



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

**Efecto de los disruptores endocrinos en la
reproducción de los peces: medición del
diámetro de los ovocitos vitelogénicos**

Alumna: DEBA REMENTERIA, SHUYANA

Fecha: Septiembre 2015

Director/a

Serrano Moreno, María Teresa

Co-Director/a

Bizarro Villán, Cristina

Curso Académico

2014-2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OVOGÉNESIS	1
1.1.1 Células germinales y la formación de oogonias.....	2
1.1.2 Ovocito primario	2
1.2 SISTEMA ENDOCRINO	3
1.2.1 Vitelogénesis	3
1.3 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs)	4
1.3.1 Medición de efectos de disrupción endocrina	5
1.4 LA ESPECIE <i>CHELON LABROSUS</i>	6
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	7
4.2 HISTOLOGÍA	8
4.2.1 Productos químicos y equipo	8
4.2.2 Estudio histológico de las gónadas	8
4.3 MEDICIÓN DE OVOCITOS	11
4.3.1 Programa ImageJ.....	11
5. RESULTADOS	12
5.1 IDENTIFICACIÓN DE FASES	12
5.2 MEDICIÓN DE DIÁMETRO DE OVOCITOS	13
6. DISCUSIÓN	16
7. CONCLUSIÓN	18
8. BIBLIOGRAFÍA	19

1. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del crecimiento industrial, la agricultura, la urbanización y el turismo, las actividades humanas son inevitables fuentes de contaminación química del medioambiente y de los ecosistemas acuáticos (Douxflis et al., 2007). Los peces son una de las especies más afectadas por estos productos químicos, porque una gran variedad de contaminantes ambientales terminan en el medio acuático (Sun et al., 2014). Los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) pueden interferir en los procesos controlados hormonalmente (WHO/UNEP, 2012) afectando a la reproducción. Debido a la similitud evolutiva de todos los vertebrados, los estudios sobre peces pueden servir de base para la extrapolación a otras especies acerca de los efectos nocivos de los EDCs (Ankley et al., 2009; Sun et al., 2014).

Existen más de 20.000 especies de teleósteos que habitan tanto en medios marinos, como en agua dulce (Tyler y Sumpter, 1996; Breton y Berlinsk, 2013) y son utilizados como organismos diana en diferentes estudios de contaminación de aguas.

1.1 OVOGÉNESIS

Debido a su importancia comercial en la acuicultura y pesca, la investigación de la ovogénesis en teleósteos recibe una atención considerable (Breton y Berlinsk, 2013). Aunque existen algunas especies de teleósteos vivíparas, la mayoría son ovíparas y entre estos, existe una gran diversidad en la determinación del sexo: hay especies que tienen un sexo determinado, son gonocóricas; algunas especies muestran un cambio de sexo durante su vida y otras en cambio, son hermafroditas, y tienen testículos y ovarios simultáneamente (Devlin y Nagahama, 2002; Yaron y Levavi-Sivan, 2006; Lubzens et al., 2009).

Además, entre los teleósteos existe una gran variabilidad tanto en la estacionalidad de la proliferación de las oogonias y en la época en que se transforman en oocitos, como en la distribución de las mismas en el ovario. Esto, da lugar a que se reconozcan tres tipos de desarrollo ovárico (Wallace y Selman, 1981; Lubzens et al., 2009): (1) síncrono, todos los oocitos se desarrollan al mismo tiempo; (2) sincronía

de grupo, se pueden distinguir dos poblaciones de oocitos que no se desarrollan al mismo tiempo; (3) asincronía, en este tipo de desarrollo ovárico, están presentes al mismo tiempo todos los estadios de desarrollo de los oocitos.

Por lo tanto, se puede decir que las especies ovíparas, muestran una estrategia diferente en la formación del huevo y el desove pero, tienen características comunes en la formación del óvulo maduro (Lubzens et al., 2009). Así mismo, el desove dependerá del ritmo de ovulación de cada especie, teniendo en cuenta el tipo de desarrollo ovárico. La ovogénesis en los vertebrados es un proceso dinámico altamente conservado, durante el cual las oogonias diploides se convierten en óvulos fertilizables (Patiño y Sullivan, 2002; Breton y Berlinsk, 2013).

A través de microscopía óptica y electrónica se revelan los cambios estructurales que se producen a partir de las oogonias hasta la estructura del óvulo maduro (Wallace y Selman, 1981; Selman et al., 1993; Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2009).

1.1.1 Células germinales y la formación de oogonias

Las gónadas están constituidas por dos tipos de células, las germinales y las somáticas. Las células germinales transmiten la información genética de una generación a otra y migran a la gónada, donde se asocian con las células somáticas y se diferencian en gametos (Lubzens et al., 2009), células sexuales haploides: espermatozoides y óvulos.

La transformación de las células germinales en oogonias implica cambios estructurales; las oogonias son rodeadas de una capa denominada pre-granulosa que implica un aumento de tamaño (Patiño y Sullivan, 2002). Cada oogonia multiplicada por divisiones mitóticas forma nidos de oogonias en asociación con las células pre-granulosa y posteriormente se transforman en ovocitos primarios, con el inicio de la primera división meiótica (Patiño y Sullivan, 2002).

1.1.2 Ovocito primario

Cada oogonia se presenta rodeada de una monocapa de células de granulosa y otra capa externa de células tecales, que se separa de la anterior por una membrana basal.

Tras la transformación inicial, se da el crecimiento masivo de los ovocitos durante la vitelogénesis. En esta etapa, el ovocito acumula reservas nutricionales necesarias para el desarrollo del embrión. Durante este tiempo, el ovocito permanece detenido en la etapa diploteno de profase I de la meiosis (Lubzens et al., 2009).

1.2 SISTEMA ENDOCRINO

A partir del ovocito primario, el eje hipotálamo-hipófisis desempeña un papel clave en la regulación de la actividad gonadal (Lubzens et al., 2009). Las gonadotropinas hipofisarias (GtHs) y las hormonas esteroides ováricas regulan el crecimiento y la maduración de ovocitos en los teleósteos (Nagahama, 2000; Arukwe y Goksøyr, 2003). Los cambios ambientales, como la temperatura del agua y del fotoperiodo proporcionan al sistema nervioso central las señales que activan los procesos de maduración (Arukwe y Goksøyr, 2003). En respuesta a los factores externos, el hipotálamo segrega la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que mediante una cascada de hormonas estimula la liberación de GtHs de la hipófisis (Arukwe and Goksøyr, 2003).

El control de la reproducción que realiza esta glándula es a través de dos hormonas gonadotróficas: la hormona folículo estimulante (FSH), que regula la vitelogénesis en hembras y la espermatogénesis en los machos, y la hormona luteinizante (LH), encargada de controlar la maduración final del ovocito en las hembras (Nagahama, 2000; Swanson, 1991; Arukwe y Goksøyr, 2003). La secreción de GtH está regulada por un proceso de retroalimentación por estradiol-17 β y testosterona (Arukwe y Goksøyr, 2003).

1.2.1 Vitelogénesis

El término vitelogénesis describe en general, la incorporación de proteínas vitelogenina en el ovocito (Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2009). Al final de este proceso, el ovocito es competente para someterse a la fertilización, y contiene ARN mensajeros maternos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y hormonas que son importantes para el correcto desarrollo del embrión. El crecimiento masivo del folículo ovárico se produce durante la absorción de lípidos

(Wallace y Selman, 1981, 1990; Brooks et al., 1997; Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2009).

Las vitelogeninas pertenecen a la familia de proteínas de transferencia de lípidos (Babin et al., 1999; Lubzens et al., 2009). Son glicoproteínas de fosfolípidos que se encuentran en la sangre de hembras de todas las especies de vertebrados ovíparos durante la vitelogénesis. El incremento de estradiol-17 β en el plasma estimula la producción de vitelogenina en el hígado, que es reconocida por receptores de membrana e incorporada por el ovocito a través de micropinocitosis (invaginación de la membrana plasmática que rodea las moléculas que se quieren introducir en la célula, posteriormente resultando en pequeñas vesículas dentro del citoplasma). Este proceso está regulado por la FSH (Lubzens et al., 2009).

Numerosos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que al finalizar el proceso de vitelogénesis y empezar la reanudación de la meiosis se da un aumento de los niveles de LH en plasma y aumenta la expresión del receptor de LH, produciendo un aumento significativo de los niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración, que actúa a nivel de la membrana del ovocito induciendo su maduración final (Nagahama y Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2009). Y es así como termina la ovogénesis.

1.3 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs)

Vivimos en un mundo en el que los productos químicos artificiales son parte de la vida cotidiana. Algunos de estos contaminantes químicos, pueden afectar al sistema endocrino y por lo tanto, pueden interferir en los procesos controlados hormonalmente de los seres humanos y los animales salvajes (WHO/UNEP, 2012).

Hay dos tipos de compuestos capaces de producir alteraciones en el sistema endocrino: sustancias naturales y artificiales. Las hormonas naturales se pueden encontrar en todos los animales vivos. Los machos producen en sus testículos andrógenos, siendo la testosterona y 11-ketotestosterona las más potentes en los peces. Los andrógenos están involucrados en la diferenciación sexual, el comportamiento reproductivo y en la producción de espermatozoides (Schulz et al., 2010). Por otro lado, las hembras segregan en el ovario estrógenos como el estradiol-

17 β y progesterona. Los estrógenos participan en la diferenciación sexual, crecimiento de los ovocitos y el control del comportamiento reproductivo en las hembras (Lubzens et al., 2009).

Dentro del segundo grupo se encuentran las sustancias artificiales, que agrupan una amplia variedad de compuestos químicos que no muestran similitudes estructurales: hormonas sintéticas tales como dietilestilbestrol y 17 α -etinilestradiol, agentes limpiadores industriales, tales como alquilfenoles, pesticidas y compuestos farmacéuticos entre otros (Tyler et al., 1998; López de Alda y Barceló, 2001; Porte et al., 2006). Algunos de estos compuestos químicos (EDCs) son capaces de imitar o antagonizar la acción de estrógenos, por ejemplo los xenoestrógenos (Marlatt et al., 2014).

La acumulación de estos xenoestrógenos en el medio acuático a través de las aguas residuales urbanas o industriales, puede tener importantes efectos biológicos sobre las especies acuáticas (Marlatt et al., 2014). Los xenoestrógenos, tanto en el campo como en el laboratorio, provocan la inducción de la proteína femenina vitelogenina en los machos y en organismos inmaduros (Folmar et al., 1996; Tyler y Routledge, 1998; Kime et al., 1999; Arukwe y Goksøyr, 2003; Puy-Azurmendi et al., 2010), el desarrollo anormal de las gónadas (Jobling et al., 1996, 1998; Gimeno et al., 1996), retraso en la maduración sexual (Folmar et al., 1996), alteración del ciclo ovárico, menor tasa de eclosión de los huevos, aparición de individuos intersexuales, inducción de cambios de sexo y bloqueo total de la reproducción (Piferrer, 2001).

Actualmente, se realiza un esfuerzo coordinado a nivel mundial para evaluar y mitigar los riesgos que los EDCs suponen para los seres humanos y la vida salvaje (WHO / UNEP, 2012).

1.3.1 Medición de efectos de disrupción endocrina

Para cuantificar el efecto de disrupción endocrina en peces, se han realizado numerosos estudios, en los que se han utilizado técnicas de biología molecular, bioquímica o histología. Teniendo en cuenta las características de la especie que se

quiere estudiar y el objetivo del estudio, se llevará a cabo un método u otro (Murua et al., 2003).

El biomarcador de disrupción endocrina más utilizado es la medición de los niveles de vitelogenina, tanto a nivel de proteína como de gen (Goksoyr y Arukwe 2003). La aparición de machos feminizados es cada vez más común y entre las diversas investigaciones publicadas, en una investigación de Kidd et al., 2007, se observaron tanto la feminización de los machos como la inducción de vitelogénesis en las hembras fuera del periodo de reproducción, también mostraban una alteración en la oogenesis y en última instancia, una casi extinción de la especie *Pimephales promelas*, en el lago en el que se realizó el estudio, al noroeste de Ontario, Canadá.

Investigaciones muestran evidentes alteraciones en las hembras de rutilos en el río Sena (Francia), uno de los ríos más contaminados de Europa (Gerbron et al., 2014). Se realizaron diferentes tipos de medidas en tres zonas de muestreo con 26km de distancia entre ellas. Así, se hicieron estudios histológicos de las gónadas, se midió el diámetro de los ovocitos, y se realizó un análisis vitelogénico y la medición de la actividad de la aromatasa. En los resultados, además de observar menores niveles de vitelogenina en las zonas contaminadas, se cuantificó un porcentaje más alto de ovocitos en fase uno, actividad aromatasa más baja, así como un claramente menor diámetro de los ovocitos.

La medición del diámetro de los ovocitos puede ser por lo tanto, una herramienta muy útil para este tipo de estudios (Murua et al., 2003).

1.4 LA ESPECIE *CHELON LABROSUS*

La especie utilizada en este estudio, *Chelon Labrosus*, pertenece a la familia de los mugílidos; se considera gonocórica pero, capaz de exhibir características hermafroditas en gónadas maduras diferenciadas (McDonough et al., 2005). La diferenciación del sexo comienza a los 12 meses de edad y la mayoría de los peces inmaduros se diferencian sexualmente de los 15 a los 17 meses (McDonough et al., 2005). La especie *Chelon labrous* muestra un ciclo reproductivo anual que comienza en verano. El desove es en invierno, seguido de un periodo de descanso en los meses

de primavera y verano. Se consideran peces de desove isócronos; el desarrollo de los gametos es síncrono y los peces desovan todo su material reproductivo de una vez durante un período muy corto de tiempo (días en lugar de semanas) (Greeley et al., 1987; Render et al., 1995; McDonough et al., 2005).

2. HIPÓTESIS

Los compuestos disruptores endocrinos afectan a la reproducción de los peces, interfieren en la cascada de hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, teniendo repercusión finalmente en el diámetro del ovocito vitelogénico.

3. OBJETIVOS

Con el fin de probar la hipótesis propuesta, se establecen los siguientes objetivos:

- 1- Identificación de las fases gametogénicas de secciones histológicas de *Chelon labrosus* adaptando un sistema de clasificación existente para otras especies de mugílidos.
- 2- Medición del diámetro de los ovocitos en diferentes fases gametogénicas para caracterizar su tamaño en cada caso y detectar la repercusión en el mismo de los compuestos disruptores endocrinos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

En este proyecto se han abordado tres áreas de estudio. El área principal de muestreo fue el puerto de Pasaia, ubicado en el extremo más oriental de la cornisa cantábrica (43° 19'35" N, 1° 55'9" W), en la provincia de Gipuzkoa, al norte de la Península Ibérica. Su área de influencia abarca una de las zonas más industrializadas del Estado.

Por otro lado, se realizaron muestreos de dos efluentes de depuradoras de aguas residuales urbanas: (1) la reserva de la Biosfera de Urdabai, que se encuentra en el

Golfo de Bizkaia, al norte de la Península Ibérica y a los alrededores de la ciudad principal de la zona, Gernika-Lumo, donde se encuentran varias industrias como la metalúrgica; (2) la cuenca del río Galindo, formada por dos ramas principales que confluyen entre Sestao y Barakaldo, poco antes de desembocar en el estuario del Nervión, que soporta una intensa actividad urbana e industrial, localizadas fundamentalmente en torno al Ballonti y la desembocadura.

4.2 HISTOLOGÍA

4.2.1 Productos químicos y equipo

- ✓ 10% solución de formalina tamponada neutra (NBF) (1L)
- ✓ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.56 g
- ✓ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 28.92 mg
- ✓ Formaldehído 100 mL
- ✓ dH_2O hasta 1000 mL
- ✓ Glutaraldehído
- ✓ Etanol (Panreac 131086)
- ✓ Leica® RM2255 Automatic Microtome (Leica microsystem, Nussloch, Germany)
- ✓ Cuchillas desechables de perfil bajo 819 (Leica microsystem, Nussloch, Germany)
- ✓ Resina (Technovit 7100, Heraeus Kulzer GmbH y Co. KG, Wehrheim, Germany)
- ✓ SuperFrostPlus (Menzel Gläser)
- ✓ Microscopio óptico con cámara acoplada (Olympus BX50 + Nikon DS-Fi2)

4.2.2 Estudio histológico de las gónadas

Las muestras se fijaron en 10% NBF + 1% de glutaraldehído durante 24 horas, después se deshidrataron mediante incubaciones sucesivas en gradaciones crecientes de etanol. Posteriormente, se procede a la inclusión de la muestra en resina de metacrilato (Technovit 7100; Heraeus Kulzer GmbH y Co. KG, Wehrheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, mediante un micrótopo, sistema totalmente automatizado, se obtuvieron secciones de 5 micras de espesor. Estas muestras de tejidos, fueron teñidas con hematoxilina/eosina (Gamble y Wilson, 2002) y se montaron en portaobjetos de microscopio Superfrost. Los portaobjetos se examinan bajo un microscopio motorizado.

En cuanto a las gónadas reproductivas, se distinguieron cinco etapas, adaptando los criterios utilizados por McDonough et al. (2005) para *Mugil cephalus*: 1 = inmaduro; 2 = en desarrollo; 3 = madura; 4 = desove o atrésico; y 5 = inactivo o en reposo. Las gónadas, que no pudieron ser diferenciadas, fueron identificadas como indiferenciadas.

Los criterios histológicos usados para determinar las etapas reproductivas una vez que se ha dado la diferenciación sexual se explican en la **Tabla 1**. Se incluyen imágenes de las cinco etapas tomadas con un microscopio óptico **Figura 1**.

Tabla 1. Tabla que recoge las cinco etapas, adaptando los criterios utilizados por McDonough et al. (2005).

Etapas reproductivas	Características de las hembras
1. Inmaduro	Ovario inactivo con oocitos previtelogénicos y sin evidencia de atresia. Los ovocitos tienen un diámetro de <80µm; falta de músculo; el tejido conjuntivo no es tan alargado como en un ovario maduro; la pared del ovario es muy delgada.
2. En desarrollo	Ovario en desarrollo; alveolos corticales mas grandes; la vitelogénesis ha empezado; la parte perinuclear sigue vacía; los ovocitos tienen un diámetro mayor.
3. Maduro	Los oocitos están completos de vtg; la hidratación es completa en la mayoría de los oocitos.
4. Desove o atrésico	Más del 30% de los oocitos sometidos al proceso de atresia. Los glóbulos de vtg se rompen y la pared del oocito se ve amorfa.
5. Inactivo o en reposo	Parecidos a las hembras inmaduras; pero los oocitos tienen algo de músculo y tejido conectivo; la pared del ovario es más gruesa. Se ven algo amorfos.

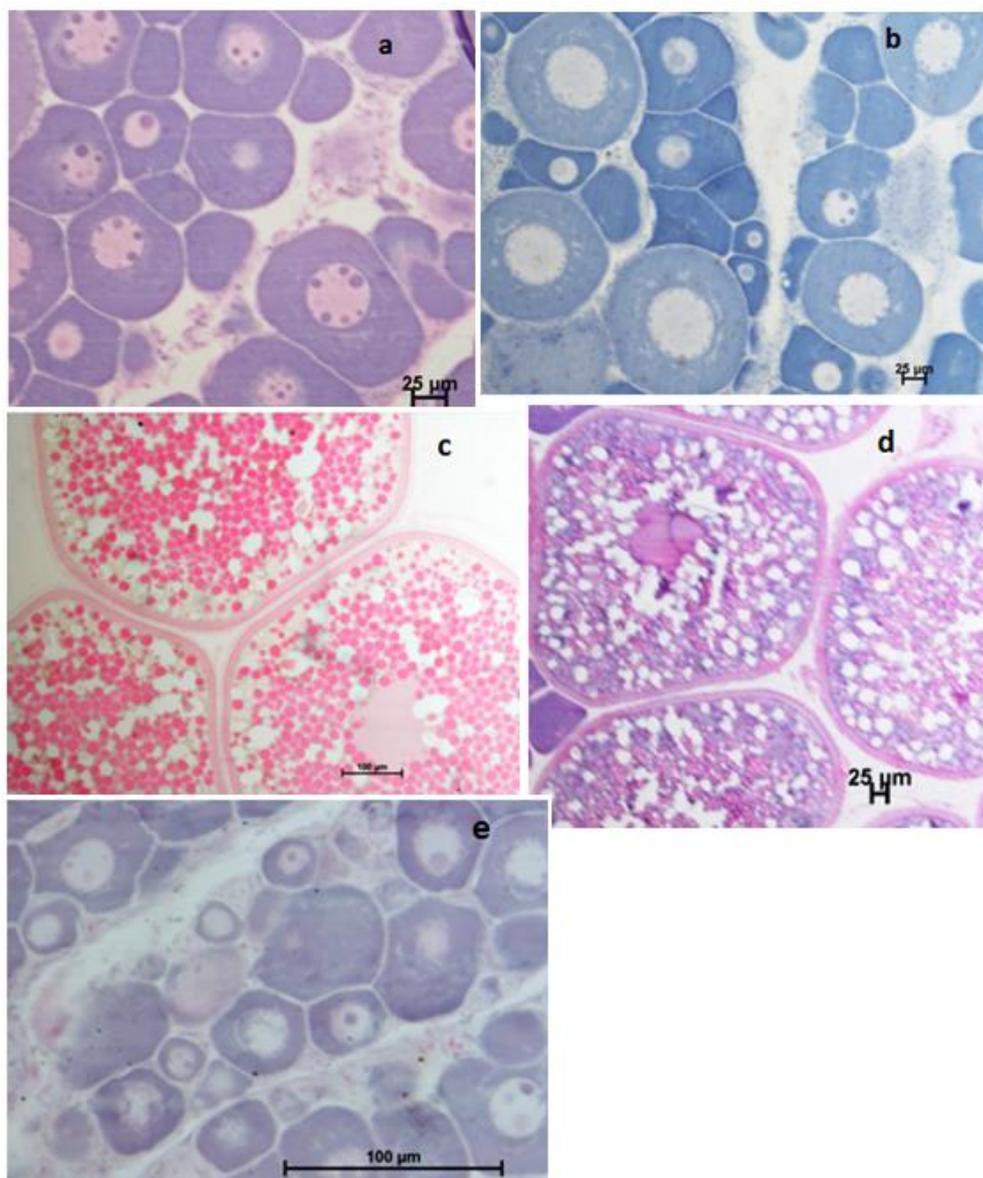


Figura 1: Imágenes de microscopía óptica de gónadas femeninas, cuya tinción se realizó con hematoxilina/eosina. (a) Gónada inmadura (Fase 1). Ovario inactivo con oocitos pre-vitelogénicos. (b) Gónada en desarrollo (Fase 2). Oocitos pre-vitelogénicos, se observa un diámetro mayor. (c) Gónada madura (Fase 3). Los oocitos están completos de lípidos y son más grandes. (d) Gónadas atrésicas o en desove (Fase 4). Los glóbulos de lípidos se han roto. (e) Gónada inactiva. Se observan oocitos atrésicos y también se pueden observar oocitos pro-vitelogénicos. Escala en cada imagen: (a) 25 μ m; (b) 25 μ m; (c) 100 μ m; (d) 25 μ m; (e) 100 μ m.

4.3 MEDICIÓN DE OVOCITOS

Una vez clasificadas las muestras obtenidas en las diferentes etapas explicadas anteriormente, se medirá el diámetro de 30 ovocitos de cada fase en todos los meses del ciclo reproductivo de *Chelon labrosus* utilizando el programa ImageJ.

4.3.1 Programa ImageJ

ImageJ es un software de dominio público, de gran versatilidad para el procesado de imágenes. Una vez instalado el programa en el ordenador, la barra de trabajo de ImageJ se compone de varios menús (*File, Edit, Image*, etc.), algunos botones de herramientas (selección de área rectangular, oval, etc.), y además muestra información (dependiendo de la herramienta seleccionada) en forma de texto en la parte inferior.

Para abrir una imagen en ImageJ, desde el menú *File* → *Open* y en el cuadro de diálogo elegimos la imagen que deseamos abrir. En este trabajo utilizaremos el programa para medir el diámetro de los ovocitos, a partir de las imágenes tomadas de las muestras recogidas. Para ello, será esencial que, las imágenes tomadas con el microscopio óptico tengan la escala determinada en la misma imagen.

Antes de empezar a medir el diámetro, se establecerá la escala para definir la medida de un pixel: *Analyze* → *Set Scale*. En la casilla de “*known distance*” se escriben los micrómetros a los que corresponde la línea que hemos hecho anteriormente y que hemos tomado como referencia. La medida dependerá de la escala de la imagen.

Una vez que se ha establecido la escala, podemos proceder a medir los diámetros de los ovocitos. Para ello, se volverá a seleccionar la herramienta de línea recta y se hará una línea sobre el ovocito, simulando el diámetro. Por último, para recoger los datos en un tabla: *Analyze* → *Measure*.

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE FASES

Se determinaron las fases de las muestras recogidas a lo largo de un ciclo reproductivo de *Chelon labrosus* en el puerto de Pasaia (**Tabla 2**), basándose en la adaptación para mugílidos de McDonough et al., 2005. No se encontró ninguna hembra en fase tres, con ovocitos maduros, y cuatro, en el momento de la freza.

A su vez, se ha subdividido la fase 2, para así clasificar diferentes tipos de ovocitos a lo largo de su desarrollo durante la vitelogénesis. Caracterizando así tres subfases con ovocitos menos y más desarrollados: 2a (con ovocitos vitelogénicos mayoritariamente), 2b (con ovocitos en la fase de alveolos corticales), 2c (con ovocitos vitelogénicos).

Tabla 2: Identificación de las fases gametogénicas de secciones histológicas de *Chelon labrosus*. Número de muestras analizadas (n) y porcentaje de ovocitos observados de cada fase en cada mes en el puerto de Pasaia.

Mes	n	Porcentaje de fases encontradas en cada mes (%)						
		1	2a	2b	2c	3	4	5
sep-10	7	87.5	12.5	-	-	-	-	-
oct-10	14	14.3	78.6	7.1	-	-	-	-
dic-10	6	-	16.7	-	83.3	-	-	-
ene-11	7	14.3	14.3	-	71.4	-	-	-
feb-11	10	50.0	10.0	10.0	-	-	-	30.0
mar-11	9	66.7	11.1	-	-	-	-	22.2
abr-11	14	71.4	7.1	-	-	-	-	21.5
may-11	6	16.7	33.3	-	-	-	-	50.0
jun-11	7	28.6	14.3	-	-	-	-	57.1
jul-11	6	100	-	-	-	-	-	-
ago-11	9	88.9	-	-	-	-	-	11.1
sep-11	8	62.5	37.5	-	-	-	-	-

En el presente proyecto se han realizado muestreos de tres áreas diferentes con el fin de comparar los resultados de los ovocitos vitelogénicos. Con el mismo criterio, se

identificaron las muestras recogidas en Galindo y Gernika. No obstante, entre las muestras obtenidas, no se encontraron ovocitos desarrollados, por lo que se decidió discutir los datos recogidos en el mes de febrero en los tres puntos, independientemente de la fase en la que se encontraron los ovocitos. En la **Tabla 3** se recogen el número de muestras analizadas y el porcentaje de ovocitos cada fase en el mes de febrero, de las tres áreas de estudio.

Tabla 3: Identificación de las fases gametogénicas de secciones histológicas de *Chelon labrosus*. Número de muestras analizadas (n) y el porcentaje de ovocitos observados de cada fase en el mes de febrero en Pasaia, Galindo y Gernika.

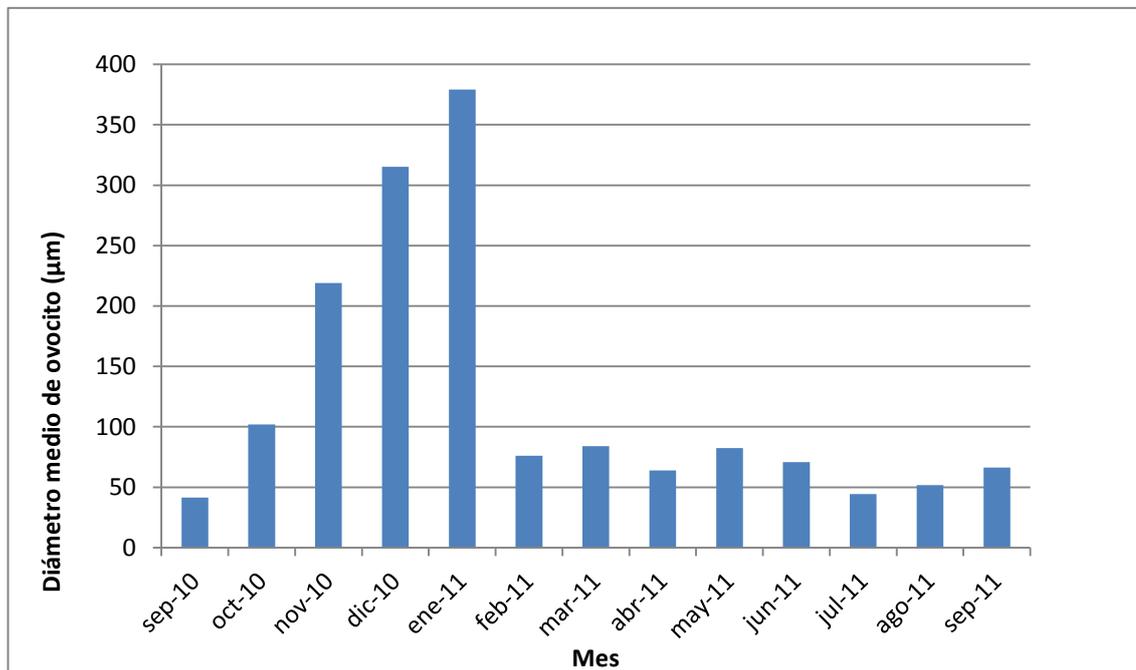
Sitio	n	Porcentaje de fases (%)			
		1	2a	2b	5
Pasaia (2011)	10	50	10	10	30
Galindo (2014)	8	75	-	-	25
Gernika (2014)	2	-	100	-	-

El número de muestras en Pasaia y Galindo es parecido mientras que en Gernika solo se pudieron coger dos hembras. En cuanto a las fases determinadas en cada sitio, en Galindo el 75% de las muestras analizadas eran inmaduras y el resto atrésicas; en Gernika estaban al principio de la fase de desarrollo (2a), mientras que en el puerto de Pasaia, se caracterizó que un 50% de las muestras eran inmaduras, un 30% atrésicas y el resto habían comenzado a desarrollarse, fases 2a y 2b.

5.2 MEDICIÓN DE DIÁMETRO DE OVOCITOS

Se realizó la medición del diámetro de los ovocitos en las diferentes fases gametogénicas para caracterizar su tamaño en cada caso. Así, se ha medido el diámetro de 30 ovocitos de cada fase en el mes de febrero en las tres áreas de estudio, tomando como referencia el puerto de Pasaia. Con los datos recogidos en el puerto de Pasaia, se ha representado el diámetro promedio de los ovocitos a lo largo del ciclo reproductivo de *Chelon labrosus* en la **Figura 2**.

Figura 2: Determinación del diámetro medio de ovocitos de los meses de muestreo en el puerto de Pasaia, a lo largo del ciclo reproductivo de *Chelón labrosus*.



Los ovocitos más grandes se registran en el mes de enero, ovocitos llenos de vitelogenina con un valor promedio de 379 µm, coincidiendo así con la temporada previa a la migración a mar abierto, donde alcanzan la madurez y se da el desove; y por lo tanto, seguido de un periodo de descanso correspondiente a las hembras que regresan al estuario tras el desove en los meses siguientes, que como se puede observar en el gráfico, se caracterizan por un diámetro menor de los ovocitos. Además, los ovocitos medidos en septiembre 2010 y julio 2011, tienen el diámetro más pequeño, de unos 40-45µm; resumiendo los datos obtenidos en la **Tabla 4**.

El resultado de los valores de diámetro promedio a lo largo de los diferentes meses del ciclo anual, refleja un amplio rango del diámetro en cada fase (**Tabla 5**). La mayor variedad en tamaños se observa en la fase 2c, fase característica de ovocitos vitelogénicos.

Tabla 4: El diámetro promedio de cada mes y el diámetro medio de las diferentes fases registradas en cada mes.

Mes	Diámetro promedio (μm)	Diámetro medio (μm) por fases						
		1	2a	2b	2c	3	4	5
sep-10	41.4	41.4	-	-	-	-	-	-
oct-10	101.9	68.0	104.1	146.2	-	-	-	-
nov-10	219.0	65.8	100.0	181.4	293.8	-	-	-
dic-10	315.3	-	112.4	-	355.8	-	-	-
ene-11	379.1	48.1	133.7	-	494.3	-	-	-
feb-11	76.1	69.4	127.9	160.2	-	-	-	42.0
mar-11	84.1	72.4	128.8	-	-	-	-	96.7
abr-11	63.9	63.6	131.5	-	-	-	-	43.4
may-11	82.5	80.3	104.4	-	-	-	-	68.7
jun-11	70.9	89.9	111.4	-	-	-	-	51.2
jul-11	44.3	44.3	-	-	-	-	-	-
ago-11	51.9	51.3	-	-	-	-	-	56.5
sep-11	66.4	46.6	99.4	-	-	-	-	-

Tabla 5: Rango del diámetro de los ovocitos de cada fase.

Fase	Rango (μm)
1	41.1-89.9
2a	99.5-133.7
2b	146.2-181.4
2c	293.8-494.4
3	-
4	-
5	42.0-96.7

También se midieron los ovocitos encontrados en febrero 2014 en Galindo y Gernika; los datos se muestran en la **Tabla 6**, incluyendo los cálculos del puerto de Pasaia del mismo mes.

Tabla 6: El diámetro promedio y el diámetro medio de las diferentes fases registradas de cada sitio.

Sitio	Diámetro medio (μm) por fases			
	1	2a	2b	5
Pasaia (2011)	69.4	127.9	160.2	42.0
Galindo (2014)	66.9	-	-	63.0
Gernika (2014)	-	110.5	-	-

En Gernika, se obtuvieron ovocitos en fase 2a, cuyo diámetro promedio fue 110,5 μm ; diámetro que está dentro del rango definido en el puerto de Pasaia (**Tabla 5**). Por otro lado, en Galindo se midieron ovocitos inmaduros y atrésicos, con un diámetro promedio de 66,9 y 63,0 μm , respectivamente. En este caso también, los valores calculados están dentro del rango definido en el puerto de Pasaia.

6. DISCUSIÓN

En este estudio, se presenta el protocolo a seguir para detectar el efecto que pueden llegar a tener los compuestos disruptores endocrinos en la reproducción de los peces, planteando como herramienta una metodología basada en la medición del diámetro de los ovocitos y analizando el desarrollo de estos.

Las principales características para una buena especie centinela fueron establecidas por Suter en 1993, requiriendo: presentar una distribución generalizada, alto estatus trófico, capacidad de resistir ante altos niveles de contaminación, ser fácil de capturar y mantener y poseer una biología conocida. Los mugílidos son utilizados a nivel mundial como organismos centinelas en estudios de seguimiento de la contaminación en zonas costeras; su distribución en todo el mundo permite la comparación de las respuestas en las diferentes áreas geográficas (Ortiz-Zarragoitia et al., 2014). Por ello, se caracterizó el ciclo reproductivo de *Chelon labrosus* de la familia de los mugílidos, mediante el seguimiento mensual en el puerto de Pasaia desde septiembre de 2010 hasta agosto de 2011.

Tras medir el diámetro de los ovocitos de los peces capturados, se observó que los ovocitos comenzaban a desarrollarse en el mes de septiembre, llegando a su tamaño máximo en el mes de enero, cuando los ovocitos están llenos de vitelogenina, al final de la fase de desarrollo (2c). El desove se da en invierno una vez alcanzada la fase

de maduración, pero no se encontraron gónadas en fase 3 ni en 4 ya que, los mubles muestran un desove isócrono y se mueven coordinadamente en grupo de los estuarios a alta mar para la reproducción (Greeley et al., 1987; Render et al., 1995), con lo que posiblemente, los individuos en esas fases se encontrasen en alta mar en el momento de capturas. También se vio un periodo de inactividad durante la primavera y verano, coincidiendo con un porcentaje de ovocitos atrésicos más alto y una disminución en el tamaño de los ovocitos analizados.

Estos resultados se asemejan a lo descrito por otros autores para mubles, entre ellos McDonough et al., 2005, que observó que el índice gonadal (GSI), que relaciona el peso de la gónada con el peso total del pez, presentaba valores más altos entre los meses de noviembre y diciembre, donde se caracterizaron ovocitos maduros. Por otra parte, Mićković et al., publicó en 2010 el ciclo reproductivo de un año entero de *Chelon labrosus*, lo que permitió una estimación detallada de los periodos migratorios. De acuerdo con los resultados, esta especie migra durante el invierno al mar abierto, donde se da la reproducción y vuelve en primavera a las costas, donde se da el periodo de inactivación.

En el presente proyecto se han realizado muestreos de tres áreas diferentes con el fin de comparar los resultados de los ovocitos vitelogénicos, ya que es esta fase final del desarrollo o la fase de maduración, la que se toma de referencia a la hora de analizar el efecto de los compuestos disruptores endocrinos cuando medimos el diámetro de los ovocitos (Gerbron et al., 2014). No obstante, entre las muestras obtenidas en Galindo y Gernika, no se encontraron ovocitos en esta fase, por lo que se decidió discutir los datos recogidos en el mes de febrero en los tres puntos, independientemente de la fase en la que encontraron los ovocitos. Así, se ha medido el diámetro de 30 ovocitos de cada fase en el mes de febrero de las tres áreas de estudio, tomando como referencia el puerto de Pasaia. Comparando los resultados, no se vio ninguna alteración en el mes de febrero, ya que las medidas tomadas estaban todas dentro del rango definido en el puerto de Pasaia (**Tabla 5**).

A pesar de estos resultados, la medición del diámetro para detectar el efecto de los productos químicos en la reproducción, ha dado resultados significativos en otros estudios. Los resultados demuestran que el diámetro de los ovocitos desarrollados es

menor cuanto mayor es el nivel de contaminación del agua (Gerbron et al., 2014), y estos resultados han sido completados a su vez con otras técnicas llevadas a cabo simultáneamente: (1) observaciones histológicas, en cuyos resultados observaron que el número de ovocitos en fase 1 aumentaba en las zonas contaminadas; (2) medición los niveles de vitelogenina, que disminuían al aumentar la contaminación y (3) actividad de la aromatasa, que también disminuía en las zonas contaminadas.

Utilizando estas y otras técnicas, diferentes estudios han detectado EDCs y efectos de los mismos en el área donde se ha realizado el presente trabajo. En un estudio realizado por Iparraguirre et al., en 2011, se recogieron muestras de diferentes zonas, entre las que cabe destacar el efluente del EDAR de Galindo en marzo de 2011, donde se encontraron y se clasificaron diferentes EDCs que podrían tener efectos estrogénicos en los individuos que habitan en esas aguas. Este tipo de efectos se pudieron, observar en otro estudio realizado en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai por Puy-Azurmendi et al., 2013, donde aunque los niveles de EDCs medidos estaban por debajo de las concentraciones efectivas en la vida silvestre definidas por el WHO/IPCS, se observó un elevado número de peces intersexuales.

7. CONCLUSIÓN

Se ha caracterizado el ciclo reproductivo de *Chelon labrosus*, por lo tanto se sabe que, para poder analizar la estrogénicidad de esta especie en la costa vasca por medio de la medición de sus ovocitos, deberán utilizarse las muestras de los meses de noviembre, diciembre y enero, cuando las gónadas se encuentran en la fase de vitelogenesis más avanzada.

En cuanto a los efectos producidos de los EDCs en el diámetro de los ovocitos, no se observaron diferencias entre puntos de muestreo a pesar de que en los tres puntos analizados se observaron individuos intersex que demuestran una exposición a contaminantes estrogénicos. Se considera que este resultado es debido a que las muestras analizadas no fueron las idóneas, ya que no se encontraron ovocitos vitelogénicos ni en Galindo ni en Gernika.

Aún así, la bibliografía confirma que la medición del diámetro de ovocitos es un método apropiado para analizar los efectos disruptores endocrinos y por lo tanto es necesaria la realización de mas estudios utilizando específicamente ovocitos vitelogénicos de *Chelon labrosus* que lleven a confirmar la hipótesis planteada.

8. BIBLIOGRAFÍA

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.

Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). *Sci Total Environ*, 443, 233-244.

Breton, T.S., Berlinsky, D.L. 2014. Characterizing ovarian gene expression during oocyte growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Phys D*, 9, 1–10.

Douxflis J., Mandiki R., Silvestre F., Bertrand A., Leroy D., Thomé J.P., Kestemont P. 2007. Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? *Sci Total Environ*, 372, 497–514.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.K. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104: 1096 – 1101.

Gamble, M., Wilson, I. 2002. The hematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Gamble M (eds.) *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone–Elsevier Science, London, UK, p 125.

Gerbron, M., Geraudie, P., Fernandes, D., Rotchell, J.M., Porte, C., Minier, C. 2014. Evidence of altered fertility in female roach (*Rutilus rutilus*) from the River Seine (France). *Environ Pollut*, 191, 58–62.

Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowner, T., Komen, H. 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384: 221-222.

Greeley, M.S.jr., Calder, R.D., Wallace, A.R. 1987. Oocyte growth and development in the striped mullet, *M. cephalus*, during seasonal ovarian recrudescence: relationship to fecundity and size at maturity. *Fish Bull*, 85 (2): 187–200.

Iparraguirre, A., Ailette Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L.A., Zuloaga, O. 2011. Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the

determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples. *Anal Bioanal Chem.* 401:339–352

Kagawa, H. 2013. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 6(4), 99–127.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R. W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *P Natl Acad Sci USA*, 104(21), 8897–8901.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J. 2009. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocr*, 165(3), 367–389.

Marlatt, V.L., Sun, J., Curran, C.A., Bailey, H.C., Kennedy, C.K., Elphick, J.R., Martyniuk, C. J. 2014. Molecular responses to 17 β -estradiol in early life stage salmonids. *Gen Comp Endocr*, 203, 203–214.

McDonough, C.J., Roumillat, W.A., Wenner, C.A. 2005. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fish Bull*, 103, 601–619.

Mićković, B., Nikčević, M., Hegediš, A., Regner, S., GAČIĆ, Z., Krpo-Ćetković, J., 2010. Mullet fry (*mugilidae*) in coastal waters of montenegro, their spatial distribution and migration phenology. *Arch. Biol. Sci.*, 62(1), 107-114.

Murua, H., Kraus, G., Saborido-Rey, F., Wittames, P.R., Thorsen, A, Junquera, S. 2003. Procedures to Estimate Fecundity of Wild Collected Marine Fish in Relation to Fish Reproductive Strategy. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33, 33–54.

Ortiz-Zarragoitia, M., Bizarro, C., Rojo-Bartolomé, I., Diaz de Cerio, O., Cajaraville M.P., Cancio, I. 2014. Mugilid Fish Are Sentinels of Exposure to Endocrine Disrupting Compounds in Coastal and Estuarine Environments. *Mar. Drugs* . 12, 4756-4782

Patiño, R., Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem*, 26(1986), 57–70.

Physiology, F., Kingdom, U. 1996. Oocyte growth and development in teleosts, 318, 287–318.

Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol*, 143, 303–315.

Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Kuster, M., Martínez, E., Guillamón, M., Domínguez, C., Serrano, T., Barbero, M.C., Lopez de Alda, M., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. 2010. An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Mar Environ Res*, 69, S63–S66.

Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Villagrasa, M., Kuster, M., Aragón P., Atienza, J., Puchades, R., Maquieira, A., Domínguez, C., López de Alda, M., Fernandes, D., Porte C., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. 2013. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai

Render, J.H., Thompson, B.A. and Allen, R.L. 1995. Reproductive development of striped mullet in Louisiana estuarine waters with notes on the applicability of reproductive assessment methods for isochronal species. *Trans. Am. Fish. Soc.* 124(1):26–36.

Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3), 390–411.

Sun, L., Jin, R., Peng, Z., Zhou, Q., Qian, H., Fu, Z. 2014. Effects of trilostane and fipronil on the reproductive axis in an early life stage of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology*, 23, 1044–1054.

WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme). *State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012*; Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., Eds.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2013. ISBN: 978-92-807-3274-0 (UNEP) and 978-92-4-150503-1 (WHO).