subletales de OF produce estrés hemodinámico.
- 2.- Los efectos hematológicos del OF se manifiestan de manera concentración-dependiente.

3.- Los parámetros hematológicos son biomarcadores útiles de estrés inducido por xenobióticos.

Objetivos:

1.- Determinar los valores del hemograma en individuos de esta especie expuestos a concentraciones subletales de OF.

2.- Evaluar si los cambios en los parámetros hematológicos varían de acuerdo con la concentración del compuesto en el agua de ensayo.

3.- Analizar si estos índices proveen información diagnóstica substancial de estrés inducido por OF.

Materiales y métodos

Los especímenes adultos de *C. dimerus* utilizados en este estudio se tomaron de los acuarios comunitarios, se dispusieron en acuarios de experimentación individuales de 9 l cada uno y se dejaron aclimatar a estas condiciones durante 15 días. Se realizó un diseño experimental de medidas repetidas. Para cada tratamiento: control con solvente (etanol 0,01%) y concentraciones nominales de 150 y 300 µg/l OF, se utilizaron 12 ejemplares. Se extrajo una muestra de sangre de cada individuo y se los dejó recuperar 48 h. La manipulación de los peces, la extracción de las muestras de sangre y las determinaciones se hicieron de acuerdo con la metodología utilizada en la sección A. Brevemente, el hematocrito (HTC) se determinó por el método estándar de microhematocrito, el recuento de glóbulos rojos (RGR) y blancos (RGB) en cámara de Neubauer utilizando sangre apropiadamente diluida y la concentración de hemoglobina (Hb) por el método de cianometahemoglobina (reactivo hemogloWiener, Wiener lab.). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. La caracterización de los tipos celulares y el recuento diferencial de elementos de la serie blanca y eventualmente de elementos celulares atípicos se realizaron en extendidos coloreados con Giemsa 10% en PBS, también por duplicado.

Luego se procedió a la exposición de los peces, bajo condiciones semiestáticas (con recambio cada 84 h promedio), con los parámetros usuales de mantenimiento y experimentación ($26,5 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,3, fotoperíodo 12:12, alimentación una vez al día).

Transcurridos los 60 días se tomó la segunda muestra de sangre de todos los peces, control y tratados, las cuales se procesaron del mismo modo.

Los valores obtenidos se evaluaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, seguido por el test de Tukey a fin de establecer diferencias entre los distintos tratamientos para los parámetros en estudio. Las diferencias en los resultados entre los controles y los grupos tratados fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$. El análisis de los datos se realizó mediante el uso del programa Statistica.7.

Resultados

La presencia de eritrocitos amitóticos surge como una novedad en los extendidos de sangre de los individuos tratados. Estos eritrocitos atípicos, son células que se caracterizan por la presencia de un núcleo en forma de 8 o bien aparecen como células binucleadas, con un citoplasma levemente basófilo respecto de los eritrocitos normales (Fig.43B, C)

Los eritroblastos, colectivamente conocidos como reticulocitos, son eritrocitos inmaduros que se presentan en la circulación con forma levemente más redondeada que la forma madura y un citoplasma comparativamente más basófilo (Fig. 43B).

Los valores de los parámetros hematológicos iniciales de los grupos control no mostraron diferencias significativas respecto de los finales, como tampoco lo hicieron con las medias normales establecidas para la especie en la sección A, en la que las condiciones de mantenimiento eran levemente distintas. Los resultados iniciales de los índices de los grupos de tratamiento no mostraron diferencias significativas respecto del grupo control.

Los valores finales del hemograma de los individuos control y de los expuestos a dosis subletales de OF se presentan en la tabla 7. En los valores promedio finales de RGR, HTC y Hb de peces expuestos a distintas concentraciones de OF, se observa que hay un decrecimiento gradual en cada uno de estos parámetros. El análisis de los datos muestra que a la concentración de $150 \mu\text{g/l}$, sólo HTC presenta diferencias significativas respecto del grupo control, mientras que para el tratamiento con $300 \mu\text{g/l}$ los tres índices resultan significativamente menores, y en particular HTC con un mayor nivel de significación ($P < 0,01$).

Tabla 7: Variación de los parámetros hematológicos por efecto del OF

Parámetro	control	150 µg/l de OF	300 µg/l de OF
RGR ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	3,33±1,08	2,57±0,08	2,07±1,24*
HTC (%)	33,40±3,23	24,66±6,34**	23,08±8,7**
Hb (g/dl)	10,26±3,68	9,94±3,48	6,49±1,73*
VCM (fl)	112,53±29,88	102,87±23,1	122,71±35,84
HCM (pg)	34,67±17,16	34,38±12,06	36,03±13,37
CHCM (g/dl)	26,62±11,11	45,82±29,00	29,01±7,07
RGB ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	11,16±3,96	17,83±4,57	15,25±3,79
Linfocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	3,29±2,91	11,79±9,52*	5,71±3,89
Monocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	2,31±2,71	1,4±1,87	2,18±2,78
Heterófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	3,52±2,96	3,94±3,90	5,62±5,62
Eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	1,84±2,03	0,71±1,22	1,74±2,86
Trombocitos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	32,67±26,28	16,44±16,00	16,60±22,55
Eritr.amitóticos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	0	12,22±6,65	19,46±18,41 **
Eritroblastos ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	1,59±3,00	33,33±16,54**	18,66±18,66 *

* P< 0,05

** P< 0,01

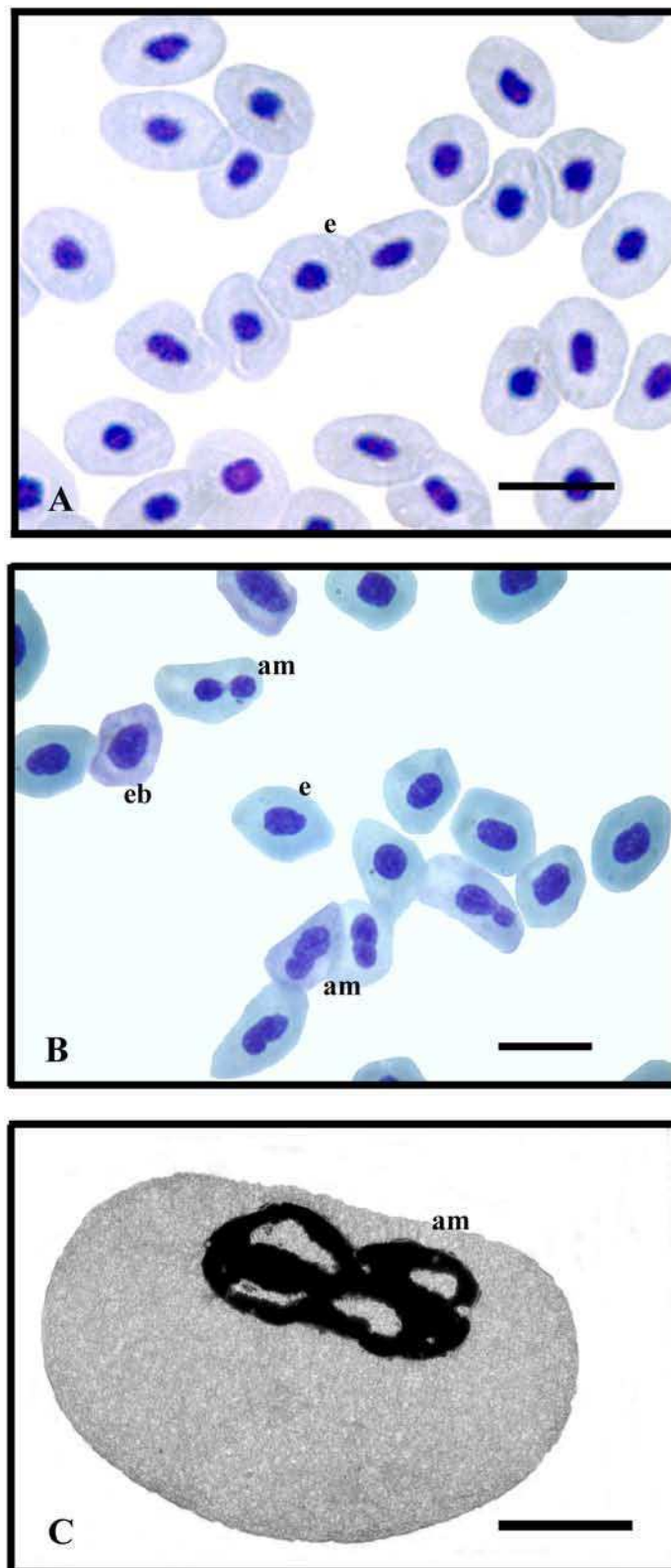


Fig. 43. Elementos figurados de sangre de *C. dimerus*, A-en extendidos de animales control y B- de individuos expuestos a 300 µg/l de OF, coloreados con Giemsa, 1000X.

Escala 6µm. C- eritrocito amitótico al MET. Escala 2µm. am: eritrocito amitótico; e: eritrocito; eb: eritroblasto.

Los parámetros hematimétricos (VCM, HCM y CHCM) no presentan variaciones entre ninguno de los tratamientos (Tabla 7).

Los valores promedios de RGB, recuento diferencial de granulocitos y agranulocitos, así como de trombocitos, eritrocitos amitóticos y eritroblastos, se muestran en la tabla 7. Se observa un aumento del total de los elementos de la serie blanca, debido al incremento en particular de linfocitos y heterófilos. Sin embargo, los resultados del ANOVA, indican que estas diferencias no resultan significativas. Tampoco resultó estadísticamente significativa la clara disminución en el número de trombocitos.

Los eritrocitos amitóticos se hallaron en una proporción relativamente alta en sangre de individuos expuestos a las dos concentraciones de OF, sin embargo esta variable sólo mostró diferencias significativas entre los controles y la concentración de 300 µg/l.

La sangre periférica de los peces contiene cantidades normales y específicamente constantes de elementos inmaduros, sin embargo para todos los individuos tratados se registró un marcado incremento en el número de eritroblastos circulantes (con $P < 0,01$ para 150 µg/l y $P < 0,05$ para 300 µg/l) (Tabla 7).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan una respuesta significativa de las variables hematológicas de *C. dimerus* a la exposición a OF. Este xenobiótico induce una reacción de estrés que lleva a un estado de anemia a estos animales.

Se determinó la reducción del HTC, consecuencia de una disminución en el RGR. La Hb en peces expuestos a 300 µg/l de OF bajó significativamente, mientras que en los tratados con 150 µg/l este efecto fue menos evidente. Dado que la HCM no presenta diferencias significativas, el tratamiento estaría produciendo una anemia normocrómica y también normocítica, ya que el volumen de los eritrocitos, medido por VCM, tampoco se modifica. Martins y col. (2004) así como Sabri y col. (2009) entre otros, registraron también disminución significativa en RGR, HTC y Hb, en ejemplares parasitados de *Leporinus macrocephalus* y *C. garipienus* respectivamente, sin embargo, el tipo de anemia difiere en estos casos dado que ellos mostraron una disminución en el tamaño de los eritrocitos y un aumento de la cantidad de hemoglobina que portan (HCM). Los contaminantes

introducidos por el hombre generan efectos diversos. Ellos pueden no modificar los índices hasta ahora analizados, como refirieron Girón-Pérez y col. en 2006 para Clorpirifos (un insecticida organofosforado) o en 2008 para Endosulfán (ES) (un insecticida organoclorado) sobre *Oreochromis niloticus*, pero afectan elementos de la serie blanca. *Salmo salar* (Petri y col., 2006) y *C. dimerus* (Da Cuña y col., 2011) también resultaron tolerantes al ES, en cuanto a los valores de RGR, HTC y Hb. Sin embargo, *C. dimerus* expuestos a ES, a diferencia de lo que ocurre con OF, mostraron una disminución de los índices VCM, HCM y CHCM, por lo tanto los autores consideraron que padecen, una anemia del tipo microcítica hipocrómica. En el cíclido híbrido *Oreochromis* expuesto a dosis subletales de aluminio, Bhagwan y Bhikajee (2000), diagnosticaron anemia hipocrómica macrocítica. Whitmore (1965) encontró que deficiencias en la dieta de vitamina E produce anemia microcítica en juveniles de *Oncorhynchus tshawytscha*. Los eritrocitos maduros entonces, dado los valores medios obtenidos de VCM, no presentaron variaciones en sus dimensiones, sin embargo con microscopía óptica y electrónica se observaron alteraciones a nivel nuclear. Distintos estudios demuestran que bajo ciertas condiciones patológicas en extendidos de sangre se observan cambios en los eritrocitos maduros que incluyen amitosis, división del núcleo y aparición de células anucleadas. La división medial del núcleo en dos lóbulos se conoce como segmentación y la división irregular en dos o tres partes es conocida como fragmentación (Yokote, 1982). Los eritrocitos con núcleo bilobulado que se observaron en sangre periférica de *C. dimerus*, amitóticos, son considerados entonces, consecuencia de una segmentación patológica ya que ellos se observaron sólo en animales tratados. La división nuclear o células atípicas de anfibios se consideran un ejemplo de amitosis (Pan, 1956; Barni y col., 1995). En triploides de *O. mykiss*, Zou y col., 2006; Han y col., 2007 y Wang y col., 2010, distinguieron comúnmente eritrocitos con el núcleo dividido, morfológicamente muy similares a aquellos de los sapos. Dorafshan y col. (2008) consideraron que las divisiones amitóticas de los eritrocitos en triploides de *Salmo trutta caspius* L. eran un mecanismo para mitigar el estrés en los peces ya que los triploides podrían ser menos tolerantes que los diploides.

La sangre periférica de los peces contiene un número definido de eritrocitos inmaduros. Dado que el número de eritroblastos circulantes aumentó significativamente en los peces expuestos, es probable que la eritropoyesis se haya elevado tendiendo a balancear el

número de eritrocitos circulantes y no resultó suficiente como mecanismo compensatorio. Aumentos de magnitud similar se observaron en *Oncorhynchus kisutch* expuestos a desechos de papeleras (McLeay, 1973) o residuos clorados; (Buckley y col., 1976) y en *Colisa. fasciatus* expuesta a plomo (Srivastav y Mishra, 1979). Witeska (2005), en ensayos realizados con plomo, cobre, cadmio y zinc concluyó para el bagre común que todos los metales inducen un aumento en la frecuencia de eritroblastos.

El número de células blancas también se ve afectado por factores fisiológicos y ambientales y la respuesta que normalmente se observa en los peces expuestos a sustancias tóxicas es una disminución en el porcentaje de linfocitos y un aumento en el de heterófilos (Witeska, 2005). Sin embargo, los contaminantes acuáticos han mostrados tanto activación como supresión en la respuesta del sistema inmune debido a la gran variedad en cuanto a la ruta de exposición, tiempo, dosis y especies de peces (Cuesta y col., 2011). Modesto y Martinez (2010) encontraron para ejemplares juveniles de *Prochilodus lineatus* tratados con un herbicida formulado que contiene glifosato, Roundup Transorb (RDT), un incremento en el número total de leucocitos y linfocitos y un decrecimiento de los neutrófilos. En *C. dimerus* expuestos a OF, el recuento total de leucocitos presenta un leve aumento, particularmente en individuos tratados con la concentración de 150 µg/l. En este grupo ese incremento se debe al aumento significativo en el número de linfocitos.

Bajo condiciones de estrés el sistema de coagulación de la sangre de los peces se vuelve más activo y el recuento de trombocitos se incrementa marcadamente (Casillas y Smith 1977). Sin embargo, en *C. dimerus* expuestos a OF la media de los trombocitos no presentó diferencias significativas entre los peces control y los tratados, es más, se registró una importante disminución en los valores obtenidos en ambas concentraciones.

Si bien, la variación de ciertos índices hematológicos puede considerarse inespecífica, en conjunto, el tipo de anemia, el marcado aumento del número de eritrocitos inmaduros circulantes junto con la aparición de eritrocitos amitóticos podrían utilizarse como biomarcadores de la presencia del xenobiótico OF en el agua.

Ocurrencia de espermatogénesis tipo I y tipo II en los Percomorpha (Mattei, 1970)

bp: marsupio, ef: fecundación externa, ef¹: supuesta fecundación externa, if: fecundación interna, iga: asociación gamética interna

<i>Taxon</i>	<i>Tipo I</i>	<i>Tipo II</i>	<i>Otro</i>	<i>Modo</i>
Beryciformes				
Holocentridae	I			ef
Zeiformes				
Zeidae	I			ef
Synbranchiformes				
Synbranchidae			I biflagelado	ef
Gasterosteiformes				
Gasterosteidae				
Hypoptychidae			I Modificado	ef ¹
Aulorhynchidae			I Modificado	iga
Gasterosteidae			I Modificado	ef
Synganthoidei				
Fistulariidae	I			ef ¹
Syngnathidae			I Modificado	bp
Scorpaeniformes				
Dactylopteroidei				
Dactylopteridae			I Modificado	ef ¹
Scorpaenoidei				
Scorpaenidae				
Scorpaeninae	I			ef
Sebastinae			I Modificado	if
Tetraroginae	I			ef ¹
Triglidae	I		I Modificado	ef ¹
Hexagrammoidei				
Hexagrammidae			I	ef
Cottoidei				
Cottidae			I? Modificado, algunos dispérmicos	ef iga if if
Hemitripterae				
Perciformes				
Percoidei				
Acropomatidae		II		ef ¹
Apogonidae		II	Biflagelado	iga
Carangidae		II		ef ¹
Centracanthidae	I			ef
Centropomidae		II		ef
Cepolidae		II		ef ¹
Chaetodontidae		II		ef
Echeneidae		II		ef ¹
Emmelichthyidae		II		ef ¹
Gerreidae		II		ef ¹
Haemulidae		II		ef ¹
Kuhliidae		II	Intermedio I-II	ef
Latidae		II		ef
Lutjanidae		II		ef ¹
Malacanthidae		II		ef ¹
Monodactylidae		II		ef ¹
Moronidae		I		ef
Mullidae	I	I	Fosa profunda	ef ¹
Opistognathidae		I		ef
Percichthyidae		II		ef
Percidae		II		ef
Pomatomidae		II		ef
Polynemidae		II		ef
Priacanthidae		II		ef ¹
Scianidae		II		ef ¹
Serranidae		II		ef

Sparidae	I			ef
Labroidei				
Cichlidae, most	I		I Modificado	ef
Satanoperca			Biflagellate	if
Embiotocidae			Modificado	if
Pomacentridae	I		Poco Modificado	ef
Labridae	I	II		ef
Zoarcoidei				
Zoarcidae			Modificado, biflagelado	if
Anarhichadidae			I Modificado, biflagelado facultativamente	if
Trachinoidei				
Ammodytidae			I Modificado	ef ¹
Pinguipedidae	I			
Percophidae	I		Poco modificado	
Trachinidae		II		ef
Trichodontidae			I Modificado	ef
Uranoscopidae		II		ef ¹
Blennioidei				
Blenniidae	I	II	Modificado	ef
Clinidae		II	Modificado	ef
Gobiesocoidei				
Gobiesocidae			Muy modificado, biflagelado	ef
Gobioidei				
Eleotridae			I Modificado	ef
Gobiidae	I		Modificado de I	ef
Odontotubidae			I Distintas modificaciones	ef
Pterelotridae			Muy modificado	ef
Rhyacichthyidae	I			ef
Schindleridae			Muy modificado	ef
Acanthuroidei				
Acanthuridae		II		ef ¹
Ephippidae		II		ef ¹
Siganidae	I			ef
Scombroidei				
Istiophoridae	I			ef
Scombridae		II		ef
Sphyraenidae		II		ef ¹
Trichiuridae		II		ef
Stromateoidei				
Ariommatidae		II		ef ¹
Anabantoidei				
Anabantidae		II		ef
Osphronemidae	I			ef
Pleuronectiformes				
Pleuronectoidei				
Citharidae	I			ef ¹
Scophthalmidae	I			ef
Paralichthyidae	I			ef
Pleuronectidae	I			ef
Bothidae	I?			ef ¹
Soleidae	I			ef ¹
Tetraodontiformes				
Balistoidei				
Balistidae	I		Fosa profunda	ef
Diodontidae	I			ef ¹
Monacanthidae	I			ef
Tetraodontoidei				
Tetraodontidae	I			ef

Modificado de Jamieson (2009)


Información sobre producto

Synonyms	4-tert-Octylphenol
Fórmula empírica (según Hill)	C ₁₄ H ₂₂ O
Fórmula química	4-[(CH ₃) ₂ CCH ₂ C(CH ₃) ₂]C ₆ H ₄ OH
Número HS	2907 13 00
Número CE	205-426-2
Masa molar	206.33 g/mol
Número de índice CE	604-075-00-6
Número CAS	140-66-9



Datos químicos y físicos

Temperatura de ignición	410 °C
Solubilidad en agua	< - 0.01 g/l (20 °C)
Punto de fusión	80 - 83 °C
Masa molar	206.33 g/mol
Densidad	0.95 g/cm ³ (20 °C)
Bulk density	480 kg/m ³
Punto de ebullición	279 - 281 °C (1013 hPa)
Presión de vapor	0.0021 hPa (20 °C)
Temperatura de inflamabilidad	147 °C

Información de seguridad de acuerdo a GHS

Hazard Statement(s)	H315: Provoca irritación cutánea. H318: Provoca lesiones oculares graves. H410: Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Precautionary Statement(s)	P273: Evitar su liberación al medio ambiente. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
Signal Word	Peligro
Hazard Pictogram(s)	
Clase de almacenamiento	8A Materiales corrosivos peligrosos, combustibles
WGK	WGK 2 contamina el agua
Disposal	3 Los reactivos orgánicos líquidos relativamente no reactivos desde el punto de vista químico se recogen en la categoría A. Si contienen halógenos se les asigna la categoría B. Residuos sólidos: categoría C.

Información de seguridad

Frase R	R 38-41-50/53 Irrita la piel. Riesgo de lesiones oculares graves. Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
Frase S	S 26-37/39-60-61 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsense guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos. Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.
Características de peligrosidad	irritante, corrosivo, peligroso para el medio ambiente
Hazard Symbol	 Irritant  Dangerous for the environment

Información de transporte

Clasificación (Transporte terrestre) ADR, RID	UN 2430 Alkylphenole, fest, n.a.g.(4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-PHENOL), 8, III
Clasificación (Transporte marítimo) IMDG-Code	UN 2430 ALKYLPHENOLS, SOLID, N.O.S.(4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-PHENOL), 8, III
Clasificación (Transporte aéreo) IATA-DGR	UN 2430 ALKYLPHENOLS, SOLID, N.O.S., 8, III

Datos toxicológicos

LD 50 oral	DL50 rata > 2000 mg/kg
LD 50 dérmica	DL50 conejo 1880 mg/kg

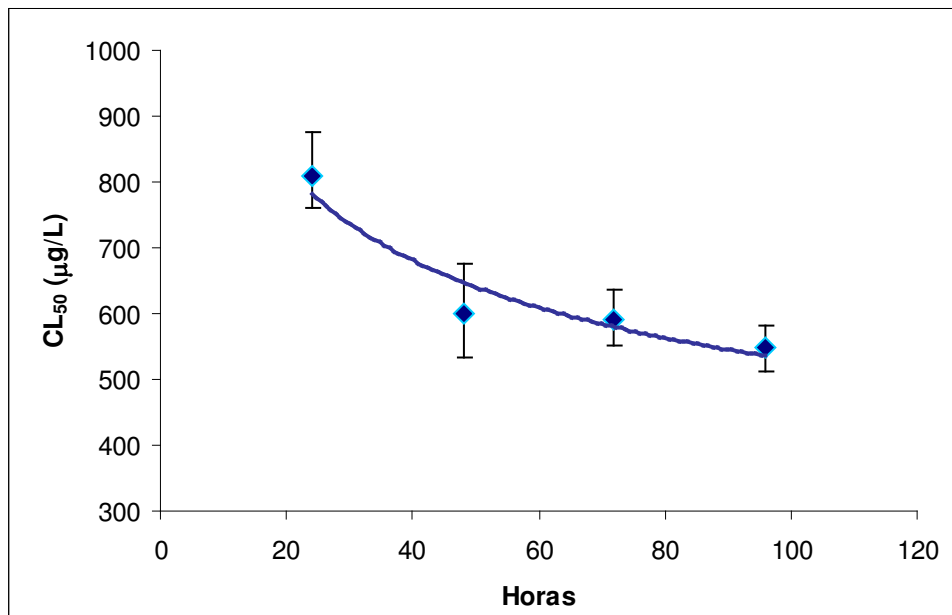
Anexo III

Características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua filtrada utilizada en los ensayos de exposición. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio Central de Agua y Saneamientos Argentinos S.A.

Parámetro	Unidad	Resultado
Color	unidades	< 5
Turbidez	NTU	0,35
pH	unidades	7,5
Conductividad	μS/cm	219
Residuo conductimétrico	mg/L	148
Alcalinidad total (CO ₃ Ca)	mg/L	36,5
Cloruros	mg/L	25,5
Nitratos (NO ₃ ⁻)	mg/L	< 2,0
Sulfatos	mg/L	20,7
Fluoruros	mg/L	< 0,5
Hierro	mg/L	< 0,05
Bacterias heterótrofas viables a 36 °C	UFC/mL	< 1
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	< 1

Parámetro	Unidad	Resultado
Calcio	mg/L	17
Magnesio	mg/L	3,2
Sodio	mg/L	20
Potasio	mg/L	2,3
Dureza total (CO ₃ Ca)	mg/L	55
Nitritos (NO ₂ ⁻)	mg/L	0,13
Amonio (NH ₄ ⁺)	mg/L	< 0,05
Arsénico total	mg/L	< 10
Oxígeno disuelto	mg/L	8
Cloro libre	mg/L	No contiene
Manganeso	mg/L	< 0,04
Coliformes totales	UFC/100 mL	< 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P-A/100 mL	No contiene

Curva de toxicidad del OF para individuos adultos de *C. dimerus*. El valor de la CL_{50} a 96h corresponde al umbral de letalidad incipiente.



Resultados del análisis de datos del Probit para el cálculo de la CL-50 para el OF en adultos de *C. dimerus* . . .

ENSAYO: CL50
 ESPECIE: *C. dimerus*
 ESTADIO: adulto
 SEXO: ambos

FECHA: 1/6/06
 TOXICO: OF
 HS. TRATAMIENTO: 96
 ANALISIS: PROBIT

*** DATOS ***

CONCENTRACION	NRO. DE ANIMALES	NRO. DE MUERTOS
700	12	12
600	12	10
500	12	2
400	12	0
CONTROL	12	0

*** RESULTADOS ***

NRO. DE CICLOS: 2

PENDIENTE: 25.3213996887207
 ORDENADA AL ORIGEN: -64.33380889892578
 VARIANZA DE LA PENDIENTE: 46.39083099365234
 COEFICIENTE DE CORRELACION: .9959011077880859

CHI CUAD. TOTAL: 13.878005027771

CHI CUAD. DE LA REGRESION: 13.82112121582031
 PROBABILIDAD: 1.99999994947575E-004

CHI CUAS. DE LAS DESV. DE LA LINEALIDAD: 5.688425526022911E-002
 GRADOS DE LIBERTAD: 2
 PROBABILIDAD: .9720000028610229

G: .2779513895511627

LOG CL 50: 2.738150835037231
 VARIANZA DEL LOG CL 50: 1.432204444427043E-004
 LIMITE INFERIOR DEL I.C. PARA LOG CL 50: 2.709291696548462
 LIMITE SUPERIOR DEL I.C. PARA LOG CL 50: 2.764554738998413

CL 50: 547.2059936523438
 LIMITE INFERIOR DEL I.C. PARA LA CL 50: 512.025634765625
 LIMITE SUPERIOR DEL I.C. PARA LA CL 50: 581.5067138671875

Conclusiones

Capítulo I

Como en otros vertebrados, el testículo de *Cichlasoma dimerus* está constituido por un compartimento germinal y uno intersticial, separados por una membrana basal. La estructura es del tipo lobular irrestricta con espermatogénesis del tipo cística.

Se caracterizaron los distintos estadios de la espermatogénesis. Los espermatozoides en esta especie corresponden a la categoría acuasperma anacrosomal tipo I. y se determinó que son biflagelados, carácter excepcional en cíclidos, con aletas laterales en ambos flagelos y un collar mitocondrial formado por cuatro anillos de nueve mitocondrias redondas.

C. dimerus presenta cinco clases reproductivas durante el ciclo reproductivo anual: proliferación, maduración temprana, maduración media, maduración tardía (o final) y regresión. Se propone el término “proliferación” en reemplazo del “clase regresada”, dado que interpreta la serie de rápidas divisiones mitóticas espermatogoniales que ocurren en esta etapa. Esta clasificación se basa en los estadios de las células germinales presentes y en la alternancia entre un epitelio germinal continuo y discontinuo. La estación de alta actividad reproductiva de esta especie se extiende a lo largo de siete meses, desde septiembre hasta marzo, durante los cuales las puestas tienen lugar cada $29,4 \pm 16,2$ días, como resultado de ciclos completos en los que se suceden las primeras cuatro de las cinco clases mencionadas. Los IGS comienzan a aumentar en septiembre, y descienden a partir de abril, cuando las temperaturas bajan y se acorta el fotoperíodo. Durante el invierno, cuando la actividad reproductiva es mínima, la mayoría de los peces presentan testículos en clase regresión y con los menores valores de los IGS.

Se estableció la toxicidad letal aguda del octilfenol para adultos de la especie en estudio, en un valor de 547,21 µg/l.

Las concentraciones de OF descienden bruscamente produciendo una exposición efectiva a concentraciones menores que las nominales y a modo de pulsos.

La inmunodetección de Vtg en el mucus superficial y su correlación con la Vtg plasmática en ejemplares machos adultos de *C. dimerus* expuestos a OF, demostró ser un método sensible y poco invasivo como biomarcador de exposición a estrógenos ambientales.

Los efectos adversos sobre los testículos ocurren a concentraciones nominales altas. La fibrosis intersticial aumentada, la pérdida de la organización lobular del testículo y el deterioro cístico están relacionados con la concentración del xenoestrógeno en el agua e inhiben la funcionalidad del testículo. Los efectos histopatológicos producidos por las concentraciones de OF utilizadas son reversibles y tras un breve período de depuración se da la recuperación funcional del órgano.

Capítulo II

Se caracterizaron las células sanguíneas y se establecieron los parámetros hematológicos del pez cíclido *C. dimerus* en estado de salud, bajo condiciones estandarizadas.

El OF genera estrés hemodinámico y produce anemia normocrómica, normocítica, un aumento de eritroblastos y presencia de eritrocitos amitóticos de manera dependiente de la concentración en el medio.

Dado que el ambiente influye en las características hematológicas de los peces es básico contar con valores de referencia. Este conocimiento es una herramienta importante para el monitoreo de distintos aspectos de la salud de los peces a partir de variaciones en los índices hematológicos y alteraciones eritrocitarias.

Bibliografía

Introducción general.

- Alonso F., M. Cánepa, R. G. Moreira and M. Pandolfi.. 2011. Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlidfish *Cichlasoma dimerus* under laboratory conditions. *Neotropical Ichthyology*. 9 (3): 559-570.
- Capó Martí M A, 2007. *Toxinología Clínica, Alimentaria y Ambiental*. Editorial Complutense. P. 173.
- Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, A. 1998. Effects of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout, *Zoarces viviparus* . *J. Exp. Biol.* 201, 179-192.
- Domitrovic, H.A..1997. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870). *Rev. Ictiología* 5 (1/2): 37-42
- Hirt, L.M. y Domitrovic, H.A.. 2002. Toxicity and histopathological response in *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) exposes to mercury dichloride in acute and sublethal tests. *Rev.ictiol.*10 (1/2):37-52.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Guillette, L. Jr. 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch. Environ. Con. Tox.* 40, 392-398.
- Gray, M.A., Metcalfe, C.D. 1997. Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1082-1086.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D., Brouwer, M., 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health. Perspect.* 107, 385- 390.
- Jobling, S., and J. P. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27(3-4): 361-72.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. 1996. Inhibitor of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194-202.
- Kardong, K V, 1997. *Vertebrates: comparative anatomy, function, Evolution*. 2nd Ed. WCB/McGraw-Hill. P 747.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A., 2000. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *J. Exp. Biol.* 203, 171-181.
- Knörr, S., Braunbeck, T., 2002. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 187-196.
- Langeland, J. and C. B. Kimmel. 1997. The embryology of fish. *In* S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), *Embryology: Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 383-407.
- Lister A L. and G J. Van Der Kraak. 2001. Endocrine Disruption: Why Is It So Complicated?. *Water Qual. Res. J. Canada.* 36 (2), 175-190.
- Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley, T.R., March, R.E., Potter, T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 297-308.
- Nelson, J S, 2006. *Fishes of the World*. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc. P 602.
- Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara and E. Tamiya. 2002. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 132: 161-169.

- Polder, J. J. K. 1971. On gonads and reproductive behaviour in the cichlid fish *Aequidens portalegrensis* (Hensel). – *Netherlands Journal of Zoology* 21: 265–365.
- Pough, F.H., Janis C.M., Heiser J.B., 1999. *Vertebrate Life*. Fifth Ed. Prentice Hall. P. 733.
- Rasmussen, T.H., Korsgaard, B., 2004. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 1-10.
- Rasmussen, T.H., Teh, S.J., Bjerregaard, P., Korsgaard, B. 2005. Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Aquat. Toxicol.* 72, 177-194.
- Renner, R. 1997. European bans on Surfactants Trigger Transatlantic Debate, *Env. Sci. and Tech.*, 31:316A-320A.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103: 173-178.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. 2001. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 458-467.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175-182.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environ. Intern.* 28, 215-226.

Capítulo 1 Sección A

- Alvarenga, E. R., Bazzoli N., Santos, G. B., Rizzo, E. 2006. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. - *Revista Brasileira de Zoologia* 23(2): 314–322.
- Batlouni, S. R., Romagosa, E. and Borella, M. I. 2008. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. - *Animal Reproduction Sci* 96: 116–132.
- Billard R. 1969. Spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I—Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*; 9:251–271.
- Billard, R. 1984. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. - *Cell and Tissue Research* 237: 219–226.
- Bozzola, J. J. and Russell, L. D. 1992. *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologist*. 542 pp. Jones and Bartlett Publishers, London:
- Bromage, N., Porter, M. and Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special references to the role of photoperiod and melatonin. - *Aquaculture* 197: 63–9.
- Brown-Peterson, N. 2003. The reproductive biology of spotted seatrout. In S. Bortone (ed.), *Biology of the Spotted Seatrout*. pp. 99–134. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Brown-Peterson, N. J., Grier, H. J. and Overstreet, R. M. 2002. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. - *Journal of Fish Biology* 60: 178–202.
- Brown-Peterson, N., Lowerre-Barbieri, S., Macewicz, B., Saborido-Rey, F., Tomkiewicz, J. and Wyanski, D. 2007. An improved and simplified terminology for reproductive classification in fishes. Available at: <http://hdl.handle.net/10261/11844>.
- Burns, J. R., Quagio-Grassiotto, I. and Jamieson, B. G. M. 2009. Ultrastructure of spermatozoa: Ostariophysi. In: Jamieson, B. G. M. (Ed.): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes): Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*, Vol. 8A, pp. 287–387. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Callard, G.V. 1991. Spermatogenesis. In: Pang P., Schreiber, M. (Eds). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. pp. 303-341. New York: Academic Press.

- Callard, G.V. 1996. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.). *The Leydig Cell*. pp. 308–331. Cache River Press, Vienna, IL, USA.
- Chung, E. Y. 2008. Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). - *Tissue and Cell* 40: 195–205.
- Cinquetti, R. and Dramis, L. 2003. Histological, histochemical and enzyme histochemical and ultrastructural investigations of the testis of *Padogobius martensi* (Pisces, Gobiidae) between breeding seasons. - *Journal of Fish Biology* 63(6): 1402.
- Clérot, J.C. 1971. Les ponts intercellulaires du testicule de gardon: organisation syncytiale et synchronie de la différenciation des cellules germinales. - *Journal of Ultrastructural Research* 37: 690–703.
- De Rooij, D.G., Russell, L.D.. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 21:776–798.
- Fiszbein, A., Cánepa, M., Rey Vázquez, G., Maggese, C. and Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlidfish *Cichlasoma dimerus*. - *Physiology & Behavior* 99: 425–432.
- Gilbert, S. 2003. *Developmental Biology* pp. 1-838. Sinauer Associates Inc., USA.
- Godinho, H. P. 2007. Reproductive strategies of fishes applied to aquaculture: bases for development of production technologies. - *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31(3): 351–360.
- Gresik, E. W., Quirk, J. G. and Hamilton, J. B. 1973. A fine structural and histochemical study of the Leydig cells in the testis of the teleost, *Oryzias latipes* (Cypriniforme). - *General and Comparative Endocrinology* 20: 86-98.
- Grier, H. J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. - *American Zoologist* 21: 345–357.
- Grier, H. J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell, L.D., Griswold, M.D. (Eds.). *The Sertoli Cell*. pp. 703–739. Cache River Press, Clearwater.
- Grier, H. J. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology* **243**, 265–281.
- Grier, H. J. 2002. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. - Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, Biloxi, Mississippi November 2000. (Creswell, L. R., ed.). pp. 537–552. Fort Pierce, F. L.: Alabama Sea Grant Consortium.
- Grier, H. J. and Taylor, R. G. 1998. Testicular maturation and regression in common snook. - *Journal of Fish Biology* 53: 521–542.
- Grier, H. and Lo Nostro, F. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Anderson, E., Stefansson, S.O. (Eds.). pp. 233-236. Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. The University of Bergen, Bergen, Norway.
- Grier, J. H. and Uribe Aranzábal, M. C. 2009. The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. Jamieson BGM, editor. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. *Phylogeny, Reproductive system, Viviparity, Spermatozoa*. pp. 119–142. Enfield: Science Publishers.
- Grier, H., van der Hurk, R. and Billard, R. 1989. Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. - *Cell and Tissue Research* 257: 491-496.
- Guimaraes ACD, Quagio-Grassiotto I. 2001. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei, Characiformes, Characidae). *Tissue Cell* 33:241–248.
- Hourigan, T. F., Nahamura, M., Nagahama, Y., Yamauchi, K. and Grau, E. G. 1991. Histology, ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the

- protogynous fish *Thalassoma duperrey* (Labridae). – *General and Comparative Endocrinology* 83: 193-217.
- Houwing, S., Kamminga, L. M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C. B., Plasterk, R. H., Hannon, G. J., Draper, B. W. and Ketting, R. F. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. - *Cell* 129(1): 69-82.
- Jamieson, B. G. M. 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. 319 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jamieson, B. G. M. 2009. Ultrastructure of Spermatozoa: Acanthopterygii continued: Percomorpha. Jamieson BGM, editor. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes). Phylogeny, Reproductive system, Viviparity, Spermatozoa*. pp 503–684. Enfield: Science Publishers.
- Jamieson, B. G. M. and Leung, L.K.P. 1991. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. 319 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., and Nüsslein-Volhard, C. 2000. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. - *Journal of Cell Biology* 149(4): 875-888.
- Lo Nostro, F., Grier, H., Andreone, L. and Guerrero, G. 2003a. Involvement of the gonadal germinal epithelium during sex reversal and seasonal testicular cycling in the protogynous swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchidae). - *Journal of Morphology* 258: 107-126.
- Lo Nostro FL, Grier H, Meijide FJ, Guerrero GA. 2003b. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. *Tissue Cell* 35: 121–132.
- Lo Nostro, F., Antoneli, F., Quagio-Grassiotto, I. and Guerrero, G. 2004. Testicular interstitial cells, and steroidogenic detection in the protogynous fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). - *Tissue and Cell* 36: 221-231.
- Matos, E., Santos, M. N. S. and Azevedo, C. 2002. Biflagellate spermatozoon structure of the hermaphrodite fish *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840) (Teleostei, Cichlidae) from the Amazon River. - *Brazilian Journal of Biology* 62: 847-852.
- Mattei, X. 1970. Spermiogenése comparé des poisson. In: Baccetti, B. (Ed): *Comparative Spermatology*. pp. 57–72. Academic Press, New York.
- Mattei, C, Mattei X and Marchand, B. 1979. Réinvestigation de la structure des flagelles spermatiques: les doublets 1, 2, 5 et 6. *Journal of Ultrastructure Research*. 69: 371-377.
- Mattei, X. 1988. The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. *Ultrastructure and evolution. Biology of the Cell*. 63: 151-158.
- Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. - *Canadian Journal of Zoology* 69: 3038-3055.
- Mattei, X. 1993. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces: Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. - *Journal of Fish Biology* 43: 931–937.
- Meijide, F.J., Lo Nostro F.L., and Guerrero G.A.. 2005. Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. - *Journal of Morphology* 264:191–210
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H (1991a) Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool Sci* 8: 63–73.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol.9. Part A, 433 pp., Part B, 477pp. Academic Press, New York.
- Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialezki, A., Sanches, P. V., Makrakis, M. C. and Pavanelli, C. S.. 2001. *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. 378 pp. Eduem, Maringá.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. 601 pp. 4th ed. John Wiley and Sons, New York.

- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R. and França, L. R. 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. - *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 197–206.
- Parenti, L. and Grier, H. 2004. Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. – *Integrative and Comparative Biology* 44:333–348.
- Parenti, L., Lo Nostro, F. and Grier, H.J. 2010. Reproductive Histology of *Tomeurus gracilis* Eigenmann, 1909 (Teleostei: Atherinomorpha: Poeciliidae) With Comments on Evolution of Viviparity in Atherinomorph Fishes. *Journal of Morphology* 271: 1399-1406.
- Polder, J. J. K. 1971. On gonads and reproductive behaviour in the cichlid fish *Aequidens portalegrensis* (Hensel). - *Netherlands Journal of Zoology* 21(3): 265-365.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. - *Microscopy Research and Technique* 32: 459–497.
- Pudney, J. 1996. Comparative cytology of the Leydig cell. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (Eds). *The Leydig Cell*. pp. 98–142. Cache River, Vienna, Ill.
- Quagio-Grassiotto I. and Carvalho ED. 1999. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue Cell* 31:561–567.
- Quagio-Grassiotto, I., Antoneli, F. N. and Oliveira, C. 2003. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroides spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). - *Tissue and Cell* 35(6): 441-6.
- Ravaglia MA, Maggese MC. 2003. Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. *Tissue Cell* 35:9–17.
- Schulz, R. W., de Franca, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-García, H., Nóbrega, R. H. and Miura, T. 2009. Spermatogenesis in fish. - *General and Comparative Endocrinology* 165(3): 390-411.
- Scott, A. P. and Sumpter, J. P. 1989. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. – *General and Comparative Endocrinology* 73: 46-58.
- Singh, R., Chaturvedi, S. K., Abhinav. 2010. Effect of photoperiod and temperature on testicular regression in *Channa punctatus*. – *Journal Environmental Biology* 31(3): 307-10.
- Stafstrom, J. P. and Staehelin, L. A. 1984. Are Annulate Lamellae in the Drosophila Embryo the Result of Overproduction of Nuclear Pore Components?. - *The Journal of Cell Biology* 98: 699-708.
- Taylor, R. G., Grier, H. J. and Whittington, J. A. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. - *Journal of Fish Biology* 53: 502–520.
- Wallace RA, Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc Tech* 16:175–201.

Capítulo I Sección B

- Ackerman, G.E., Schwaiger, J., Negele, R.D., Fent, K., 2002. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 60, 203-221.
- Ahel, M., Giger, W., 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26, 1471-1478.
- Ahel, M., Conrad, J., Giger, W., 1985. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 57, 1577-1583.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.* 79, 243-248.
- Ahel, M., Scully, F.E., Hoigné, J., Giger, W., 1994. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere* 28, 1361-1368.

- Allen, Y., Scott, A. P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J. E., & Feist, S., 1999. Survey of oestrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1791-1800.
- Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* 65, 1057–1066.
- Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., Orberg, J., 2007. Effects of 17 alpha-ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* 83, 33-42.
- Andreassen, T.K., Skjoedt, K. and Korsgaard, B., 2005. Upregulation of estrogen receptor alpha and vitellogenin in eelpout (*Zoarces viviparus*) by waterborn exposure to 4-tert-octylphenol and 17-beta-estradiol. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 140, 340-346.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøyr, A., 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 49, 159-170.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp. Hepatol.* 2, 4.
- Arukwe, A., Røe, K., 2008. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol. *Cell. Tissue. Res.* 331, 701-712.
- Balch, G., Metcalfe, C., 2006. Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. *Chemosphere* 62, 1214-1223.
- Bayley, M., Nielsen, J.R. and Baatrup, E., 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotox. Environ. Saf.* 43, 68-73.
- Bennett, E.R., Metcalfe, C.D., 1998. Distribution of alkylphenol compounds in Great Lakes sediments, United States and Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1230-1235.
- Bennie, D. T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Can.* 34, 79-122.
- Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E., Maguire, R J., 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.* 193, 263-275.
- Betka, M., Callard G.V., 1998. Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. *APMIS.* 106, 252-257.
- Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* 29, 1623-1629.
- Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E., Porcher J.M., 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *J. Chromatogr. B* 737, 3-12.
- Brooke, D, I Johnson, R Mitchell and C Watts. 2005. Environmental Risk Evaluation Report: 4-tert-Octylphenol. Published by: Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol, BS32 4UD.
- Campbell, B., Dickey, J.T., Swanson, P., 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 69, 2109–2117.
- Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, A., 1998. Effects of nonylphenol and 17β-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout, *Zoarces viviparus*. *J. Exp. Biol.* 201, 179-192.
- Condeça, J.B., Canario, A.V.M., 1999. The effect of estrogen on the gonads and on in vitro conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17β in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 59-72.
- Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M., 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals. A re-evaluation. *Environ. Pollut.* 64, 107-120.

- Ekelund, R., Granmo, A., Magnusson, K., Berggren, M., Bergman, A., 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. Pollut.* 79, 59-61.
- Fielder, BR, Dellapenna, TM, Savarese, M. 2006. Anthropogenic and natural influences on present-day sediment deposition and oyster reef distribution and restoration for the Naples Bay estuarine complex. *Eos Transactions AGU 87(36) Ocean Science Meeting Supplement Abstract OS46C-06.*
- Finney, D.J., 1971. *Probit analysis* (3rd ed). Cambridge University Press, Londres, Reino Unido. 333 pp.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y., Valotaire, Y., 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor gene. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 317-323.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Guillette, L. Jr., 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch. Environ. Con. Tox.* 40, 392-398.
- Fossi, M., Casini, S., Marsili, L., 1999. Nondestructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemicals in endangered species of wildlife. *Chemosphere* 39, 1273-1285.
- Garcia-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J.C., van Dijk, W., Trant, J.M., Taranger, G.L., Schulz, R.W., 2008. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology* 150, 357-365.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Lebail, P.Y., Breton, B., LeGac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 413-428.
- Gray, M.A., Metcalfe, C.D., 1997. Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1082-1086.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D., Brouwer, M., 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health. Perspect.* 107, 385-390.
- Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F., Zanuy, S., 2007. Anti-Mullerian hormone in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively spliced isoforms. *Gene* 388, 148-158.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Dumpter, J.P., Tylor, T., Zaman, N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Env. Toxicol. Chem.* 16, 534-42.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T., Fujita, K., 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yakohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar. Environ. Res.* 49, 37-53.
- Hennies, M., Wiesmann, M., Allner, B., Sauerwein, H., 2003. Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Sci. Total Environ.* 309, 93-103.
- Herman, R., Kincaid, H., 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72, 165-172.
- Hinton, D.E., Couch, J.A., 1998. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. *EXS* 86, 141-146.
- Holland Toomey, B., Monteverdi, G.H., Di Giulio, R.T., 1999. Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 734-739.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2001. Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B, 449-455.
- Jespersen, A., Rasmussen, T., Hirche, M., Sorensen, K. and Korsgaard, B., 2010. Effects of exposure to the xenoestrogen octylphenol and subsequent transfer to clean water on liver and gonad ultrastructure during early development of *Zoarces viviparus* embryos. *J. Exp. Zool.* 313A, 399-409.

- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194-202.
- Johnsen, H.K., Tveiten, H., Willassen, N.P., Arnesen, A.M., 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comp. Biochem. Physiol. B* 124, 355-62.
- Kang, I.J.; Yokota, H.; Oshima, Y.; Tsuruda, Y.; Hano, T.; Maeda, M.; Imada, N.; Tadokoro, H.; Honjo, T., 2003. Effects of 4-nonylphenol on reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2438-2445.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A., 2000. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *J. Exp. Biol.* 203, 171-181.
- Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci. Total Environ.* 225, 3-11.
- Kishida, M., Specker, J.L., 1994. Vitellogenin in the surface mucus of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): possibility for uptake by the free-swimming embryos. *J. Exp. Zool.* 268, 259-268.
- Kishida, M., Specker, J.L., 2000. Paternal mouthbrooding in the Black-Chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): changes in gonadal steroids and potential for vitellogenin transfer to larvae. *Horm. Behav.* 37, 40-48.
- Kishida, M., Anderson, T.R., Specker, J.L., 1992. Induction of vitellogenin in Striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 29-39.
- Knoebel, I.; Hemmer, M.J.; Denslow, N.D., 2004. Induction of zona radiata and vitellogenin genes in estradiol and nonylphenol exposed male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Mar. Environ. Res.* 58, 547-551.
- Knörr, S., Braunbeck, T., 2002. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 187-196.
- Lareyre, J.J., Ricordel, M.J., Mahé, S., Goupil, A.S., Vizziano, D., Bobe, J., Guiguen, Y., LeGac, F., 2008. Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. *Cybiu (Suppl. 32)*, 133-135.
- Lewis, S.K., Lech, J.J., 1996. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol in rainbow trout. *Xenobiotica* 26, 813-819.
- Loomis, A.K., Thomas, P., 1999. Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogen and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biol. Reprod.* 61, 51-60.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Madsen, L.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2006. Oral single pulse exposure of flounder *Platichthys flesus* to 4-tert-octylphenol: Relations between tissue levels and estrogenic effects. *Mar. Environ. Res.* 61, 352-362.
- Maltais, D., Roy, R. 2007. A lateral flow immunoassay for rapid evaluation of vitellogenin levels in plasma and surface mucus of the copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1672-1676.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213, 18-32.
- Meier, S.; Andersen, T.; Norberg, B.; Thorsen, A.; Taranger, G.L.; Kjesbu, O.S.; Dale, R.; Craig Morton, H.; Klungsoyr, J.; Svardal, A. 2007. Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 81: 207-218.
- Meijide, F.J. 2007. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol y 17 β -estradiol. Tesis Doctoral. P.

- Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley, T.R., March, R.E., Potter, T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 297-308.
- Meucci, V., Arukwe, A., 2005. Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 73, 1-10.
- Milla, S., Terrien, X., Sturm, A., Ibrahim, F., Giton, F., Fiet, J., Prunet, P., LeGac, F., 2008. Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17 α ,20 β -dihydroxyprogesterone on the milt fluidity? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 19.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991a. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5774-5778.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991b. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male eel (*Anguilla japonica*). *Biomed. Res.* 12, 241-248.
- Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1995. Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia in vitro in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish. Sci.* 61, 434-437.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., Yamauchi, K., 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 230-4.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., Yamauchi, K., 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129, 2689-2697.
- Miura, T., Ohta, T., Miura, C.I., Yamauchi, K., 2003. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144, 5504-5510.
- Miura, C., Higashino, T., Miura, T., 2007. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biol. Reprod.* 77, 822-828.
- Moncaut, N., Lo Nostro, F., Maggese, M.C., 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquat. Toxicol.* 63, 127-137.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., Kondoh, H., 2007. The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9691-9696.
- Nader, M.R., Miura, T., Ando, N., Miura, C., Yamauchi, K., 1999. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol. Reprod.* 61, 944-947.
- Nichols, K.M., Miles-Richardson, S.R., Snyder, E.M., Giesy, J.P., 1999. Effects of exposure to municipal wastewater in situ on the reproductive physiology of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (9), 2001-2012.
- Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R. Tamiya, E., 2002. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* A 132, 161-169.
- Noakes, D.L.G., 1979. Parent-touching behaviour by young fishes: incidence, function and causation. *Environ. Biol. Fish.* 4, 389-400.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M., 2005. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 133-144.
- Pala, I., Kluver, N., Thorsteinsdottir, S., Schartl, M., Coelho, M.M., 2008. Expression pattern of anti-Mullerian hormone (amh) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. *Gene* 410, 249-258.

- Park, C. B., Kim, B.H., Na, O.H., Choi, Y.C., Lee, Y.D., Baek, H.J., Kim, H.B., Akihiro Takemura., 2003. Induction of *in vitro* vitellogenin synthesis by bisphenol, nonylphenol and octylphenol in Chinese Minnow (*Phoxinus oxycephalus*) Hepatocytes. Korean J. Biol. Sci. 7, 227-235.
- Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Hepell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V., 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comp. Biochem. Physiol. C 123, 113-125.
- Pedersen, R. T. and Hill, E. M., 2002. Tissue distribution and depuration of 4-tert-octylphenol residues in the cyprinid fish, *Scardinius erythrophthalmus*. Environ. Sci. Technol. 36(15), 3275-83.
- Pedersen, K. H., S. N. Pedersen, K. L. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, 2003. Estrogenic effect of dietary 4-tert-octylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquatic Toxicology. 62, 295-303.
- Perez Carrera, E., García López, A., Martín del Río, M.P., Martínez Rodríguez, G, Solé, M. and Mancera, J.M., 2007. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*) Comp. Biochem. Physiol. C 145, 210-217.
- Pinto, P.I.S., Teodosio, H.R., Galay-Borgos, M., Power, D.M., Sweeney, G.E., 2006. Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization. Mol. Reprod. Dev. 73, 318– 329.
- Planas, J.V., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 1993. Regulation of testicular steroid production *in vitro* by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Comp. Endocrinol. 91, 8–24.
- Prat, F., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol. Reprod. 54, 1375–1382.
- Rasmussen, T.H., Korsgaard, B., 2004. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*). Comp. Biochem. Physiol. C 139, 1-10.
- Rasmussen, T.H., Teh, S.J., Bjerregaard, P. Korsgaard, B., 2005. Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*). Aquat. Toxicol. 72, 177-194.
- Regueira, M., 2008. Efectos de la exposición a 4-tert-octilfenol sobre la vitelogenina y las proteínas de envoltura vitelina en machos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tesis de Licenciatura, F C E y N, UBA. 91pp.
- Robinson, C.D., Brown, E., Craft, J.A., Davies, I.M. and Moffat, C.F., 2004. Effect of prolonged exposure to 4-tert-octylphenol on toxicity and indices of oestrogenic exposure in the sand goby (*Pomatoschistus minutes*, Pallas). Mar. Environ. Res. 58, 19-38.
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.-L., BreMiller, R.A., Wilson, C., Canestro, C., Postlethwait, J.H., 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. Gene Exp. Patterns 5, 655–667.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogen activity. J. Biol. Chem. 272, 3280-3288.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev. Biol. 301, 266–275.
- Schulz, R. W., de Franca, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-García, H., Nóbrega, R. H. and Miura, T. 2009. Spermatogenesis in fish. - *General and Comparative Endocrinology* 165(3): 390-411.
- Schütz, M., Barlow, G.W., 1997. Young of the Midas cichlid get biologically active nonnutrients by eating mucus from the surface of their parents. Fish. Physiol. Biochem. 16, 11-18.

- Segner, H., Navas, J.M., Schfers, C., Wenzel, A., 2003. Potencies of estrogenic compounds in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotox. Environ. Saf.* 54, 315-322.
- Shiraishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Yokoi, H., Wakamatsu, Y., Abe, S.-I., Kitano, T., 2008. Müllerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149, 1813–1819.
- Silversand, C., Hyllner, S.V., Haux, C., 1993. Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.* 267, 587-597.
- Song, M., Gutzeit, H.O., 2003. Effect of 17 α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev. Growth Differ.* 45, 327–337.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103: 173-178.
- Takemura, A., Oka, M., 1998. Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquacult. Res.* 29, 245-249.
- Trudeau, V.L., Wade, M.G., Van Der Kraak, G., Peter, R.E., 1993. Effects of 17 β -estradiol on pituitary and testicular function in male goldfish. *Can. J. Zool.* 71, 1131-1135.
- Utarabhand, P., Bunlipatanon, P., 1996. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): isolation and properties. *Comp. Biochem. Phys. C* 115, 101-110.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2001. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4-*tert*-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 458-467.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotox. Environ. Saf.* 56, 271-281.
- Van Veld, P.A., Rutan, B.J., Sullivan, C.A., Danielle Johnston, L., Rice, C.D., Fisher, D.F., Yonkos, L.T. 2005. A universal assay for vitellogenin in fish mucus and plasma. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3048-3052.
- Wahli, T., Meier, W., Segner, H., Burkhardt-Holm, P., 1998. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers. *Histochem. J.* 30, 758-759.
- Warhurst, A.M., 1995. An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. Friends of the earth, London.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175-182.
- Yamamoto, M., Egami, N., 1974. Sexual differences and age changes in the fine structure of hepatocytes in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Am. J. Anat.* 82, 353-391.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002a. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environ. Intern.* 28, 215-226.
- Ying, G.G., Rai S.K. and Ying-Jun R. 2002b. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environment International* 28, 545.
- Ying, GG; Kookana, RS and Dillon, P. 2004. Attenuation of two estrogen compounds in aquifer materials supplemented with sewage effluent. *Ground Water Monitoring & Remediation.* 24 (2): 102-107.
- Yoon, S.H., Itoh, Y., Kaneko, G., Nakaniwa, M., Ohta, M. and Watabe, S., 2008. Molecular characterization of Japanese sillago vitellogenin and changes in its expression levels on exposure to 17-beta-estradiol and 4-*tert*-octylphenol. *Mar. Biotechnol. (NY)* 10, 19-30.

Capítulo II Sección A

- Adeyemo, O.K.; Okwilagwe, O.O.; Ajani, F, 2009. comparative assessment of sodium edta and heparin as anticoagulants for the evaluation of haematological parameters in cultured and feral african catfish (*Clarias gariepinus*). *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 13(1):19-24.
- Arnold, J.E., 2005. Hematology of the sandbar shark, *Carcharinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Vet. Clin. Path.* 34(2), 115-123.

- Barber, D.L., Westermann, J.E.M., White, M.G., 1981. The blood cells of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* Lönnberg: light and electron microscopic observations. *J. Fish. Biol.* 19, 11-28.
- Bielek, E., 1981. Development stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.* 220, 163-180.
- Bielek, E., Strauss, B., 1993. Ultrastructure of the granulocyte of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: morphogenesis and comparison to other leucocytes. *J. Morphol.* 218, 29-41.
- Blaxhall, P.C., 1972. The haematological assessment of the health of the freshwater fish. A review of selected literature. *J. Fish. Biol.* 4, 593-604.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Fish Biol.* 5, 771-781.
- Bodammer, J. E., 1986. Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from striped bass. *Vet. Immunol. Immunop.* 12, 127-140.
- Brown, L., 1993. Acuicultura para veterinarios. Abbott Laboratories, North Chicago, USA. 460 pp.
- Campbell, T.W., 2004. Hematology of lower vertebrates. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVPC) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP (Eds.). USA.
- Cannon, M.S., Mollenhauer, H.H., Eurell, T.E., Lewis, D.H., Cannon, A.M., Tompkins. C., 1980a. An ultrastructural study of the leucocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Morphol.* 164, 1-23.
- Cannon, M.S., Mollenhauer, H.H., Cannon, A.M., Eurell, T.E., Lewis, D.E., 1980b. Ultrastructural localization of peroxides activity in neutrophil leucocytes of *Ictalurus punctatus*. *Can. J. Zool.* 58, 1139-1143.
- Catton, W.T. 1951. Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood*, 6: 39-60.
- Cenini, P., 1984. The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Zool. Lond.* 204, 509-520.
- Conroy, D.A., 1972. Studies on the haematology of the Atlantic salmo (*Salmo salar*) L Symp. *Zool. Soc. London* 30, 101-127.
- Correa Negrete, J. C.; Garrido Correa, A.A.; Prieto Guevara, M.J.; Atencio García, V.J.; Pardo Carrasco, S.C., 2009. Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*. *Zootecnia Trop.*, 27(4): 393-405.
- Charpentier, A., 1999. La sangre. ED Acento, Madrid, España. 93 pp.
- Daems, W.Th., Wise, E., Brederoo, P., 1972. Electron microscopy of the vacuolar apparatus in lysosomes. *A Laboratory Handbook*, J.T. Dingle ed. Amsterdam: North-Holland Pubs. pp., 150-199.
- Davies, H.G. & Haynes, M.E. 1975. Light and electron microscope observations on certain leucocytes in a teleost fish and a comparison of the envelope-limited monolayers of chromatin structural units in different species. *J. Cell Sci.*, 17: 287-306.
- Denton, J.E., Yousef, M.K., 1975. Seasonal changes in haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51(A),151-153.
- Eisler, R., 1965. Erythrocyte count and haemoglobin concentration of blood of marine teleosts. *Chesapeake Sci.* 6, 116-120.
- Ellis, A.E., 1976. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.* 8, 147-153.
- Ellis, A. E., 1977. The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* 11, 453-491.
- Esteban, M.A., Muñoz, J., Meseguer, J., 2000. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *Anat. Rec.* 258(1), 80-89
- Ezzat, A.A., Shabana, M.B., Farghaly, A.M., 1973. Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais). I Blood cells. *J. Fish Biol.* 6, 1-12.

- Ferguson, H.W., 1976. The ultrastructure of the plaice (*Pleuronectes platessa*) leucocyte. J. Fish Biol. 8, 139-412.
- Fourtie, F.Jr., Hatting, J., 1976. A seasonal study of the haematology of carp (*Cyprinus carpio*) from a locality in the Transvaai. S. Afr. Zool. 11, 75-80.
- Gabriel, U.U., Ezeri, G.N.O., Opabunmi, O.O., 2004. Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). Afr. J. Biotech. 3, 463-467.
- Garavini, C., Martelli P., 1981. Alkaline phosphatase and peroxidase in goldfish (*Carassius auratus*) leucocytes. Basic Appl. Histochem. 25, 133-139.
- Gardner, G.R. & Yevich, P.P. 1969. Studies on the blood morphology of the three estuarine Cyprinodontiform fishes. J. Fish Res. Bd. Can., 26: 433-447.
- Geneser, F., 2000. Histología. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 813 pp.
- Golovina, N.A., 1996. Morphofunctional characteristics of the blood of fish as objects of aquiculture. Doctoral thesis. Moscow, pp.53.
- Golovina, N.A., Trombicky, I.D., 1989. Haematology of pond fish. Kishinev. Shtiinca, pp. 158.
- Groff, J.M., Zinkl, J.G., 1999. Hematology and clinical chemistry of Cyprinid fish. Common carp and goldfish. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 2(3), 741-746.
- Hardig, J., Høglung, L. B., 1984. Seasonal variation in blood components of reared Baltic Salmon, *Salmo salar*. J. Fish Biol. 24, 565-579.
- Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Ed. by Hibiya, T. Kodansha Ltd.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet. Clin. Path. 29 (1), 7-12.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J.L., 2001. Age related in haematology and chemistry values of hybrid striped bass chrysopt *Morone saxatilis*. Vet. Clin. Path. 30(1), 8-15.
- Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., Kudo, N., Sugimura, N., 1989. Morphology of the cell in carp (*Cyprinus carpio* L.). Jpn. J. Vet. Sci. 51, 1163-1172.
- Javid, M.Y., Akhtar, N., 1977. Haematology of fishes in Pakistan, II. Studies on fourteen species of teleosts. Biologia 23, 79-90.
- Kaplow, L.S., 1955. A histochemical procedure for localizing and valuating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood 10, 1023.
- Klontz, G.W. 1972. Haematological techniques and the immune response in rainbow trout. Sym. Zool. Soc. Lond., 30: 89-99.
- Köllner B, Fischer U, Rombout JHWM., 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. Dev Comp Immunol 28,1049-1062.
- Kori-Siakpere, O., Ake, J.E.G., Idoge, E., 2005. Haematological characteristics of the african snakehead, *Parachanna obscura*. Afr. J. Biotech. 4(6), 527-530.
- Luskova, V., 1997. Annual cycles and normal values of haematological parameters in fishes. Acta. Sc. Nat. Brno. 31(5), 70.
- Martoja, R., Martoja, M., 1970. Técnicas de Histología Animal. Toray-Masson S.A. Barcelona, pp. 350.
- Nakamoto, W., Silva, A.J., Machado, P.E.A., Padovani, C.R., 1991. Glóbulos brancos e *Cyrtia gomesi* (hemoparasita) em *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Pisces, Synbranchidae) da região de Birigui, SP. Rev. Bras. Biol. 51(4), 755-61.
- Nakamura, H., Shimosawa, A., 1984. Light and electron microscopic studies on the leucocytes of the medaka. Medaka 2, 15-22.
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poult. Sci. 31, 735-738.
- Nelson, J S, 2006. Fishes of the World. Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc. P 602.
- Nikinmaa, M., 1990. Vertebrate red blood cells. In *Zoophysiology*, vol. 28, 262pp. Heidelberg: Springer-Verlag.

- Örün, I., Erdemli, A.U., 2002. A study on blood parameters of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). J. Biol. Sci. 2(8), 508-511.
- Page, M., Rowley, A.F., 1983. A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L. Gray). J. Fish Biol. 22, 503-517.
- Passantino L, Cianciotta A, Patruno R., 2005. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. Immunopharmacol Immunotoxicol 7,345-356.
- Pearse, A.G.E., 1980. Histochemistry Theoretical and Applied. Vol I and II. Churchill Livingstone Ed. London and New York, pp. 1055.
- Pica, A., Grimaldi, M.C., Della Corte, F., 1983. The circulating blood cells of torpedoes (*Torpedo marmorata* Russo and *Torpedo ocellata* Rafinesque). Monit. Zool. 17, 353-374.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., 1995. Células sanguíneas e contagem diferencial dos leucócitos de tainha, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia, SP (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W). Bol. Inst. Pesca 22(1), 23-40.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Tabata, Y.A., Eiras, A.C., 1998. Hematologia comparada entre diplóides e triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). Rev. Bras. Zool. 5(4), 1093-1102.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Rodríguez, E. L., Veiga, M.L., Eiras, A.C., Campos, B.E.S., 2003. Differential leucocyte counts in "dourado", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. Braz.J. Biol. 63(3), 517-525.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Aguiar Santos, A., de Carla Dias, D., Seriani, R. And Egami, M.I., 2008. Hematological and phagocytic response of the fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. Bioikos, Campinas, 22(1): 29-35.
- Rey Vázquez,G. y Guerrero, G. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)
- Ribeiro, W.R., 1978. Contribuição ao estudo da haematologia de peixes. Morfología e histoquímica das células do sangue e dos tecidos haematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacepede, 1803. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de Sao Paulo, Ribeirão Preto. 119 f.
- Rodrigues Bittencourt, N. L., Molinari, L. M., Scoaris, D. O., Bocchi Pedroso, R., Vatura Nakamura, C., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.A.A., Dias Filho, B. P., 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. Acta Scientiarum Biological Sciences (Maringá) 25 (2), 385-389.
- Rombout J, Huttenhuis HBT, Picchietti S., 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. Fish Shellfish Immunol 19,441-455.
- Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A. (eds.). 1988. Vertebrate blood cells. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rowley, A.F., Hunt, T.C., Page, M., Mainwaring, G., 1988. Fish. In: Vertebrate blood cells. Rowley AF, Ratcliffe NA. (eds.) .Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 19-127.
- Silveira, R., Rigos, C., 1989. Características hematológicas normais de *Oreochromis aureus* em cultivo. Rev. Latinoam. Acuic. Lima 39, 54-56.
- Srivastava, A.K., 1968. Studies on the haematology of certain freshwater teleosts. Anat. Anz. v 123, S, 520-533.
- Tavares Dias, M. and Ruas de Moraes, F., 2006. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. Hidrobiológica. 16(3): 271-274.
- Ueda, I.K., Egami, M.I., Sasso, W.S., Matushima, E.R., 1997. Estudos hematológicos em *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei)-Part I. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 34 (5), 270-275.
- Ueda, I.K., Egami, M.I., Sasso, W.S., Matushima, E.R., 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758)(Cichlidae, Teleostei)-Part II. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38(6), 273-277.

- Valenzuela, A., Oyarzún, C., Silba, V., 2003. Blood cells of the *Schroederichtys chlensis* (Guichenot, 1848): The leukocytes (Elasmobranchii, Scyliorhinidae). *Gayana* 67(1): 130-137.
- Van Vuren JHJ, Hattingh J. 1978. A seasonal study of haematology of wild freshwater fish. *J. Fish Biol.* 13, 305-313.
- Veiga, M.L., 1999. Aspectos morfológicos das células sanguíneas, citoquímicos e ultraestruturais de trombocitos, neutrófilos e eosinófilos de Dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840)(Pisces, Characidae). Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 95f..
- Vosylienė, M.Z., 1999. The effect of heavy metals on haematological indices of fish. *Acta Zool. Litvanica Hydrobiol.* 9(2), 76-82.
- Watson, M.E.; Guenther, R.W. & Royce, R.D. 1956. Hematology of healthy and virus-diseased sockeye salmon, *Onchorhynchus nerka*. *Zoologica* (NY), 41: 27-37.
- Watson, L.J., Shechmeister, I.L., Jackson, L.L., 1963. The haematology of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cytologia* 28, 118-130.
- Wedemeyer, G.A., Gould, R.W., Yasutake, W.T., 1983. Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. *J. Fish Biol.* 23, 711-716.
- Weinreb, E.L., 1963. Studies on the fine structure of teleost blood cells. I. Peripheral blood. *Anat. Rec.* 147: 219- 38.
- Wilhem, D.F., Eble, G.J., Kassner, F.X., Dafré, A.L., Ohira, M., 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 102, 311-321.
- Williams, R.W. and Warner, M.C., 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.* 9: 491-497.
- Zapata, A., Carrato, A., 1980. Ultrastructure of elasmobranch and teleost thrombocytes. *Acta Zool. (Stockholm)* 61, 179-182.
- Zhiteneva, L., Poltavceva, T.G., Rudnickaja, O.A., 1989. Atlas of normal and pathological cells in the blood of fish. Rostov-on-Don, pp. 112.

Capítulo II Sección B

- Barni, S., Fraschini, A., Prospero, E., Vaccarone, V. and Bernini, F. 1995. Possible occurrence of amitotic cell division during haemopoiesis in the Urodeles. *Comparative Haematology International* 45, 183-188.
- Bhagwan, S.T. and Bhikajee, M. 2000. Induction of hypochromic macrocytic anaemia in *Oreochromis* hybrid (Cichlidae) exposed to 100mg/l (sublethal dose) of aluminium. *Science and Technology - Research Journal.* 5: 9-20.
- Buckley, J. A., Whitmore, C. M. and Matsuda, R. I. 1976. Changes in blood chemistry and blood cell morphology in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following exposure to sublethal levels of total residual chlorine in municipal wastewater. *J. Fish. Res. BdCan.* 33,776-782.
- Caldwell, C.A. and Hinshaw, J. 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture* 126, 183-193.
- Casillas, E. and Smith, L. S. 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* 10, 481-491.
- Clauss, T.M., Dove, A.D. and Arnold, J.E.. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 11(3), 445-62.
- Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, M.A. 2011. Immunotoxicological Effects of Environmental Contaminants in Teleost Fish Reared for Aquaculture. In: *Pesticides in the modern world - risks and benefits.* Ch 13. Edited by Margarita Stoytcheva. 3^a Ed. P. 571.
- Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Piol, M.N., Verrengia Guerrero, N., Maggese, M.C. and Lo Nostro F.L. 2011. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfán in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicol. Environ.*, 74: 1065-1073.
- Dorafshan, S., Kalbassi, M., Pourkazemi, M., Amiri, B. and Karimi, S. 2008. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 195-200.

- Girón-Pérez, M.I., Barcelós-García, R.; Vidal-Chavez Z. G; Romero-Bañuelos, C. A. and Robledo-Marengo, M. L. 2006. Chlorpyrifos on the Hematology and Phagocytic Activity of Nile Tilapia Cells (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16 (9) 495 – 499.
- Girón-Pérez, M.I., Montes-López, M., Gracia-Ramírez, L.A., Romero-Bañuelos, C.A., Robledo-Marengo, M.L., 2008. Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on phagocytic and hematological parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 266–269.
- Han, Y., Wang, K., Zhang, L. and Liu, M. 2007. Comparison on erythrocyte and some haematology indices of diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Freshwater Fisheries* 37, 52–55.
- Hoyle, I., Shaw B. J. and Handy, R. D. 2007. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 83 (1), 62-72.
- Houston, A. H., Roberts, W. C. and Kennington J. A. 1996. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 481-489.
- Kori-Siakpere, O.; Ogbé, M.G. and Ikomi R.B. 2009. Haematological response of the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of potassium permanganate. *Scientific Research and Essay*. 4(5), 457-466.
- Martins, M.L., M. Tavares-Dias, R.Y. Fujimoto, E.M. Onaka and D.T. Nomura, 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Brasileiro Med. Vet. Zootecnia*, 56: 640–646.
- McLeay, D. J. 1973. Effect of a 12-hr and 25-day exposure to Kraft pulpmill effluent on the blood and tissue of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd Can.* 30, 395-400.
- Modesto, K. A. y Martínez C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787.
- Murad A., Everill, S. and Houston, A. 1993. Division of goldfish erythrocytes in circulation. *Can. J. Zool.* 71, 2190- 2198.
- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Preez, H.H., 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, 369–380.
- Pan, Y. 1956. Study on histology of frog blood. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 1, 89–101.
- Petri D, Glover CN, Ylving S, Kolås K, Fremmersvik G, Waagbø R. and Berntssen MH. 2006. Sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan as assessed by haematology, blood biochemistry, and growth parameters *Aquat Toxicol.* 1;80(3):207-16.
- Rehulka, J., Minarik, B. & Rehulková, E. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquaculture Research* 35, 529-546.
- Ruis, M. A. and Bayne, C. J. 1997. Effects of acute stress on blood clotting and yeast killing by phagocytes of rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126, 190- 195.
- Sabri, D.M., M.A.E-H. El-Danasoury, I.A.E-M. Eissa and H.M. Khouraiiba, 2009. Impact of henneguyosis infestation on hematological parameters of catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 228–230.
- Srivastav, A. K. and Mishra, S. 1979. Blood dyscrasia in a teleost, *Colisa fasciatus* after acute exposure to sublethal concentrations of lead. *J. Fish Biol.* 14, 199-203.
- Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. 2006. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica* 16, 271-274.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Sudova, E., 2009. Effects of acute exposure to metribuzin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 492–495.

- Vosyliienė M.Z. 1996a. The effect of long-term exposure to copper on physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Studies of haematological parameters. *Ekologija* 1, 3-6.
- Vosyliienė M.Z. 1996b. Hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during short-term exposure to copper. *Ekologija* 3, 12-28.
- Vosyliienė, M Z and Kazlauskienė, N. 1999. Alterations in fish health state parameters after exposure to different stressors. *Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia*. 9, 2: 83-94.
- Wang, B., Liu, Y., Chen, X. and Fan, Z. 2010. Amitosis-like nuclear division in erythrocytes of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology* 76: 1205-1211.
- Witeska, M., 2005. Stress in fish – Hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology* 1, 35-41.
- Whitmore, C.M. 1965. A microcytic anemia of juvenile chinook salmon resulting from diets deficient in vitamin E. fish commission of Oregon Portland, Oregon. Contribution No. 29: 1-31.
- Yokote, M. 1982. In: *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features*. Ch. VI.: Vascular System. Ed. by Hibiya, T. Kodansha Ltd.
- Zou, S., Li, S., Cai, W. and Yang, H. 2006. Morphological differences of erythrocyte in autotetraploid, interploid 3n of bluntnout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Journal of Fishery Sciences of China* 13, 891–896.