

Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biología

# Efectos de la exposición a estradiol en la gametogénesis avanzada de los mejillones

Autora:  
Izaskun Marcos Lekuona  
Director:  
Maren Ortiz-Zarragoitia

# Índice

<i>Resumen/Abstract</i> .....	1
1. Introducción .....	2
2. Objetivo .....	5
3. Materiales y métodos .....	5
3.1. Animales y diseño experimental .....	5
3.2. Análisis histológico .....	5
3.3. Análisis estadístico .....	7
4. Resultados .....	8
4.1. Experimento de exposición .....	8
4.1.1. Análisis de las fases gametogénicas .....	8
4.1.2. Análisis de la distribución de los valores del índice gonadal (IG) .....	9
4.1.3. Análisis de las alteraciones histopatológicas .....	12
4.2. Experimento de inyección .....	15
4.2.1. Análisis de las fases gametogénicas .....	15
4.2.2. Análisis de la distribución de los valores del índice gonadal (IG) .....	16
4.2.3. Análisis de las alteraciones histopatológicas .....	17
5. Discusión .....	18
6. Conclusiones .....	21
7. Agradecimientos .....	21
8. Bibliografía .....	22
<i>Anexos</i> .....	24

## **Resumen**

De entre los contaminantes descritos en el medio acuático, muchos son compuestos capaces de interferir en el sistema endocrino de los animales, pudiendo afectar a aspectos relacionados con la reproducción. Estos compuestos reciben el nombre de disruptores o alteradores endocrinos, e incluyen a hormonas esteroides, tanto naturales como sintéticas, compuestos de uso industrial y/o habitual. A pesar del limitado conocimiento del sistema endocrino de los moluscos, la presencia de hormonas sexuales esteroides en los moluscos bivalvos ha sugerido que estos compuestos pueden interferir en la regulación de su reproducción. El objetivo de este trabajo ha sido analizar el efecto de la hormona estrogénica estradiol (E2) sobre la gametogénesis del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Para ello se realizaron dos experimentos, utilizando mejillones adultos en fases avanzadas de la gametogénesis; en uno se expusieron los mejillones a dos dosis de E2 (20 ng/L y 2000 ng/L) durante 2 y 10 días, y en el otro se inyectaron con dos dosis de E2 (20 ng/Kg y 2000 ng/Kg) analizando su efecto tras 2 y 7 días. En ambos experimentos se tomaron muestras de la gónada y se realizó su estudio histopatológico, determinando las fases de desarrollo gametogénico, los índices gonadales, y analizando las alteraciones histológicas mediante microscopía óptica. Se observó que la exposición a E2 adelantaba la puesta de los mejillones tanto macho como hembra, además de inducirles la puesta precoz de gametos. Por lo tanto, se puede concluir que el estradiol afecta al desarrollo gametogénico de los mejillones, acelerando dicho proceso.

## **Abstract**

Among the pollutants described in the aquatic environment, several compounds are able to interfere with the endocrine system of animals, being able to affect aspects related to reproduction. These compounds are called endocrine disruptors, and include both natural and synthetic steroid hormones and industrial and personal care products. Despite the limited knowledge about the endocrine system of molluscs, the presence of steroid sex hormones in bivalve molluscs has suggested that these compounds can interfere with the regulation of their reproduction. The aim of the present work was to analyze the effect of the estrogenic hormone estradiol (E2) on mussel *Mytilus galloprovincialis* gametogenesis. For this purpose, two experiments were carried out using adult mussels in advanced stages of gametogenesis; in one of them, mussels were waterborne exposed to 20 ng/L and 2000 ng/L E2 for 2 and 10 days, and in the other one, mussels were injected with 20 ng/Kg and 2000 ng/Kg E2 and analyzed after 2 and 7 days. In both experiments, samples of the gonad were collected and their histopathological study was conducted, determining gamete developmental stages, gonad index, and analyzing

histopathological alterations under light microscopy. It was observed that E2 exposure advanced both male and female mussels' gamete spawning, as well as induced premature gamete spawning. Therefore, it can be concluded that estradiol affects the gametogenic development of mussels, accelerating this process.

## **1. Introducción**

Los disruptores o alteradores endocrinos son un grupo diverso de compuestos químicos que interaccionan con el sistema endocrino, interfiriendo con la actividad hormonal y afectando a la salud de los organismos (Annamalai y Namasivayam, 2015; Ciocan *et al.*, 2010). Entre estos compuestos se encuentran numerosas sustancias químicas sintéticas utilizadas en la industria y la agricultura, así como sustancias derivadas de la combustión de residuos sólidos urbanos, y de la utilización de aerosoles y de cosméticos, entre otros (Annamalai y Namasivayam, 2015). Los disruptores endocrinos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y muchos de ellos son resistentes a la degradación por procesos bióticos y abióticos (Porte *et al.* 2006), lo que hace que puedan acumularse y biomagnificarse en diferentes compartimentos ambientales, incluyendo la biota marina (Annamalai y Namasivayam, 2015; Ciocan *et al.*, 2010; Porte *et al.*, 2006). Actualmente se acepta que los disruptores endocrinos son responsables en cierta medida de la interrupción en la reproducción y en el desarrollo de poblaciones animales, y que tanto los vertebrados como los invertebrados son susceptibles a la acción de estos compuestos (Porte *et al.*, 2006).

Muchos de los disruptores endocrinos son estrogénicos, incluyéndose entre ellos tanto a estrógenos naturales como sintéticos (Canesi *et al.*, 2007; Porte *et al.*, 2006). Los efluentes de aguas residuales, las prácticas agrícolas y los residuos derivados de la ganadería son las principales fuentes de contaminación hormonal en los ambientes acuáticos (Ciocan *et al.*, 2010). La mayor parte de la información sobre los efectos biológicos y los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos en los organismos marinos proviene de estudios de vertebrados, lo que se debe, en parte, al limitado conocimiento acerca de la endocrinología de los invertebrados (Canesi *et al.*, 2007; Ciocan *et al.*, 2010; Ketata *et al.*, 2008; Porte *et al.*, 2006). Sin embargo, en la última década, la presencia de contaminantes en el medio acuático ha dado lugar a un número cada vez mayor de estudios sobre disrupción endocrina en invertebrados (Fernandes *et al.*, 2011). Entre estos animales, los moluscos son un importante foco de investigación, debido a su gran abundancia en la naturaleza, su importancia comercial y ecológica, y su uso como bioindicadores en la monitorización de la contaminación acuática (Ketata *et al.*, 2008).

Las primeras referencias de la existencia de esteroides en moluscos aparecieron en la década de 1950 (Scott, 2012). Desde entonces, la utilización de diversas técnicas analíticas ha dado lugar a la identificación en moluscos de esteroides conocidos en vertebrados, como estrógenos y andrógenos. En particular, las principales formas de estrógenos encontrados en moluscos incluyen al estradiol, a la estrona y al estriol (Croll y Wang, 2007). A pesar de que el papel que juegan las hormonas esteroides en los moluscos no se comprende aún del todo y que su origen endógeno es aún cuestionable, se han identificado etapas clave de la biosíntesis de andrógenos y estrógenos a partir del colesterol en distintas especies de moluscos (Janer *et al.*, 2005; Porte *et al.*, 2006; Scott, 2012). Además de la biosíntesis de esteroides, su conjugación con sulfatos y ácidos grasos puede jugar un papel clave en la homeostasis endocrina de moluscos, regulando los niveles de esteroides activos en los tejidos diana (Fernandes *et al.*, 2011; Janer *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los moluscos tienen la capacidad de absorber testosterona y estradiol exógenos y retenerlos conjugándolos con ácidos grasos, pudiendo después convertirlos de nuevo en esteroides libres y biológicamente activos (Fernandes *et al.*, 2011; Scott, 2012).

El sistema endocrino de los moluscos es enormemente diverso; varía tanto anatómica como fisiológicamente entre las distintas clases, lo que puede dar lugar a diferentes susceptibilidades hacia los disruptores endocrinos (Ketata *et al.*, 2008). Los bivalvos, una clase de moluscos sésiles y filtradores, poseen una gran capacidad de bioacumular pero reducida de biotransformar los contaminantes, y exhiben un amplio rango de respuestas biológicas ante ellos, lo que hace que sean ampliamente utilizados para evaluar los efectos de los contaminantes (Bignell *et al.*, 2012; Canesi *et al.*, 2007; Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2010). La exposición a esteroides modelo, como el estradiol, podría ayudar a caracterizar mejor la respuesta de estos organismos hacia los disruptores endocrinos estrogénicos, y a identificar rutas bioquímicas clave que pueden verse alterados por la exposición a dichos compuestos, además de identificar las consecuencias fisiológicas para los organismos (Porte *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los esteroides afectan a la diferenciación sexual, al desarrollo de la gónada, a la gametogénesis y a la fertilidad de los moluscos (Ketata *et al.*, 2008). Además, fluctuaciones en los niveles de estrógenos, tales como el estradiol, han sido correlacionadas con el ciclo reproductivo en bivalvos, y varios estudios han detectado la presencia de estradiol en la gónada de estos animales, lo que ha sugerido que los estrógenos pueden tener un papel importante en la regulación de la reproducción en moluscos bivalvos (Ciocan *et al.*, 2010; Croll y Wang, 2007). Por ejemplo, se ha observado que la inyección con estradiol estimula la oogénesis y la espermatogénesis en las vieiras *Mizuhopecten yessoensis* y *Placopecten magellanicus*, y que en individuos maduros de esta última especie incrementa la intensidad de la

puesta tanto en machos como en hembras. Se considera que el estradiol también está involucrado en la vitelogenesis de bivalvos, un proceso esencial para el desarrollo de los gametos femeninos (Croll y Wang, 2007). Estudios realizados con mejillones del género *Mytilus* han demostrado que el estradiol, además de afectar a aspectos relacionados con la reproducción, puede afectar también a la función de sus células inmunes, los hemocitos (Canesi *et al.*, 2007; Porte *et al.*, 2006).

El molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*, conocido como el mejillón mediterráneo, es una de las especies de mejillón más abundantes de Europa (Beaumont *et al.*, 2007). En este animal los sexos están separados, y la maduración de los óvulos y los espermatozoides ocurre en el tejido gonadal, que se desarrolla en el manto, un tejido básicamente con función de reserva (Beaumont *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2005). La gónada se compone de diferentes células germinales, gonoductos, y células auxiliares, tales como hemocitos del sistema circulatorio. El índice gonadal (IG) es ampliamente utilizado en el estudio del crecimiento y reproducción de los invertebrados marinos, y constituye una forma simple y eficaz de realizar una primera aproximación del estado de desarrollo sexual de un individuo (Suárez *et al.*, 2005).

El desarrollo gametogénico en *Mytilus sp.* es un proceso dinámico y continuo, controlado por la interacción de factores exógenos (temperatura, alimento, salinidad y luz) y endógenos (neuroendocrinos) que determinan el inicio y la duración del ciclo reproductivo. Este ciclo tiene carácter anual en *M. galloprovincialis*, y puede diferenciarse en tres etapas, crecimiento y maduración de los gametos, puesta/desove y reposo, produciéndose en primavera las puestas masivas y sincrónicas en ambos sexos (Fernandez, 2012; Suárez *et al.*, 2005). A pesar de esto, se han descrito diferencias entre poblaciones tanto en la duración como en el periodo del año en el que se producen los procesos del ciclo reproductivo, diferencias atribuidas a factores como la disponibilidad de alimentos o la contaminación (Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2010; Suárez *et al.*, 2005).

Entre los diversos efectos detectados en moluscos expuestos a diferentes contaminantes, las alteraciones histológicas son consideradas como las más relevantes y extendidas entre estos animales (Ketata *et al.*, 2008). Estas alteraciones incluyen las reacciones inflamatorias (infiltraciones hemocíticas o de células pardas), la atresia o degeneración ovocítica, y la necrosis, entre otras (Fernandez, 2012; Ketata *et al.*, 2008). Por lo tanto, la histopatología de moluscos, y en concreto de mejillones, se ha propuesto como una valiosa herramienta para evaluar el estado de salud de los individuos expuestos a contaminantes, ya que, además de informar acerca del estado metabólico y reproductivo, y de permitir la detección de patógenos que pueden afectar a la mortalidad de los individuos, permite detectar y caracterizar patologías utilizadas como indicadores de estrés ambiental (Bignell *et al.*, 2012).

## 2. Objetivo

El objetivo de este trabajo ha sido analizar el impacto de la exposición a estradiol (vía disuelto en agua o inyectado) en fases avanzadas de la gametogénesis del mejillón *Mytilus galloprovincialis* mediante una caracterización histológica e histopatológica.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Animales y diseño experimental

Se recolectaron mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) adultos en Plentzia (Vizcaya), en el mes de abril, en el cual se asume que los mejillones están en las fases de madurez o puesta. Los individuos fueron transportados al Centro de Investigación en Biología y Biotecnología Marina Experimental (PIE) de la UPV/EHU, y aclimatados en acuarios de 20 L a 15°C durante 8 días. Se utilizó agua de mar filtrada con aireación continua, y los mejillones fueron alimentados con algas (*Isochrysis sp.*). El estradiol (Fluka, Springer, Países Bajos), al ser un compuesto lipídico y por tanto insoluble en agua, se disolvió en 100 µL etanol para dar lugar a las distintas dosis experimentales.

**Experimento de exposición:** los mejillones se dividieron en tres grupos de 30 individuos, y cada grupo fue expuesto a una dosis diferente de E2: 20 ng/L (dosis baja) y 2000 ng/L (dosis alta). Un tercer grupo fue expuesto a 100 µL etanol/L de agua (grupo control). Tras 2 y 10 días de exposición, correspondientes al tiempo 1 (T1) y tiempo 2 (T2) respectivamente, se diseccionó el tejido gonadal de ambas valvas de cada individuo de los tres grupos experimentales, 15 individuos de cada grupo en cada uno de los dos tiempos. Este tejido se dispuso en fijador de Davidson y se guardó a 4°C durante 48 horas para su fijación.

**Experimento de inyección:** los mejillones se dividieron en tres grupos de 30 individuos cada uno, y en el músculo abductor de cada mejillón se inyectaron 25 µL de la dosis de estradiol seleccionada: 20 ng/Kg (dosis baja) y 2000 ng/Kg (dosis alta). Un tercer grupo fue inyectado con 25 µL de etanol (grupo control). Tras 2 y 7 días de la inyección, correspondientes al tiempo 1 (T1) y tiempo 2 (T2) respectivamente, se diseccionó el tejido gonadal de ambas valvas de cada individuo de los tres grupos experimentales, 15 individuos de cada grupo en cada uno de los dos tiempos. Al igual que en el experimento de exposición, este tejido se dispuso en fijador de Davidson y se guardó a 4°C durante 48 horas para su fijación.

### 3.2. Análisis histológico

Las muestras de ambos experimentos fijadas con el fijador de Davidson fueron deshidratadas en alcoholes con el procesador de tejidos automático Leica ASP300 e incluidas en parafina con el

includor de parafina Leica EG1150 H (Leica Biosystems Nussloch, Alemania). Después, se montaron los casetes (bloques de parafina) rotulados adecuadamente y conteniendo cada uno la muestra de gónada de un individuo. A partir de estos bloques se obtuvieron secciones histológicas (de 5  $\mu\text{m}$ ) de las gónadas con el micrótopo Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems Nussloch, Alemania). Previo al proceso de corte, los casetes se colocaron sobre una placa fría Leica EG1150 C (Leica Biosystems Nussloch, Alemania) a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ , enfriándose así la parafina para facilitar el corte de las muestras.

Las secciones obtenidas con el micrótopo se pusieron flotando sobre agua a  $40^{\circ}\text{C}$  en un baño termostatzado. Después, se “pescaron” las muestras con portaobjetos recubiertos de albúmina, obteniéndose así en un mismo portaobjetos varias secciones (2 o 3) del mismo bloque de parafina. Para cada individuo se prepararon dos portaobjetos con dos o tres secciones, que fueron secados en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y almacenados después a temperatura ambiente hasta su tinción.

Las muestras fueron teñidas con el protocolo de hematoxilina/eosina (Gamble y Wilson, 2002). La tinción de las muestras y la colocación de los cubreobjetos se realizaron de forma continua y automatizada con un sistema que incluye el teñidor Leica ST5010 Autostainer XL, el Leica TS5015 Transfer Station, y el cubreportas Leica CV5030 (Leica Biosystems Nussloch, Alemania). Una vez finalizados estos procesos, se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente para que se pegaran bien los cubreobjetos.

Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio óptico Olympus BX50 para determinar el sexo, la fase de desarrollo gametogénico y alteraciones histopatológicas (atresia ovocítica, necrosis, parásitos, infiltraciones hemocíticas y puestas inducidas). Las fases de desarrollo gametogénico de las gónadas de los mejillones fueron clasificadas de acuerdo a la descripción de Kim *et al.* (2006). Además, de acuerdo a estos mismos autores, se asignó un valor de índice gonadal (IG) a cada muestra (Tabla 1).



**Tabla 1.** Fases de desarrollo gametogénico y valores de índices gonadales correspondientes para los mejillones (adaptado de Kim *et al.*, 2006).

Fase de desarrollo gametogénico	Índice gonadal	Descripción
<b>Fase 1, reposo</b>	0	Solo tejido de reserva; gónada indiferenciada.
<b>Fase 2, desarrollo temprano</b>	1	Comienzo de la gametogénesis; folículos muy pequeños sin gametos maduros.
	2	Folículos algo mayores, con los primeros gametos maduros.
<b>Fase 3, desarrollo avanzado</b>	3	Los folículos ocupan alrededor de la mitad de la gónada, y la otra mitad el material de reserva. Misma proporción de gametos maduros y en desarrollo.
	4	Los folículos contienen gametos maduros principalmente; la gametogénesis aún continua.
<b>Fase 4, gónada madura</b>	5	Gónadas completamente maduras, sin tejido de reserva; folículos con todos los gametos maduros.
<b>Fase 5, puesta</b>	4	Comienzo de la puesta, aparecen huecos en los folículos.
	3	Alrededor de la mitad de los folículos vacíos.
	2	Alrededor de dos terceras partes de los folículos vacíos.
<b>Fase 6, post-puesta</b>	1	Folículos vacíos, solo con gametos residuales, pudiendo haber hemocitos reabsorbiéndolos.

### 3.3. Análisis estadístico

Se analizaron estadísticamente tanto los valores de índice gonadal (IG) como las prevalencias de las alteraciones histopatológicas observadas en los experimentos de exposición e inyección.

Por una parte, se realizó el análisis estadístico de los valores de IG mediante el programa informático SPSS 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), para comprobar si la distribución de estos valores es la misma entre los tratamientos (control, bajo y alto), entre los tiempos (T1 y T2) y entre los sexos (macho y hembra). El análisis de los valores de IG entre los tratamientos se realizó mediante la prueba no paramétrica ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis para dos o más muestras independientes, seguida del test post-hoc Dunn para comparaciones por pares. Las diferencias entre los tiempos y entre los sexos se analizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-

Whitney para dos muestras independientes. En ambos casos el nivel de significación se estableció a  $p < 0.05$ , siendo la hipótesis nula que la distribución de IG es la misma entre las categorías de tratamiento, sexo o tiempo. Este análisis se realizó por separado para cada uno de los dos experimentos.

Por otra parte, se analizaron estadísticamente las alteraciones histopatológicas mediante pruebas chi-cuadrado de independencia (<http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>). Se utilizaron tablas de contingencia 2 x 2 para dos variables; una de ellas el tratamiento a un determinado tiempo, y la otra la alteración histopatológica. Se estableció un nivel de significación de  $p < 0.05$ , siendo la hipótesis nula que las variables consideradas son independientes y no hay diferencias entre los tratamientos. Este análisis se realizó por separado para cada uno de los dos experimentos, realizando, a su vez, tres análisis separados en cada uno de ellos; teniendo en cuenta a todos los individuos (machos y hembras), incluyendo solo a machos e incluyendo solo a hembras.

## **4. Resultados**

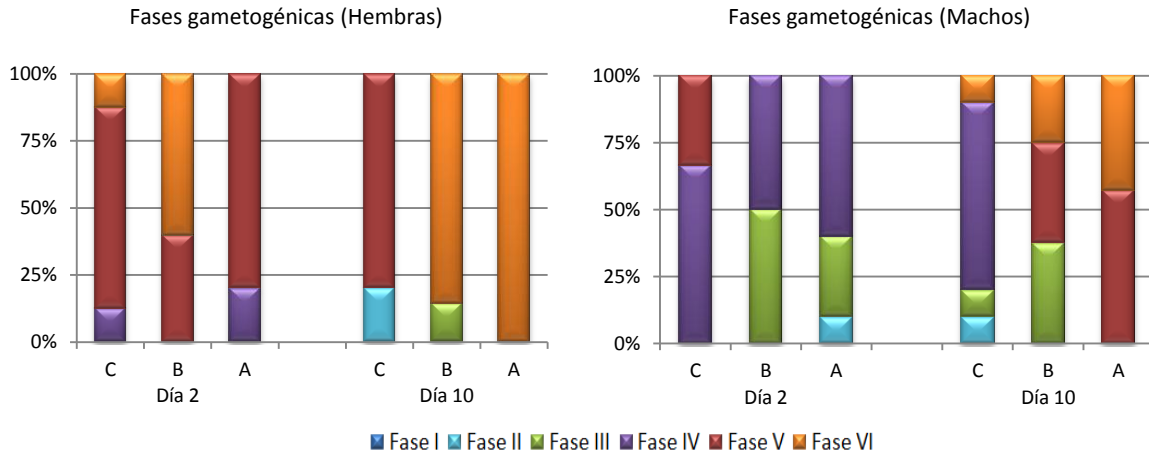
### *4.1. Experimento de exposición*

#### *4.1.1. Análisis de las fases gametogénicas*

En el día 2 de exposición (T1), el 12.5% de las hembras (Fig. 1) del grupo control se encontraron en fase 4 (madurez), otro 12.5% en fase 6 (post-puesta), y el 75% en fase 5 (puesta) (Fig. 2). En el día 10 de exposición (T2), el 20% de las hembras del grupo control se encontraron en fase 2 (gametogénesis temprana), mientras que el 80% en fase 5 (puesta). En las hembras del tratamiento bajo del T1, se observó que el 40% estaban en fase 5 (puesta) y el 60% en fase 6 (post-puesta). En el T2, el 14.29% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el restante 85.71% en fase 6 (post-puesta). En el tratamiento alto, al T1, el 20% de las hembras se encontraron en fase 4 (madurez), y el 80% en fase 5 (puesta). Al T2, el 100% se encontraron en fase 6 (post-puesta).

En cuanto a los machos (Fig. 1), del grupo control del T1, el 66.67% se encontraron en fase 4 (madurez), y el 33.33% en fase 5 (puesta). En el grupo control del T2, se encontró un 10% en fase 2 (gametogénesis temprana), otro 10% en fase 3 (gametogénesis avanzada), otro 10% en fase 6 (post-puesta), y el restante 70% en fase 4 (madurez). En el tratamiento bajo del T1, el 50% de los machos se encontró en fase 3 (gametogénesis avanzada) y el otro 50% en fase 4 (madurez). Al T2 de este mismo tratamiento, el 37.5% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), otro 37.5% en fase 5 (puesta), y el 25% en fase 6 (post-puesta). Por último, en los machos del

tratamiento alto del T1, el 10% se encontró en fase 2 (gametogénesis temprana), el 30% en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el 60% en fase 4 (madurez). Al T2, el 57.14% se encontraron en fase 5 (puesta), y el 42.86% en fase 6 (post-puesta).

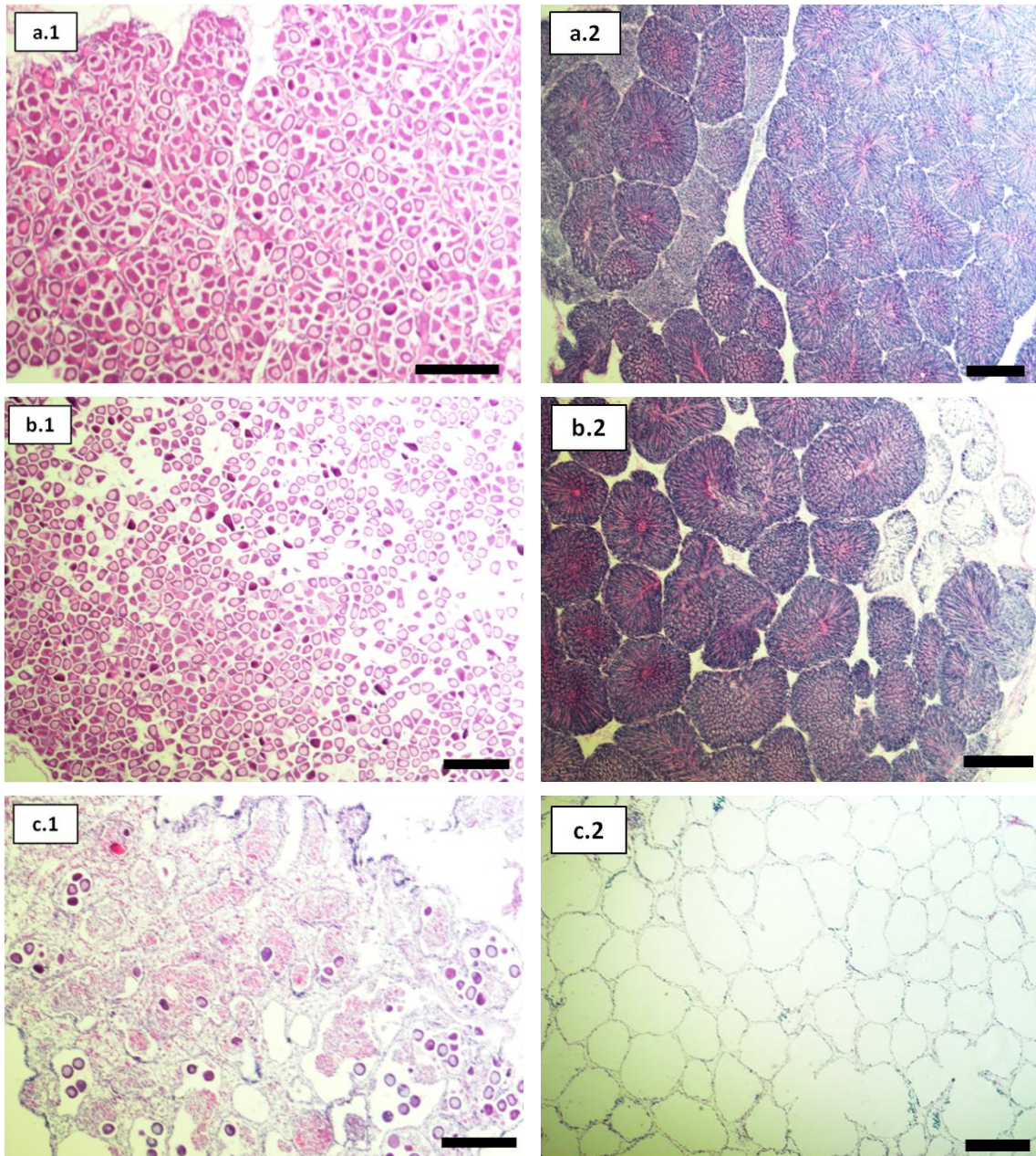


**Fig. 1.** Representaciones gráficas de las fases gametogénicas del experimento de exposición, separadas por sexos. Se representa el porcentaje acumulado de individuos de cada grupo experimental encontrado en cada fase gametogénica. C: tratamiento control (100  $\mu$ L etanol/L); B: tratamiento bajo (20 ng E2/L); A: tratamiento alto (2000 ng E2/L).

#### 4.1.2. Análisis de la distribución de los valores del índice gonadal (IG)

##### Distribución entre los tratamientos:

En el experimento de exposición a estradiol se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores de IG de los mejillones entre los distintos tratamientos (Fig. 3). Se observaron diferencias al comparar los mejillones, incluyendo machos y hembras, correspondientes al día 10 de exposición (T2), siendo las diferencias significativas entre los tratamientos control y bajo (estadístico de prueba  $H' = -14.867$ ;  $p = 0.002$ ) y control y alto ( $H' = -17.281$ ;  $p < 0.001$ ). También se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar solo los mejillones hembra del día 10 de los tratamientos control y bajo ( $H' = -6.929$ ;  $p = 0.019$ ), y de los tratamientos control y alto ( $H' = -8.000$ ;  $p = 0.005$ ), y los mejillones macho del día 10 de los tratamientos control y bajo ( $H' = -8.438$ ;  $p = 0.039$ ) y control y alto ( $H' = -9.107$ ;  $p = 0.030$ ), observándose valores menores de IG en los individuos expuestos a estradiol. Además, se observaron diferencias entre los tratamientos bajo y alto de los mejillones hembra correspondientes al día 2 de exposición ( $H' = 7.600$ ;  $p = 0.030$ ), observándose valores menores de IG en los mejillones del tratamiento bajo.

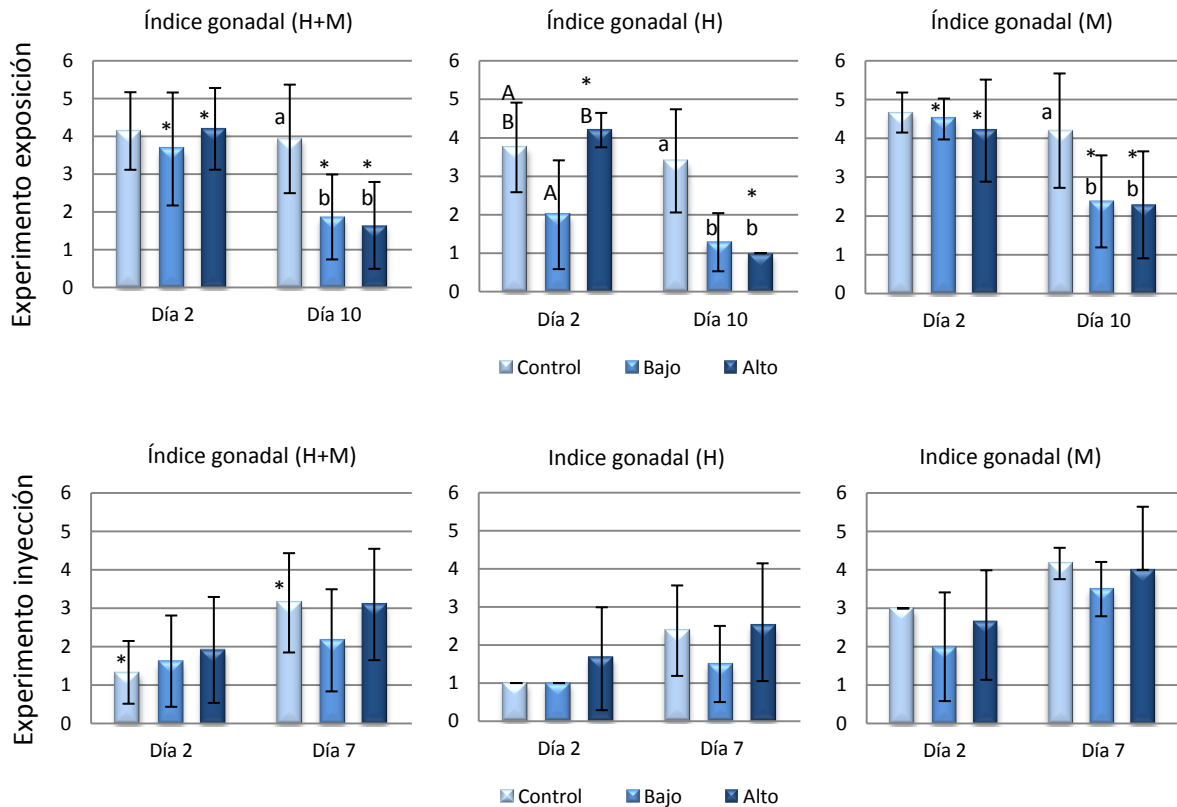


**Fig. 2.** Fases gametogénicas de *Mytilus galloprovincialis* encontradas en este estudio. (a) Fase 4 o de gónada madura. (a.1) Hembra del experimento de exposición, tratamiento alto y día 2. (a.2) Macho del experimento de exposición, tratamiento bajo y día 2. (b) Fase 5 o de puesta. (b.1) Hembra del experimento de exposición, grupo control y día 2. (b.2) Macho del experimento de exposición, grupo control y día 2. (c) Fase 6 o de post puesta. (c.1) Hembra del experimento de exposición, grupo control y día 2. (c.2) Macho del experimento de exposición, tratamiento alto y día 10. Barras de escala: 500µm.

#### Distribución entre los tiempos:

En el experimento de exposición se observaron varias diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores de IG de los mejillones entre los tiempos T1 y T2 (Fig. 3). Se observaron diferencias entre los mejillones del tratamiento bajo (U de Mann-Whitney = 42;  $p =$

0.003) y del tratamiento alto ( $U = 17.5$ ;  $p < 0.001$ ). Al considerar los sexos por separado también se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos. Los mejillones hembra del tratamiento alto difieren entre los dos tiempos ( $U = 0$ ;  $p = 0.003$ ), y también los mejillones macho de este mismo tratamiento ( $U = 10$ ;  $p = 0.014$ ). Los mejillones macho del tratamiento bajo también difieren significativamente en los tiempos T1 y T2 ( $U = 5$ ;  $p = 0.001$ ). En todos los casos se observaron valores menores de IG en los mejillones del T2.



**Fig. 3.** Representaciones gráficas de los valores de los índices gonadales de los experimentos de exposición (arriba) e inyección (abajo), separadas por tratamientos, tiempos y sexos. Los valores de IG se representan como la media de cada grupo, y las barras de error indican la desviación estándar. H: hembra; M: macho; A y B: grupos diferentes dentro de los tratamientos del día 2; a y b: grupos diferentes dentro de los tratamientos del día 10; \* Diferencias significativas entre los tiempos.

#### Distribución entre los sexos:

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre machos y hembras al comparar los valores de IG de los mejillones del tratamiento bajo del día 2 ( $U$  de Mann-Whitney=47.5;  $p = 0.003$ ) (Fig. 3), observándose valores menores de IG en las hembras.

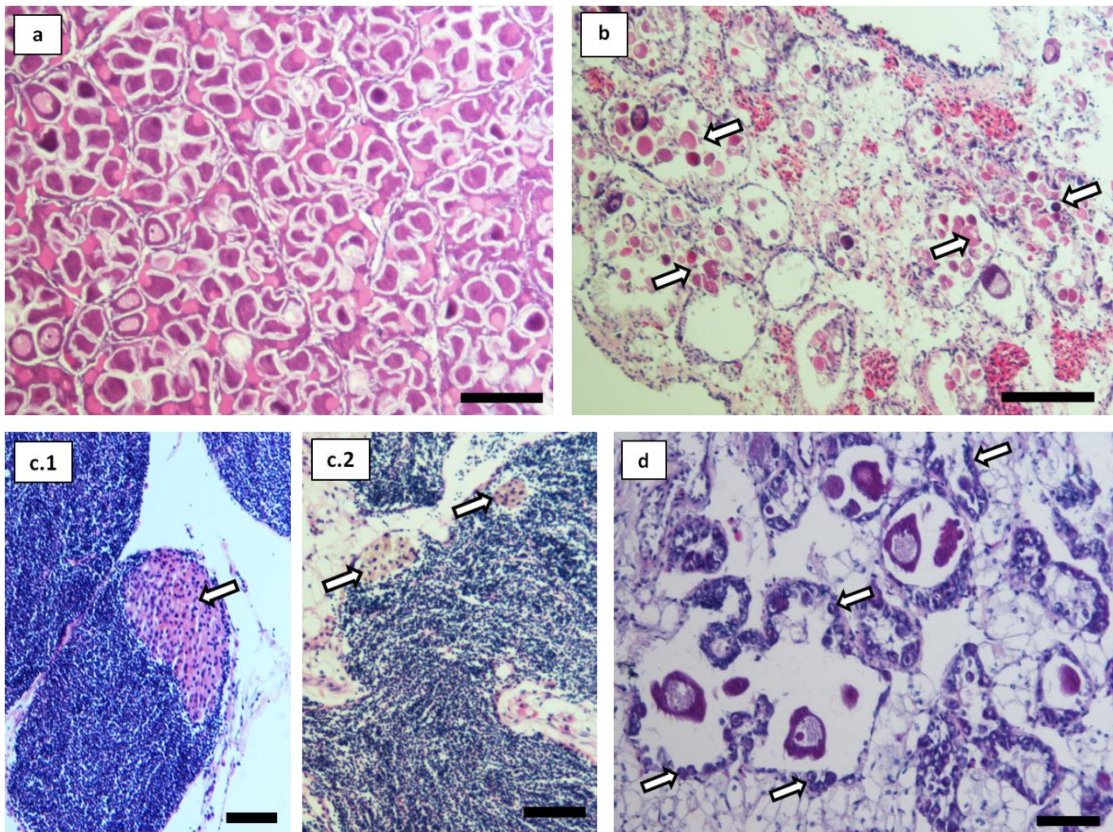
#### *4.1.3. Análisis de las alteraciones histopatológicas*

En el experimento de exposición, teniendo en cuenta a todos los individuos (machos y hembras juntos), se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El tratamiento alto en el segundo (T1) y el décimo día (T2) de exposición difiere en cuanto a la infiltración hemocítica (Fig. 4c), observándose un mayor número de infiltraciones en el tiempo T1. Sin embargo, analizando esta alteración por separado en ambos sexos no se obtuvieron diferencias significativas entre los tiempos. Los tratamientos control y bajo del décimo día de exposición (T2) se diferencian en cuanto a la presencia de parásitos (Fig. 5), observándose un mayor número de parásitos en el tratamiento bajo. Una vez más, al analizar esta alteración por separado en ambos sexos no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Por último, se pudo observar que los tratamientos control y alto del tiempo T2 son diferentes en cuanto a la infiltración hemocítica, observándose un mayor número de infiltraciones en el tratamiento control. Pero, al igual que en los casos anteriores, tras analizar esta alteración por separado en ambos sexos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Al analizar los individuos macho y hembra del experimento de exposición por separado se obtuvieron algunos resultados estadísticamente significativos en cuanto a las alteraciones histopatológicas. Los valores de significación obtenidos en las comparaciones entre grupos se detallan en el Anexo 1. En los machos (Tabla 2), se vio que los grupos control de los tiempos T1 y T2 se diferencian en la presencia de parásitos, observándose un número mayor en el tiempo T1. Además, el tratamiento bajo en los tiempos T1 y T2 difiere en la puesta inducida (Fig. 4d), siendo mayor el número de puestas inducidas observadas en el tiempo T2. En cuanto a las hembras (Tabla 3), el tratamiento alto en los tiempos T1 y T2 se diferencia tanto en la puesta inducida, siendo mayor el número de casos en el tiempo T2, como en la atresia (Fig. 4a), observándose un número mayor de gónadas atrésicas en el tiempo T1. Además, los tratamientos control y alto del tiempo T2 se diferencian en la puesta inducida, observándose más casos en el tratamiento alto.

Se ha observado una mayor cantidad de puestas inducidas en los mejillones expuestos a estradiol que en los controles, afectando más a las hembras del tratamiento alto. La infiltración hemocítica (propriadamente dicha o en forma de células pardas) solo se ha observado en machos, afectando a un porcentaje mayor de mejillones del grupo control que de los tratados con E2. La atresia se ha detectado en una mayor cantidad de hembras del grupo control que de las tratadas con E2. Por último, la necrosis (Fig. 4b), que solo se ha observado en hembras, ha sido más abundante en el tratamiento bajo que en los demás grupos.

Se ha podido observar la presencia de parásitos (*Steinhausia mytilovum* (Fig. 5a) y *Nematopsis sp.* (Fig. 5b)) en una elevada proporción de las gónadas analizadas, siendo *Nematopsis sp.* mucho más abundante. Éste se ha detectado más en los mejillones expuestos a estradiol que en los controles, afectando más a los machos del tratamiento alto. *S. mytilovum* solo se ha detectado en hembras, siendo más abundante en el tratamiento bajo que en los demás grupos.



**Fig. 4.** Histopatologías detectadas en los mejillones *Mytilus galloprovincialis* del estudio. (a) Atresia ovocítica en una hembra del experimento de exposición, tratamiento alto y día 2, barra de escala 250  $\mu\text{m}$ . (b) Necrosis (flechas) en los folículos ováricos de una hembra del experimento de exposición, tratamiento alto y día 10, barra de escala 250  $\mu\text{m}$ . (c.1) Infiltración hemocítica (flecha) en un folículo espermático de un macho del experimento de exposición, grupo control y día 10, barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . (c.2) Células pardas (flechas) en folículos espermáticos de un macho del experimento de exposición, tratamiento alto y día 2, barra de escala 100  $\mu\text{m}$ . (d) Puesta inducida, pudiéndose observar oögonias (flechas) unidas a la pared de los folículos de una hembra del experimento de inyección, tratamiento alto y día 7, barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 2.** Análisis de las alteraciones histopatológicas de los mejillones macho de los distintos tratamientos y tiempos del experimento de exposición. Se indica el número de mejillones que presentan la alteración por el número de mejillones de cada grupo experimental. T1 y T2 hacen referencia, respectivamente, a los días 2 y 10 de exposición. En negrita, resultados que han dado lugar a diferencias significativas.

Experimento exposición, mejillones macho										
Alteraciones histopatológicas										
Tratamientos	Necrosis		Puesta inducida		Infiltración hemocítica		Parásitos		T1	T2
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2		
Control	-	-	0/6	3/10	1/6	4/10	<b>6/6</b> &	<b>5/10</b> &		
Bajo	-	-	<b>0/10</b> &	<b>3/8</b> &	3/10	2/8	6/10	7/8		
Alto	-	-	3/10	1/7	4/10	0/7	8/10	6/7		

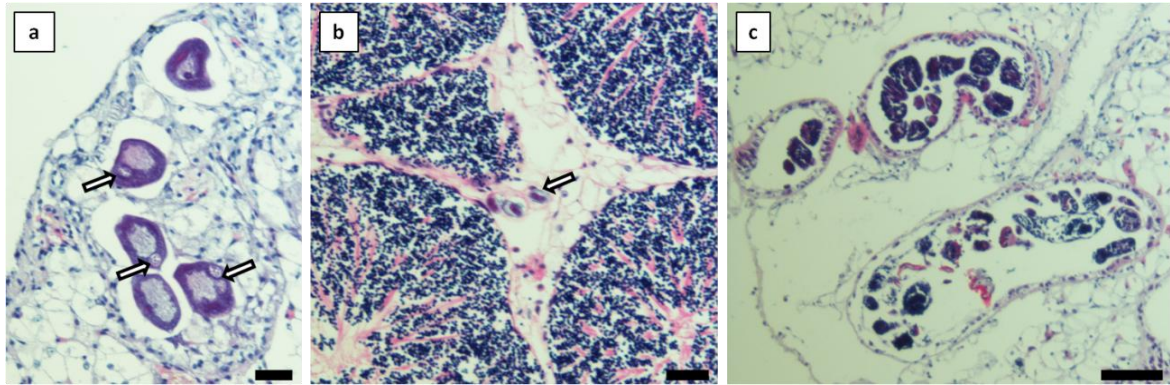
& Diferencias entre los tiempos de exposición; - No detectado.

**Tabla 3.** Análisis de las alteraciones histopatológicas de los mejillones hembra de los distintos tratamientos y tiempos del experimento de exposición. Se indica el número de mejillones que presentan la alteración por el número de mejillones de cada grupo experimental. T1 y T2 hacen referencia, respectivamente, a los días 2 y 10 de exposición. En negrita, resultados que han dado lugar a diferencias significativas.

Experimento exposición, mejillones hembra										
Alteraciones histopatológicas										
Tratamientos	Atresia		Necrosis		Puesta inducida		Infiltración hemocítica		Parásitos	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Control	6/8	2/5	0/8	2/5	0/8	0/5	-	-	4/8	2/5
Bajo	1/5	0/7	2/5	4/7	1/5	2/7	-	-	3/5	6/7
Alto	<b>3/5</b> &	<b>0/7</b> &	0/5	3/7	<b>0/5</b> &	<b>5/7</b> &*	-	-	1/5	5/7

\* Diferencias significativas entre el control y el grupo experimental; & Diferencias entre los tiempos de exposición. - No detectado





**Fig. 5.** Parásitos en *Mytilus galloprovincialis*. (a) Esporocitos del parásito *Steinhausia mytilovum* (flechas) en el citoplasma de los ovocitos de una hembra del experimento de exposición, tratamiento bajo y día 10, barra de escala 50  $\mu$ m. (b) Esporas del parásito *Nematopsis sp.* (flecha) en el tejido conectivo entre folículos espermáticos de un macho del experimento de exposición, tratamiento alto y día 2, barra de escala 50  $\mu$ m. (c) Trematodo en el interior de los folículos de un individuo del experimento de inyección, grupo control y día 7, barra de escala 150  $\mu$ m.

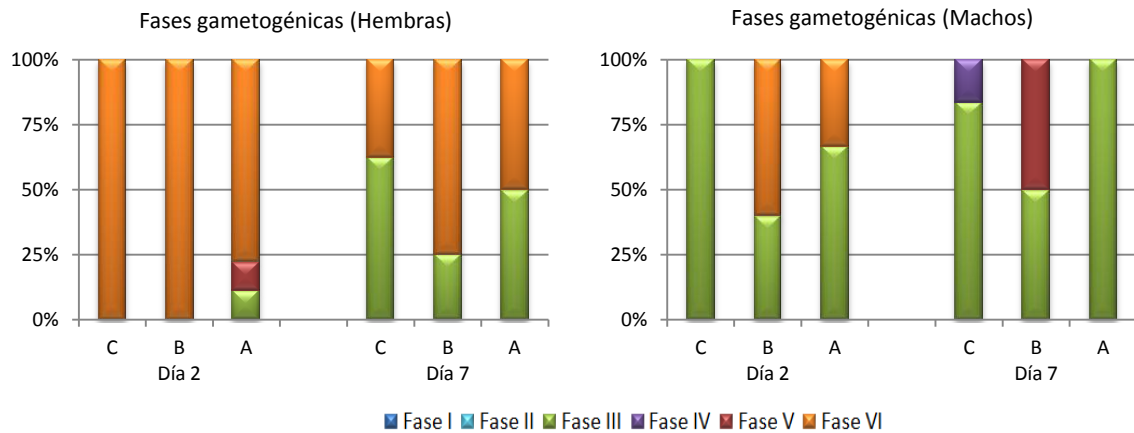
## 4.2. Experimento de inyección

### 4.2.1. Análisis de las fases gametogénicas

En el día 2 tras la inyección (T1), el 100% de las hembras (Fig. 6) del grupo control se encontraron en fase 6 (post-puesta). Al día 7 tras la inyección (T2), el 62.5% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el 37.5% en fase 6 (post-puesta). En el tratamiento bajo del T1, el 100% de las hembras se encontraron en fase 6 (post-puesta). Al T2 de este mismo tratamiento, el 25% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el 75% restante en fase 6 (post-puesta). En el tratamiento alto del T1, el 11.11% de las hembras se encontró en fase 3 (gametogénesis avanzada), otro 11.11% en fase 5 (puesta), y el restante 77.78% en fase 6 (post-puesta). Al T2, el 50% se encontró en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el otro 50% en fase 6 (post-puesta).

En cuanto a los machos (Fig. 6), el único individuo perteneciente al grupo control del T1 se encontró en fase 3 (gametogénesis avanzada). Al T2, el 83.33% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el 16.67% en fase 4 (madurez). En el tratamiento bajo del T1, el 40% se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el 60% restante en fase 6 (post-puesta). De los 2 machos encontrados en el tratamiento bajo del T2, uno se encontró en fase 3 (gametogénesis avanzada), y el otro en fase 5 (puesta). Al tratamiento alto del T1 pertenecieron 3 machos, de los cuales 2 se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada), y 1 en fase 6 (post-

puesta). Por último, en el tratamiento alto del T2, el 100% de los machos se encontraron en fase 3 (gametogénesis avanzada).



**Fig. 6.** Representaciones gráficas de las fases gametogénicas del experimento de inyección, separadas por sexos. Se representa el porcentaje acumulado de individuos de cada grupo experimental encontrado en cada fase gametogénica. C: tratamiento control (25  $\mu$ L etanol); B: tratamiento bajo (20 ng E2/kg); A: tratamiento alto (2000 ng E2/kg).

#### 4.2.2. Análisis de la distribución de los valores del índice gonadal (IG)

##### Distribución entre los tratamientos:

En el experimento de inyección no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de los valores de IG en los distintos tratamientos (Fig. 3).

##### Distribución entre los tiempos:

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de IG de los mejillones del tratamiento control entre los tiempos T1 y T2 (U de Mann-Whitney = 71.5;  $p = 0.012$ ) (Fig. 3). En este caso, los valores más bajos de IG se observaron en el T1.

##### Distribución entre los sexos:

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras al comparar los valores de IG de los mejillones del grupo control del día 7 (U = 45.5;  $p = 0.003$ ) (Fig. 3), observándose valores menores de IG en las hembras.

#### 4.2.3. Análisis de las alteraciones histopatológicas

En el experimento de inyección, teniendo en cuenta a todos los individuos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones entre tiempos ni entre tratamientos. Sin embargo, analizando los individuos macho y hembra de este experimento por separado sí que se obtuvieron algunos resultados estadísticamente significativos. Los valores de significación obtenidos en las comparaciones entre grupos se detallan en el Anexo 2.

En los machos (Tabla 4), los tratamientos control y bajo del tiempo T1 se diferencian en la presencia de parásitos, observándose más en el tratamiento bajo. Los tratamientos control y alto del tiempo T1 también se diferencian en la presencia de parásitos, observándose una mayor presencia en el tratamiento alto. En las hembras (Tabla 5), los tratamientos bajo y alto del tiempo T2 se diferencian en la necrosis, siendo mayor el número de gónadas con necrosis en el tratamiento bajo.

**Tabla 4.** Análisis de las alteraciones histopatológicas de los mejillones macho de los distintos tratamientos y tiempos del experimento de inyección. Se indica el número de mejillones que presentan la alteración por el número de mejillones de cada grupo experimental. T1 y T2 hacen referencia, respectivamente, a los días 2 y 7 tras la inyección. En negrita, resultados que han dado lugar a diferencias significativas.

Experimento inyección, mejillones macho								
Alteraciones histopatológicas								
Tratamientos	Necrosis		Puesta inducida		Infiltración hemocítica		Parásitos	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Control	-	-	1/1	5/6	0/1	2/6	0/1	5/6
Bajo	-	-	5/5	1/2	2/5	0/2	<b>5/5 *</b>	1/2
Alto	-	-	3/3	4/4	2/3	1/4	<b>3/3 *</b>	3/4

\* Diferencias significativas entre el control y el grupo experimental; - No detectado.

Cabe destacar la elevada proporción de puestas inducidas observadas en el experimento de inyección, ya que esta alteración se ha observado en el 91.23% del total de individuos, afectando a un porcentaje superior de hembras que de machos, pero de forma muy similar a los grupos control y a los inyectados con estradiol. En cuanto a las demás alteraciones histopatológicas, la infiltración hemocítica (propriadamente dicha o en forma de células pardas) solo se ha observado en machos, afectando más al tratamiento alto. La atresia se ha detectado en un mayor porcentaje de hembras del grupo control que de las tratadas con E2. Por último, la necrosis, que solo se ha observado en hembras, ha sido más abundante en el tratamiento bajo.

**Tabla 5.** Análisis de las alteraciones histopatológicas de los mejillones hembra de los distintos tratamientos y tiempos del experimento de inyección. Se indica el número de mejillones que presentan la alteración por el número de mejillones de cada grupo experimental. T1 y T2 hacen referencia, respectivamente, a los días 2 y 7 tras la inyección. En negrita, resultados que han dado lugar a diferencias significativas.

Experimento inyección, mejillones hembra										
Alteraciones histopatológicas										
Tratamientos	Atresia		Necrosis		Puesta inducida		Infiltración hemocítica		Parásitos	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Control	0/5	2/8	3/5	5/8	5/5	8/8	-	-	5/5	4/8
Bajo	0/3	0/4	3/3	<b>4/4</b> #	3/3	4/4	-	-	2/3	4/4
Alto	1/9	1/6	5/9	<b>2/6</b> #	7/9	6/6	-	-	7/9	5/6

# Diferencias significativas entre los tratamientos alto y bajo. - No detectado.

Se ha podido observar la presencia de parásitos (*Steinhausia mytilovum* (Fig. 5a), *Nematopsis sp.* (Fig. 5b) y un trematodo (Fig. 5c)) en una elevada proporción de las gónadas analizadas, siendo *Nematopsis sp.* mucho más abundante que los otros dos. Éste se ha detectado más en los mejillones inyectados con estradiol que en los controles, afectando a un porcentaje mayor de machos que de hembras. *S. mytilovum* solo se ha observado en la gónada de las hembras, siendo más abundante en el tratamiento alto. El trematodo, por su parte, solo se ha detectado en uno de los individuos analizados, perteneciente al grupo control.

## 5. Discusión

La aparición de efectos endocrinos ligados a la actividad, la síntesis o la eliminación de los esteroides en los vertebrados y la presencia de esteroides en los tejidos de moluscos ha impulsado la búsqueda de mecanismos similares de alteración endocrina en especies de invertebrados (Ketata *et al.*, 2008). Sin embargo, la evaluación de los efectos de los disruptores endocrinos en moluscos representa un desafío complejo, debido al limitado conocimiento de su sistema endocrino y de los mecanismos de acción de las hormonas naturales, además de a las diferencias existentes entre distintas especies (Canesi *et al.*, 2007). A pesar de esto, numerosos estudios se han enfocado en analizar el efecto de estrógenos, tanto naturales como sintéticos, sobre aspectos relacionados con la reproducción de los bivalvos.

En este trabajo se ha analizado el efecto que puede tener una hormona estrogénica modelo, el estradiol (E2), sobre la gametogénesis de mejillones *Mytilus galloprovincialis* adultos. Para ello se

han llevado a cabo dos experimentos, en los que se han expuesto o inyectado los individuos con dos dosis diferentes de E2, y cuya duración ha sido de 2 a 10 o de 2 a 7 días.

La mayor parte de los mejillones de los grupos control del experimento de exposición se encontraban en las fases de madurez o puesta, lo que se corresponde con el ciclo reproductivo descrito en poblaciones de mejillones del Golfo de Vizcaya durante la primavera (Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2010). Sin embargo, en el experimento de inyección, la mayoría de los individuos de los grupos control se encontraban en las fases de post-puesta o de desarrollo avanzado con puesta inducida. Las diferencias observadas entre ambos experimentos podrían deberse a alguna variación en las condiciones de temperatura, disponibilidad de alimento o salinidad en los distintos acuarios, o, más probablemente, a que la inyección pudo haber provocado algún tipo de estrés en los individuos del experimento de inyección, estrés que les indujo puestas prematuras. En ambos experimentos se ha podido observar una tendencia hacia el adelantamiento de la puesta, con valores de índice gonadal (IG) menores, en los mejillones hembra, algo que también fue observado en el trabajo de Fernandez (2012), en el cual los mejillones fueron recolectados en la misma localidad y época del año además de ser sometidos a las mismas dosis de estradiol. Las diferencias en el IG entre machos y hembras han sido significativas al comparar los mejillones del tratamiento bajo del día 2 de exposición, y los mejillones del tratamiento control del día 7 tras la inyección. Las diferencias observadas entre los mejillones expuestos a dosis bajas de estradiol sugieren que esta hormona podría tener un efecto mayor en hembras. Sin embargo, en un estudio del ciclo reproductivo de *Mytilus galloprovincialis* en Galicia (Suárez *et al.*, 2005), que no implicó la exposición de los mejillones a estrógenos, también se observó que el índice gonadal presentaba diferencias significativas entre individuos macho y hembra, por lo que podrían estar involucrados otros factores exógenos o endógenos en las diferencias observadas.

En el presente trabajo, se han observado diferencias significativas en el índice gonadal de los mejillones del experimento de exposición al comparar los tratamientos bajo y control y alto y control del T2, tanto en los individuos macho como hembra, y detectándose en ambos casos valores menores del IG en los individuos expuestos a estradiol, lo que sugiere que el E2 ha podido provocar un adelantamiento de la puesta. De forma similar, Fernandez (2012) observó diferencias significativas al comparar los machos expuestos a la dosis alta de estradiol del T1 con los machos del grupo control del mismo tiempo, observando valores de IG menores en los mejillones expuestos a estradiol. En un trabajo previo con mejillones *M. galloprovincialis*, Quevedo (2009) observó que la exposición e inyección con E2 en las etapas tempranas de gametogénesis aceleraba el desarrollo gametogénico. Además, en otro estudio se observó que la exposición de mejillones *M. galloprovincialis* a dosis bajas (20 ng/L) de E2 les inducía la gametogénesis (Janer *et al.*, 2005).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el estradiol podría acelerar el ciclo gametogénico de los mejillones, tanto en las etapas iniciales como avanzadas.

Se han podido observar varias alteraciones histopatológicas en la gónada de los mejillones, tanto del experimento de exposición como del de inyección, y en todos los grupos experimentales. Las alteraciones descritas han sido atresia ovocítica, necrosis, infiltraciones hemocíticas y puestas inducidas. Se ha observado una diferencia significativa en cuanto a las puestas inducidas entre los mejillones hembra de los tratamientos alto y control del T2 del experimento de exposición, siendo mayor el número de puestas inducidas en los individuos expuestos a estradiol, algo que también fue observado por Quevedo (2009). De forma similar, Croll y Wang (2007) observaron que la inyección con estradiol en vieiras les estimulaba la puesta. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el estradiol podría actuar como inductor de la puesta en los moluscos bivalvos. En estos animales, el fenómeno de atresia ovocítica ha sido descrito de forma frecuente, y entre los factores que pueden provocarlo se han propuesto las situaciones de estrés (déficit nutricional, bajas temperaturas y contaminación ambiental) (Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2010; Suárez *et al.*, 2005). Las necrosis observadas podrían tratarse de la fase final de atresia ovocítica, en la cual los ovocitos cuyos componentes celulares han sido lisados están siendo digeridos por hemocitos, tal y como describieron Suarez y colaboradores (2005). No se han observado diferencias significativas para la atresia, la necrosis ni las infiltraciones hemocíticas al comparar los mejillones expuestos o inyectados con estradiol respecto a los de los grupos control, lo que sugiere que podrían ser alteraciones no promovidas por este compuesto.

Como indicaron Ciocan y colaboradores (2010) en su trabajo, las diferencias observadas entre los experimentos pueden deberse a la distinta forma en la que se suministró el estradiol a los individuos, mediante inyección en el músculo abductor o mediante exposición del organismo entero, lo que pudo dar lugar a diferentes respuestas en los mejillones.

El análisis histológico realizado también ha permitido observar la presencia del parásito protista *Nematopsis sp.* en una gran cantidad (>60%) de los mejillones analizados de ambos experimentos. A pesar de esto, se trata de un parásito de baja patogenicidad (Kim *et al.*, 2006), y las infecciones observadas han sido muy leves, por lo que se descarta que hayan influido en las alteraciones observadas en las gónadas.

Con todo esto, a pesar del desconocimiento existente sobre los mecanismos de acción de los esteroides en moluscos, parece que los compuestos estrogénicos como el estradiol pueden alterar el ciclo gametogénico de los mejillones, lo que podría tener consecuencias negativas sobre sus poblaciones. En vista de esto, quizás sería interesante para futuros trabajos analizar

histopatológicamente el efecto de otras hormonas esteroideas sexuales sobre las distintas etapas del ciclo gametogénico de los mejillones, para tratar de conocer mejor sus posibles efectos de disrupción endocrina.

## **6. Conclusiones**

- La exposición a estradiol acelera el ciclo gametogénico, adelantando la puesta de los mejillones, tanto en machos como en hembras.

- En cuanto a las alteraciones histopatológicas, se ha observado que la exposición a estradiol induce la puesta prematura de mejillones aún en desarrollo gametogénico, siendo este efecto más marcado en hembras. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas para la atresia ovocítica, la necrosis ni las infiltraciones hemocíticas entre los grupos control y los tratados con E2.

- Por lo tanto, el estradiol tiene un efecto sobre la gametogénesis tardía del mejillón.

## **7. Agradecimientos**

Quisiera agradecer al director de este trabajo, Maren Ortiz-Zarragoitia, la oportunidad de poder realizar este estudio y la ayuda recibida en todo momento, y a los demás profesores e investigadores del Departamento de Zoología y Biología Celular Animal por la ayuda y consejos que me han dado. Este trabajo ha recibido ayuda económica del Gobierno Vasco, mediante la financiación a los grupos de investigación consolidados (IT-810-13) y de la UPV/EHU (UFI 11/37).

## 8. Bibliografía

- Annamalai, J., & Namasivayam, V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environment international*, 76, 78-97.
- Beaumont, A. R., Gjedrem, T., & Moran, P., 2007. Blue mussel *Mytilus edulis*, Mediterranean mussel *M. galloprovincialis*. *Genetic impact of aquaculture activities in native populations. Genimpact Final Scientific Report*, 62-69.
- Bignell, J., Cajaraville, M. P., & Mariogómez, I., 2012. 15 Background document: histopathology of mussels (*Mytilus spp.*) for health assessment in biological effects monitoring. *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*, 111.
- Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., & Marcomini, A., 2007. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies. *Aquatic toxicology*, 81(1), 36-44.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Puinean, A. M., Hill, E. M., Minier, C., Osada, M., ... & Rotchell, J. M., 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution*, 158(9), 2977-2984.
- Croll, R. P., & Wang, C., 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture*, 272(1), 76-86.
- Fernandes, D., Loi, B., & Porte, C., 2011. Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(3), 189-195.
- Fernandez, J., 2012. Effects of estradiol on mussels (*Mytilus galloprovincialis*) at late gametogenesis stage. *Master thesis. UPV-EHU*.
- 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.
- Janer, G., Lavado, R., Thibaut, R., & Porte, C., 2005. Effects of 17 $\beta$ -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: a possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquatic toxicology*, 75(1), 32-42.
- Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., & Minier, C., 2008. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(3), 261-270.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. A., & Powell, E. N., 2006. Histological techniques for marine bivalve molluscs: update.



Ortiz-Zarragoitia, M., & Cajaraville, M. P., 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 693-701.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 303-315.

Quevedo, S., 2009. Effects of waterborne to and injection with 17 $\beta$ -estradiol on adult mussel (*Mytilus galloprovincialis*) during gametogenesis. *Master thesis. UPV-EHU*.

Scott, A. P., 2012. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids*, 77(13), 1450-1468.

Suárez, M. P., Alvarez, C., Molist, P., & Juan, F. S., 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 531-540.

## Anexos

**Anexo 1.1.** Valores de significación obtenidos al comparar las alteraciones histopatológicas entre los grupos de mejillones macho del experimento de exposición. Las tablas a continuación proporcionan la siguiente información: el número de individuos de cada grupo en los que se ha observado o no la alteración, el número de individuos esperado ( ), y el valor del estadístico chi-cuadrado para cada grupo experimental [ ].

	Parásitos	No parásitos	Total por filas
<b>Control (T1)</b>	6 (4.12) [0.85]	0 (1.88) [1.88]	6
<b>Control (T2)</b>	5 (6.88) [0.51]	5 (3.12) [1.12]	10
<i>Total por columnas</i>	11	5	16

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 4.3636. El p-valor es 0.036714; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

	Puesta inducida	No puesta inducida	Total por filas
<b>Bajo (T1)</b>	0 (1.67) [1.67]	10 (8.33) [0.33]	10
<b>Bajo (T2)</b>	3 (1.33) [2.08]	5 (6.67) [0.42]	8
<i>Total por columnas</i>	3	15	18

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 4.5. El p-valor es 0.033895; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

**Anexo 1.2.** Valores de significación obtenidos al comparar las alteraciones histopatológicas entre los grupos de mejillones hembra del experimento de exposición. Las tablas a continuación proporcionan la siguiente información: el número de individuos de cada grupo en los que se ha observado o no la alteración, el número de individuos esperado ( ), y el valor del estadístico chi-cuadrado para cada grupo experimental [ ].

	Puesta inducida	No puesta inducida	Total por filas
<b>Alto (T1)</b>	0 (2.08) [2.08]	5 (2.92) [1.49]	5
<b>Alto (T2)</b>	5 (2.92) [1.49]	2 (4.08) [1.06]	7
<i>Total por columnas</i>	5	7	12

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 6.1224. El p-valor es 0.013348; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

	Atresia	No atresia	Total por filas
Alto (T1)	3 (1.25) [2.45]	2 (3.75) [0.82]	5
Alto (T2)	0 (1.75) [1.75]	7 (5.25) [0.58]	7
Total por columnas	3	9	12

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 5.6. El p-valor es 0.01796; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

	Puesta inducida	No puesta inducida	Total por filas
Control (T2)	0 (2.08) [2.08]	5 (2.92) [1.49]	5
Alto (T2)	5 (2.92) [1.49]	2 (4.08) [1.06]	7
Total por columnas	5	7	12

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 6.1224. El p-valor es 0.013348; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

**Anexo 2.1.** Valores de significación obtenidos al comparar las alteraciones histopatológicas entre los grupos de mejillones macho del experimento de inyección. Las tablas a continuación proporcionan la siguiente información: el número de individuos de cada grupo en los que se ha observado o no la alteración, el número de individuos esperado ( ), y el valor del estadístico chi-cuadrado para cada grupo experimental [ ].

	Parásitos	No parásitos	Total por filas
Control (T1)	0 (0.83) [0.83]	1 (0.17) [4.17]	1
Bajo (T1)	5 (4.17) [0.17]	0 (0.83) [0.83]	5
Total por columnas	5	1	6

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 6. El p-valor es 0.014306; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

	Parásitos	No parásitos	Total por filas
Control (T1)	0 (0.75) [0.75]	1 (0.25) [2.25]	1
Alto (T1)	3 (2.25) [0.25]	0 (0.75) [0.75]	3
Total por columnas	3	1	4

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 4. El p-valor es 0.0455; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$

**Anexo 2.2.** Valores de significación obtenidos al comparar las alteraciones histopatológicas entre los grupos de mejillones hembra del experimento de inyección. La tabla a continuación proporciona la siguiente información: el número de individuos de cada grupo en los que se ha observado o no la alteración, el número de individuos esperado ( ), y el valor del estadístico chi-cuadrado para cada grupo experimental [ ].

	<b>Necrosis</b>	<b>No necrosis</b>	<i>Total por filas</i>
<b>Bajo (T2)</b>	4 (2.4) [1.07]	0 (1.6) [1.6]	4
<b>Alto (T2)</b>	2 (3.6) [0.71]	4 (2.4) [1.07]	6
<i>Total por columnas</i>	6	4	10

El valor total del estadístico chi-cuadrado es 4.4444. El p-valor es 0.035015; por lo tanto, el resultado es significativo a un valor de  $p < 0.05$