Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos

Oropesa AL[*1,2], Moreno JJ[1,3], Gómez LJ[2,3]

[1]Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, Spain.
[2]INBIO G+C Research Institute, University of Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, Spain.
[3]Área de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, Spain.

Resumen: Los contaminantes emergentes son compuestos de diferente origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran parte inadvertidas. Son compuestos de los cuales se posee poca información sobre su impacto en los distintos compartimentos ambientales y que, por tanto, precisan investigación. El creciente énfasis en la evaluación y monitoreo de los contaminantes en los ecosistemas acuáticos ha revelado la necesidad de utilizar biomarcadores apropiados, siendo las lesiones histopatológicas una herramienta cada vez más utilizada. El presente trabajo recoge una revisión bibliográfica sobre la presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático, así como, de las lesiones histopatológicas originadas en peces como consecuencia de la exposición a estos compuestos. Se puede indicar que los fármacos son el grupo de contaminantes emergentes mayoritariamente detectado en el compartimento acuático (incluyendo aguas superficiales y sedimentos). Son el 17α-etinilestradiol (estrógeno sintético) y el nonilfenol (surfactante) los contaminantes emergentes más ampliamente estudiados en peces desde el punto de vista Histopatológico; y también se observa que existe predominancia de ciertas lesiones en cuanto al órgano estudiado y la exposición a determinados grupos de contaminantes emergentes. Por todo ello, se puede considerar a las lesiones histopatológicas como un buen biomarcador de exposición a contaminantes emergentes y de los efectos originados por ellos. Las lesiones histopatológicas pueden: alterar las funciones reguladas por los órganos afectados, las cuales están relacionadas con procesos biológicos importantes; reflejar cambios subclínicos originados por la exposición a bajas concentraciones de tóxicos (particularmente importante en el caso de los contaminantes emergentes) así como permanecer en el tiempo si las condiciones ambientales no varían.

Palabras claves: Contaminantes emergentes; Histopatología; Peces; Toxicidad.

Abstract: ***Histopathological lesions in fish caused by exposure to emerging pollutants: collecting and analysing data.***

Emerging pollutants are compounds of different origin a chemical nature, which a presence in the environment, or their posible consequences, have largely gone unnoticed. They are compounds of which relatively little is known about their impact in the different environmental compartments, therefore, they need investigation. The increasing emphasis on the assessment and monitoring of contaminants in the aquatic ecosystems has revealed the need to use appropiate biomarkers, being the histopathological lesions a tool increasingly used. In the current work a review of the literatura on the presence of the emerging pollutants in the aquatic compartment, as well as, of the histopathological lesions caused by exposure to these compounds in fish was performed. It can be indicated that pharmaceutical compounds are the group of emerging pollutants mainly detected in the quatic environment (including superficial water and sediments). 17α-ethinylestradiol (synthetic estrogen) and nonylphenol (surfactant) are the most widely emerging pollutants studied in fish from a Histopathological point of view; and also it is observed that there is a predominance of certain lesions in terms of the organ studied and exposure to certain groups of emerging pollutants. For all that, histopathological lesions can be considered as a good biomarker of exposure and effects of emerging pollutants. Histopathological lesions can: disturb functions regulated by the affected organs that can be related with important biological processes; reflect subclinical changes caused by exposure to low concentrations of toxics (paticularly important in the case of emerging pollutants) as well as remain in time if the environmental conditions do not vary.

Key words: Emergent pollutants; Fish; Histopathology; Toxicity.

Introducción

La presencia y los efectos tóxicos originados por los contaminantes emergentes (CEs) en el medio acuático constituyen un aspecto de interés global. El término "contaminantes emergentes" se refiere a aquellas sustancias químicas, naturales o sintéticas, que están liberándose continuamente a bajas concentraciones (generalmente del orden de µg/L o ng/L) al medio acuático, fundamentalmente a través de los efluentes de las estaciones de tratamiento de aguas residuales (ETARs), como consecuencia de su amplio uso humano, así como de su dificultad de degradación por los tratamientos aplicados en las ETARs. Se trata de sustancias que, por lo general, son ubicuas así como persistentes en el medio acuático, no existiendo en la actualidad criterios para su regulación destinados a proteger la salud humana y ambiental (Li et al., 2015).

Como indicábamos anteriormente, estos compuestos entran en el compartimento acuático principalmente a través de los efluentes de las ETARs, ya que son excretados por la orina o por las heces, también algunos de ellos son productos de uso doméstico, otros tienen origen hospitalario o incluso industrial y algunos son utilizados en acuicultura (Li et al., 2015).

Siguiendo las consideraciones realizadas por Blinova et al. (2010), Stuart et al. (2012) y Valcárcel et al. (2012), los CEs pueden clasificarse en los siguientes grupos: productos farmacéuticos, productos relacionados con el estilo de vida, productos de cuidado personal, surfactantes y drogas de abuso.

Metodología: estrategia de recolección de datos

Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica relacionada hasta Febrero de 2017 en las principales bases de datos: ISI Web of Knowledge, PubMed, Scopus y Google®Scholar. En relación a los parámetros de búsqueda, las palabras clave (keywords) empleadas durante la adquisición de datos incluyeron las siguientes: *concentration*, *surface water*, *sediment*, *emerging pollutants* y cada uno de los grupos (incluyendo los nombres de los compuestos) de CEs descritos en la clasificación (para elaborar el apartado de Concentración de contaminantes emergentes en aguas superficiales y sedimentos); cada uno de los tipos de CEs descritos en la clasificación, *histology* y *fish* (para elaborar el apartado de Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes). Estos términos fueron empleados en tándem usando operadores Boleanos. Se siguió el criterio de seguridad y relevancia de las fuentes consultadas. Se revisó literatura perteneciente a autores de países de los diferentes continentes, lo que indica el interés por esta temática. A pesar de haber realizado una búsqueda extensa, al tratarse de una temática tan amplia, puede haber artículos cuya información no haya sido recogida.

Concentración de contaminantes emergentes en aguas

*e-mail: aoropesa@unex.es

superficiales y sedimentos

La mejora en la sensibilidad de las técnicas analíticas ha permitido que los CEs, que anteriormente eran indetectables, estén siendo actualmente detectados en el ambiente acuático.

En esta revisión nos centramos en la contaminación por estas sustancias en el ambiente acuático, aguas superficiales y sedimentos, por tratarse dichas matrices de los principales reservorios de CEs, así como de las principales fuentes de exposición a ellos por parte de los organismos acuáticos.

En el material suplementario proporcionamos una tabla (Tabla S.1) que recoge las concentraciones de CEs detectadas en el medio acuático incluyendo aguas superficiales y sedimentos. A partir de la Tabla S.1 se ha elaborado la Figura 1 donde podemos indicar que el grupo de los fármacos constituye el tipo de CE más frecuentemente detectado en el medio acuático. Dentro de ellos, el grupo de fármacos con mayor frecuencia de detección en aguas superficiales son las hormonas, seguido de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antibacterianos y antilipémicos. En sedimentos también las hormonas constituyen el grupo mayoritario de CEs detectados más frecuentemente, seguido de los antibacterianos, AINEs y analgésicos.

En relación al nivel de hormonas detectadas en el medio acuático encontramos que el 17α-etinilestradiol es el compuesto hormonal más frecuentemente detectado, habiéndose encontrado una concentración máxima de 0.83 µg/L en agua en el arroyo Itchepackesassa, Florida, USA (Kolpin et al., 2002) y 22.8 ng/g en sedimentos del río Anoia, España, (López de Alda et al., 2002). La estrona, otra hormona ampliamente detectada en el medio acuático, ha sido encontrada a una concentración máxima de 0.11 µg/L en agua por Kolpin et al. (2002) y 21.6 ng/g en sedimentos del río Dagu, China, (Lei et al. 2009).

Dentro de la clase terapeútica de los AINEs se han detectado en el medio acuático ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno y ketoprofeno. El diclofenaco ha sido el compuesto detectado a la concentración más elevada, 18.74 µg/L en agua del río Llobregat, España, (Ginebreda et al., 2010), siendo el ibuprofeno el AINE detectado a una concentración más alta en sedimentos, 41.41 ng/g en el río Umgeni en Sudáfrica (Matongo et al., 2015).

En cuanto a los antibacterianos, el compuesto detectado con mayor frecuencia es el sulfametoxazol, encontrándose a una concentración máxima de 11.92 µg/L en agua del río Llobregat, España, (Ginebreda et al., 2010) y de 59 ng/g en sedimentos del río Haihe en China (Bu et al., 2013).

Analgésicos como el paracetamol han sido detectados a una máxima concentración de 10 µg/L en el río Santa Cruz en USA (Kolpin et al., 2002) y a 29 ng/g en sedimentos del lago Míchigan, USA, (Blair et al.,

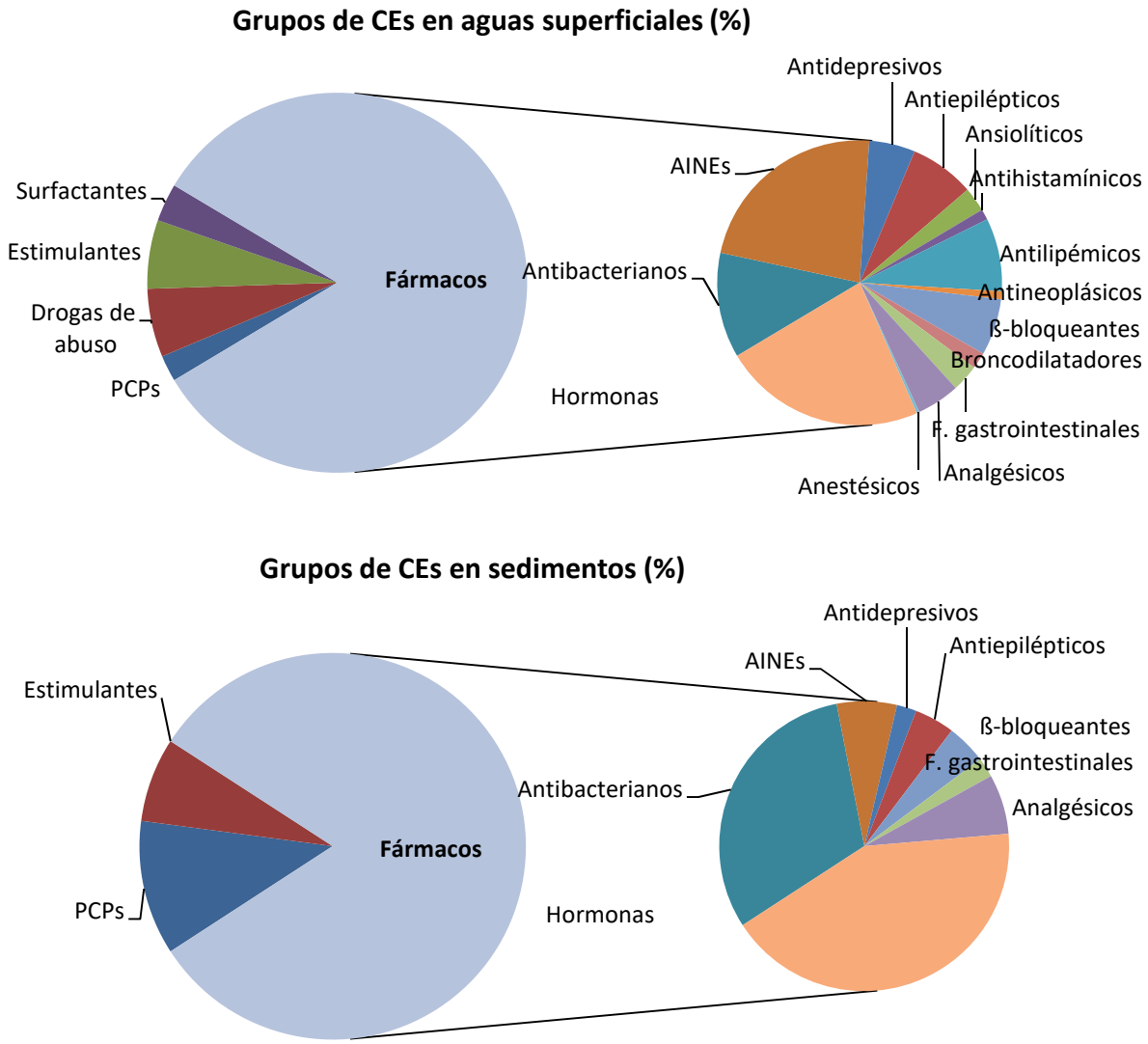

Figura 1: Grupos de Contaminantes Emergentes en aguas superficiales y sedimentos.

2013).

El principal antilipémico detectado en aguas superficiales es el gemfibrozilo, mostrando su máxima concentración (7.78 µg/L) en el río Llobregat, España, (Ginebreda et al., 2010).

Respecto a los antiepilépticos, el compuesto que encontramos en mayor proporción es la carbamazepina. La máxima concentración (3.09 µg/L) en aguas para este antiepiléptico se ha detectado en el río Llobregat, España, (Ginebreda et al., 2010) y en sedimentos (2.32 ng/g) en el río Umgeni en Sudáfrica (Matongo et al., 2015).

En relación con los β-bloqueantes, centramos nuestra atención sobre el atenolol, alcanzando una concentración máxima de 0.67 µg/L en aguas de los ríos Llobregat y Jarama, España, (Ginebreda et al., 2010; Martínez Bueno et al., 2010).

Las concentraciones más elevadas de antidepresivos en aguas superficiales se han detectado en ríos españoles, destacando la fluoxetina (0.07 µg/L) en el río Jarama (Fernández et al., 2010) y para el caso de los sedimentos se ha encontrado una concentración máxima de 20 ng/g en sedimentos del lago Míchigan, USA, (Blair et al., 2013).

Con respecto a los fármacos gastrointestinales, la ranitidina es el compuesto que se ha detectado con más frecuencia y a una concentración máxima de 1.94 µg/L en el río Jarama, España, (Valcárcel et al., 2011).

El principal representante del grupo de los fármacos ansiolíticos encontrado en el medio acuático es el diazepam, habiéndose detectado con una alta frecuencia y a una concentración máxima de 0.09 µg/L en el río Jarama, España, (Valcárcel et al., 2011).

El broncodilatador salbutamol ha sido encontrado a una concentración máxima de 0.03 µg/L en el río Guadarrama, España, (Valcárcel et al., 2011).

La loratadina, perteneciente al grupo terapeútico de los antihistamínicos, ha sido encontrada a una concentración máxima de 0.02 µg/L en los ríos Ebro y Jarama, España, (Gros et al. 2006, 2007; Valcárcel et al., 2011).

El antineoplásico ifosfamida ha sido detectado por Valcárcel et al. (2011) a una concentración máxima de 0.04 µg/L en el río Guadarrama, España.

La mepivacaína es un anestésico local con una elevada frecuencia de presentación en el río Jarama, España, habiéndose medido una concentración máxima de 0.35 µg/L (Valcárcel et al., 2011).

Resulta preocupante, desde el punto de vista de su consumo y consecuentes efectos en la salud humana, el elevado porcentaje de drogas de abuso detectadas en aguas superficiales, destacando especialmente los cocaínicos (cocaína y su metabolito principal benzoilecgonina). Se han detectado unas concentraciones máximas de 1.90 µg/L de benzoilecgonina y 0.67 µg/L de cocaína en el río Grote Molenbeek, Bélgica, (Gheorghe et al., 2007).

Dentro del grupo de los estimulantes (nicotina y cafeína y sus respectivos metabolitos cotinina y paraxantina) es la cafeína la que se ha detectado de una forma más frecuente y a una concentración máxima de 13.17 µg/L en aguas del río Manzanares, España, (Valcárcel et al., 2011) y 224.35 ng/g en sedimentos del río Umgeni en Sudáfrica (Matongo et al., 2015).

En cuanto a los surfactantes es el nonilfenol el compuesto que aparece de una forma más frecuente y a una concentración máxima de 40 µg/L en el río Santa Cruz, USA, (Kolpin et al., 2002).

Por último, dentro del grupo de los productos destinados al cuidado personal aparece de una forma frecuente en el medio acuático el repelente de insectos N,N-diethyl-toluamide (DEET) con una concentración máxima de 1.61 µg/L en agua en el río Big Blue, USA, (Bartelt-Hunt et al., 2009) y de 3.5 ng/g en sedimentos del río Zumbro, USA, (Fairbairn et al., 2015).

A partir de los datos recopilados sobre concentración de CEs en el medio acuático queda patente su presencia ubicua, estando asociados generalmente con la proximidad a grandes núcleos de población. Por ello, la detección de éstos se está utilizando como marcador químico de procesos de contaminación de origen antropogénico (Martinez Bueno et al., 2010).

Problemática ambiental de la presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático

La presencia, el destino y comportamiento de los CEs en el medio acuático ha sido reconocido como uno de los temas emergentes en Toxicología Ambiental (Hereber 2002; Fent et al., 2006; Kümmerer 2009; Ortiz de García et al., 2013).

La problemática ambiental de estas sustancias se deriva de algunas de sus características tales como su persistencia ambiental, consecuencia de su resistencia a la degradación por métodos bióticos o abióticos, su continua introducción en el medio acuático a través de los efluentes de las ETARs ya que en éstas no están implantados tratamientos físico-químicos y biológicos eficaces para su degradación (Hereber 2002; Gaffney et al. 2015). Algunos CEs poseen log Kow (coeficiente de partición octanol-agua) elevados con lo cual pueden bioacumularse en los tejidos de los organismos acuáticos (Hereber 2002; Fent et al., 2006; Santos et al., 2007; Gros et al., 2010).

Por otra parte, los CEs están constituidos por sustancias activas que poseen actividad biológica y, por lo tanto, pueden originar efectos tóxicos en los organismos acuáticos. Actualmente existe poca información en la literatura científica sobre los efectos tóxicos originados por estas sustancias, especialmente en lo que se refiere a los efectos subletales que son los que más probablemente se originen al estar sometidos los organismos a bajas concentraciones de CEs y de una forma continuada. Estos compuestos pueden causar alteraciones endocrinas, inmunes, metabólicas, histopatológicas, genéticas, alteraciones en los sistemas de defensa antioxidante, etc (Petrović et al., 2004; Abdelkader et al., 2012; Oropesa et al., 2013; Oropesa et al., 2014; Cuñat Zaira y Ruiz, 2016; Obimakinde et al., 2016; Oropesa et al., 2016; Oropesa et al., 2017). Por ello, es necesario investigar en este campo con el fin de que se pueda realizar una correcta evaluación de riesgo para la salud humana y ambiental. El resultado de estas evaluaciones permitirán a las agencias reguladoras establecer normas para la prevención o control de los riesgos originados por los CEs.

Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes

Los peces representan uno de los elementos clave para evaluar el estado ecológico del medio acuático ya que son unos buenos bioindicadores de la contaminación de dicho compartimento ambiental (Hermoso et al., 2010). Estos organismos pueden absorber los tóxicos directamente del medio que les rodea o bien ingerirlos a través del alimento. En peces teleósteos las branquias reflejan las concentraciones de tóxicos presentes en el agua, mientras que el hígado y el riñón son tejidos metabólicamente activos y pueden acumular estas sustancias.

La Histopatología es una ciencia que está basada en el examen microscópico de las células y los tejidos de un organismo, así como en la determinación cualitativa y cuantitativa de lesiones histológicas. Por ello, los estudios histopatológicos de los diferentes órganos de vertebrados e invertebrados son útiles para caracterizar su estado de salud y también para investigar los efectos adversos de los contaminantes ambientales sobre los mismos (Triebskorn et al., 1991; Braunbeck y Appelbaum, 1999; Schramm et al., 1999). Las características histopatológicas de órganos específicos expresan el impacto integrado a lo largo del tiempo provocado por los tóxicos en los organismos animales (Stebbing, 1985).

Los cambios histopatológicos aparecen como una respuesta de medio plazo a factores estresantes subletales, como puede ser la exposición

a tóxicos, y la Histología proporciona un método rápido para detectar los efectos de los contaminantes, especialmente los crónicos, en diversos tejidos y órganos (Johnson y Finley, 1980). Por todo lo indicado anteriormente, la Toxicología encuentra en la Histopatología una aliada ideal para caracterizar los procesos toxicológicos. De hecho, en la Estrategia Europea de Detección de Sustancias Activas Disruptoras Endocrinas se utiliza la Guía estandarizada (OECD nº 123, 2010) fundamentada en el examen histopatológico de las gónadas en peces como complemento a la evaluación de otros efectos originados por este tipo de sustancias. Algunos agentes disruptores endocrinos también son considerados CEs.

Basado en la relación entre ambas ciencias, en el presente trabajo realizamos una recopilación de las lesiones histopatológicas en diferentes órganos de peces originadas por la exposición a CEs. Tal información se encuentra recogida en la Tabla S.2 proporcionada en el material suplementario. A partir de dicha tabla se han elaborado diversas figuras (2-6) que sintetizan e interpretan la información recogida en la misma.

Podemos observar como el surfactante nonilfenol, compuesto orgánico relacionado con la familia de los alquilfenoles, y el 17α-etinilestradiol, estrógeno derivado del estradiol utilizado como anticonceptivo y como terapia de reemplazamiento estrogénico, son los CEs que originan lesiones histopatológicas en diferentes órganos de peces que, hasta la fecha, han sido los más ampliamente estudiados (Gray et al., 1997; Schwaiger et al., 2000; Kwak et al., 2001; Weber et al., 2002; Örn et al., 2003; Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Zha et al., 2007; Kaptaner et al., 2010; Velasco-Santa María et al., 2010; Sridevi et al., 2013; Oropesa et al., 2013; Depiereux et al., 2014; Oropesa et al., 2014; Traversi et al., 2014; El-Sayed Ali et al., 2014; Liu et al., 2014; Abdel-Moneim et al., 2015; Luzio et al., 2016; Shirdel et al., 2016). Tras estos compuestos aparece el diclofenaco, fármaco perteneciente a la familia de los AINEs, como uno de los CEs más frecuentemente estudiados (Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Triebskorn et al., 2007; Mehinto et al., 2010; Memmert et al., 2013; Gröner et al., 2016).

En la figura 2 podemos observar cómo afectan los grupos de CEs a los diferentes órganos en los peces, comprobando como los compuestos hormonales y los surfactantes alteran de forma importante a las gónadas (testículos y ovarios) (Gray et al., 1997; Kwak et al., 2001; Zaroongian et al., 2001; Weber et al., 2002; Örn et al., 2003; Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Zha et al., 2007; Cripe et al., 2010; Kaptaner et al., 2010; Velasco-Santa María et al., 2010; Blüthgen et al., 2013; Sridevi et al., 2013; El-Sayed Ali et al., 2014; Depiereux et al., 2014; Liu et al., 2014; Oropesa et al., 2014; Abdel-Moneim et al., 2015; Shen et al., 2015; Zhao et al., 2015; Luzio et al., 2016). El resultado es lógico en el caso de los compuestos hormonales pero resulta más sorprendente en el caso de los surfactantes. Este hecho se debe a que surfactantes tales como el nonilfenol y octilfenol han sido catalogados como compuestos disruptores endocrinos que actúan como análogos hormonales (Traversi et al., 2014). En cuanto al grupo de los fármacos, los órganos diana son el hígado, riñón y las branquias (Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Khalil et al., 2007; Triebskorn et al., 2007; Mehinto et al., 2010; Galus et al., 2013; Memmert et al., 2013; Gröner et al., 2016; Steinbach et al., 2016).

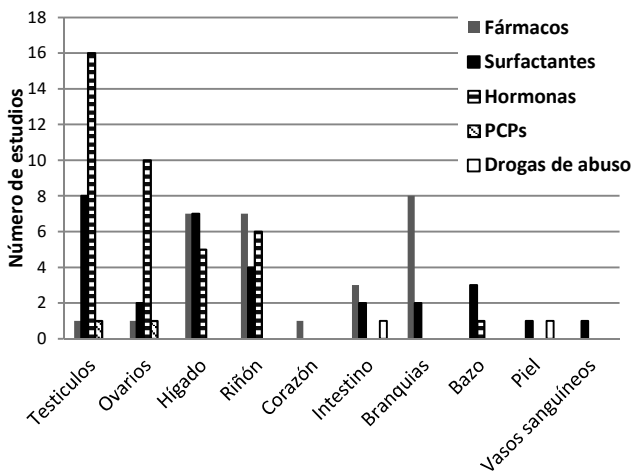

Figura 2: Afección de órganos en peces por exposición a diferentes grupos de contaminantes emergentes.

Centrándonos en las lesiones observadas en los peces podemos concluir que existe cierto predominio de algunas patologías a nivel de determinados órganos originadas por diferentes grupos de CEs (Figs. 3–6).

A partir de la Fig. 3 podemos indicar que las lesiones que aparecen más frecuentemente en los testículos como consecuencia de la exposición de peces a CEs son fenómenos de ovo-testis (presencia de ovocitos en el tejido testicular) (Zha et al., 2007; Cripe et al., 2010; Kaptaner et al., 2010; Depiereux et al., 2014; Abdel-Moneim et al., 2015; Shen et al., 2015), desarrollo de quistes espermáticos (colección de células espermáticas en localizaciones no habituales) (Zaroongian et al., 2001; Velasco-Santa María et al., 2010; Oropesa et al., 2014), necrosis (conjunto de cambios celulares tras la muerte celular por digestión de sus componentes) de células germinales (Kwak et al., 2001; Mehinto et al., 2010; Velasco-Santa María et al., 2010) y fenómenos de fibrosis (reemplazamiento del tejido necrótico por tejido conectivo fibroso) (Weber et al., 2002; Weber et al., 2003; Kaptaner et al., 2010; Velasco-Santa María et al., 2010). Se observa una mayor afectación en los testículos como consecuencia de la exposición a surfactantes y hormonas (Gray et al., 1997; Kwak et al., 2001; Zaroongian et al., 2001; Weber et al., 2002; Örn et al., 2003; Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Zha et al., 2007; Cripe et al., 2010; Kaptaner et al., 2010; Velasco-Santa María et al., 2010; Depiereux et al., 2014; El-Sayed Ali et al., 2014; Liu et al., 2014; Oropesa et al., 2014; Abdel-Moneim et al., 2015; Shen et al., 2015; Zhao et al., 2015; Luzio et al., 2016). En los ovarios la lesión predominante es la atresia folicular (cambio patológico consistente en destrucción del folículo y muerte del ovocito, normalmente por falta de estimulación hormonal) (Blüthgen et al., 2013; Sridevi et al., 2013) seguida de variaciones en el tamaño de los mismos (Cripe et al., 2010; Zhao et al., 2015), siendo las hormonas los CEs que originan el mayor número de lesiones en este órgano (Örn et al., 2003; Weber et al., 2003; Zha et al., 2007; Cripe et al., 2010; Kaptaner et al., 2010; Blüthgen et al., 2013; Sridevi et al., 2013; Liu et al., 2014; Zhao et al., 2015; Luzio et al., 2016) (Fig. 4). Las lesiones en las gónadas pueden originar disturbios en la reproducción tales como alteración en la espermatogénesis y ovogénesis que a su vez pueden repercutir en la fertilización y también producir cambios en el ratio sexual. Todo ello podría generar a largo plazo un efecto negativo en la dinámica poblacional de las especies expuestas.

La exposición de peces a CEs origina una presencia importante de material de membrana en el citoplasma de los hepatocitos (restos de membrana en el interior de los hepatocitos para su posterior digestión) (Triebskorn et al., 2007), necrosis (Zaroogian et al.,2001; Khalil et al., 2007; Du et al., 2008), degeneración glucogénica (alteración de la célula debido a una anormal acumulación de glucógeno) (Schwaiger et al., 2000; Pawlowski et al., 2004; Triebskorn et al., 2007; Zha et al., 2007; Galus et al., 2013) e hipertrofia (aumento del tamaño celular) de los hepatocitos (Schwaiger et al., 2000; Zaroogian et al., 2001; Zha et al., 2007; Du et al., 2008), además de aumento en el número de macrófagos (Triebskorn et al., 2007; Traversi et al., 2014) (Fig. 5). Se observa una mayor afectación en hígado como consecuencia de la exposición a fármacos y hormonas (Schwaiger et al., 2000; Zaroogian et al., 2001; Weber et al., 2003; Pawlowski et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Khalil et al., 2007; Triebskorn et al., 2007; Zha et al., 2007; Galus et al., 2013). El hígado es un órgano que recibe un gran aporte sanguíneo, lo que supone una alta exposición a tóxicos

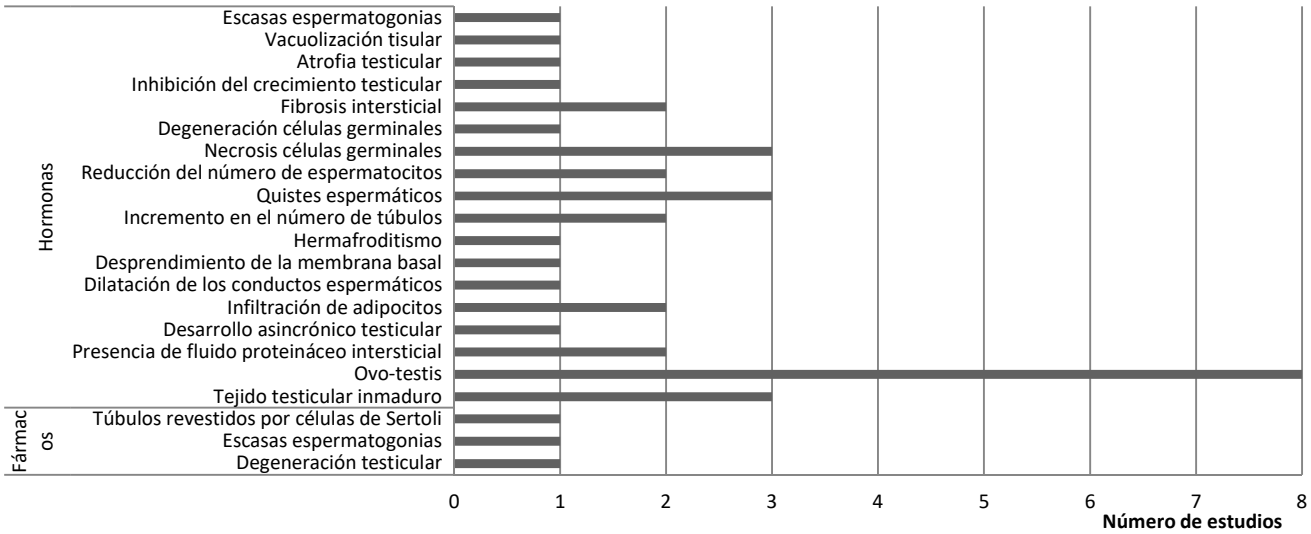

Figura 3: Lesiones en testículos de peces ocasionadas por la exposición a hormonas y fármacos.

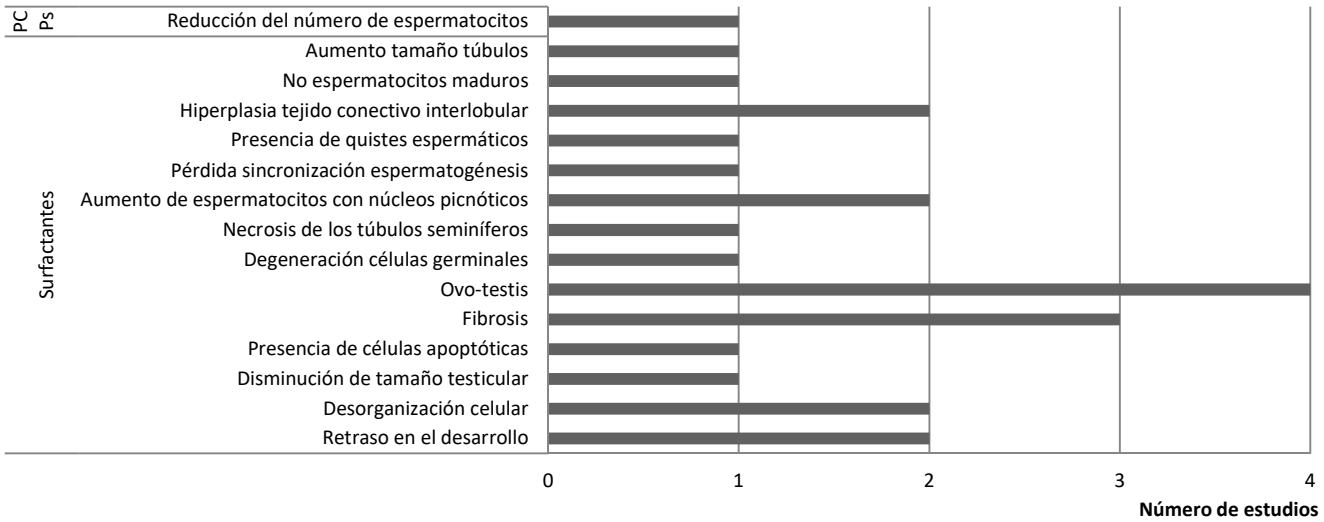

Figura 3 (continuación). Lesiones en testículos de peces ocasionadas por la exposición a productos de cuidado personal y surfactantes.

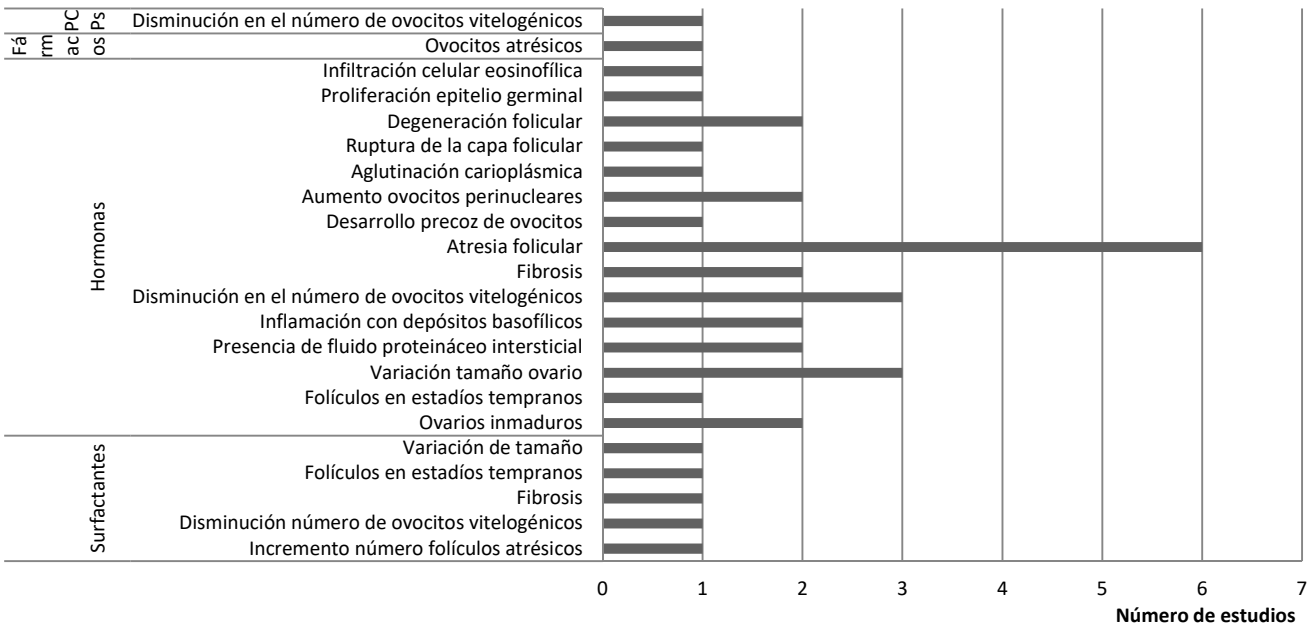

Figura 4. Lesiones en ovarios de peces ocasionadas por la exposición a contaminantes emergentes (PCPs, fármacos, hormonas y surfactantes).

.

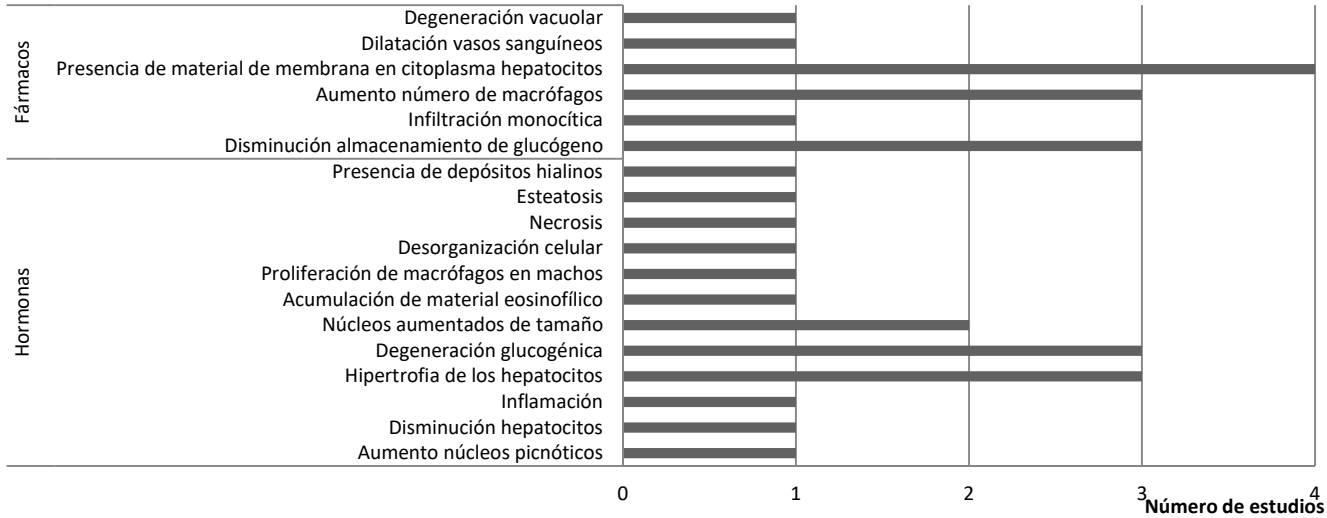

Figura 5: Lesiones en hígado de peces ocasionadas por la exposición a contaminantes emergentes (fármacos y hormonas).

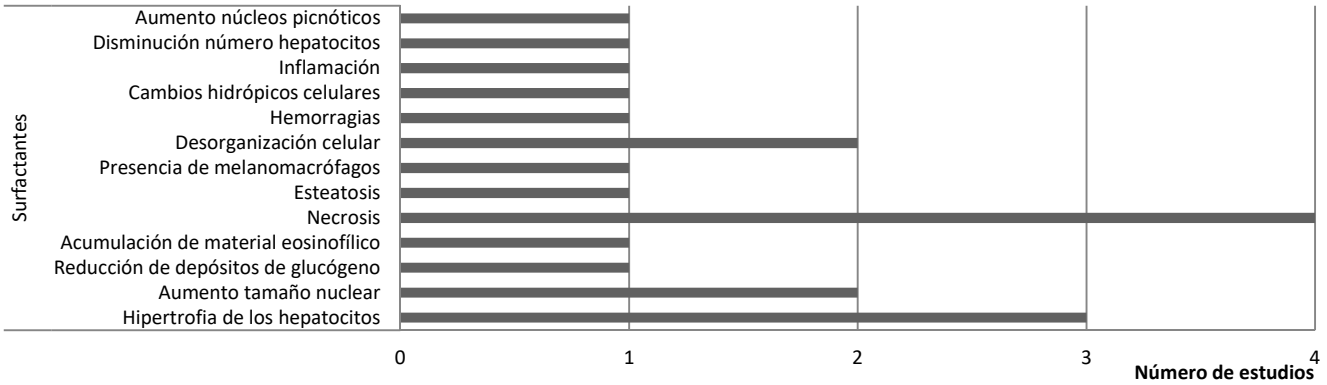

Figura 5 (continuación). Lesiones en hígado de peces ocasionadas por la exposición a contaminantes emergentes (fármacos y hormonas).

.

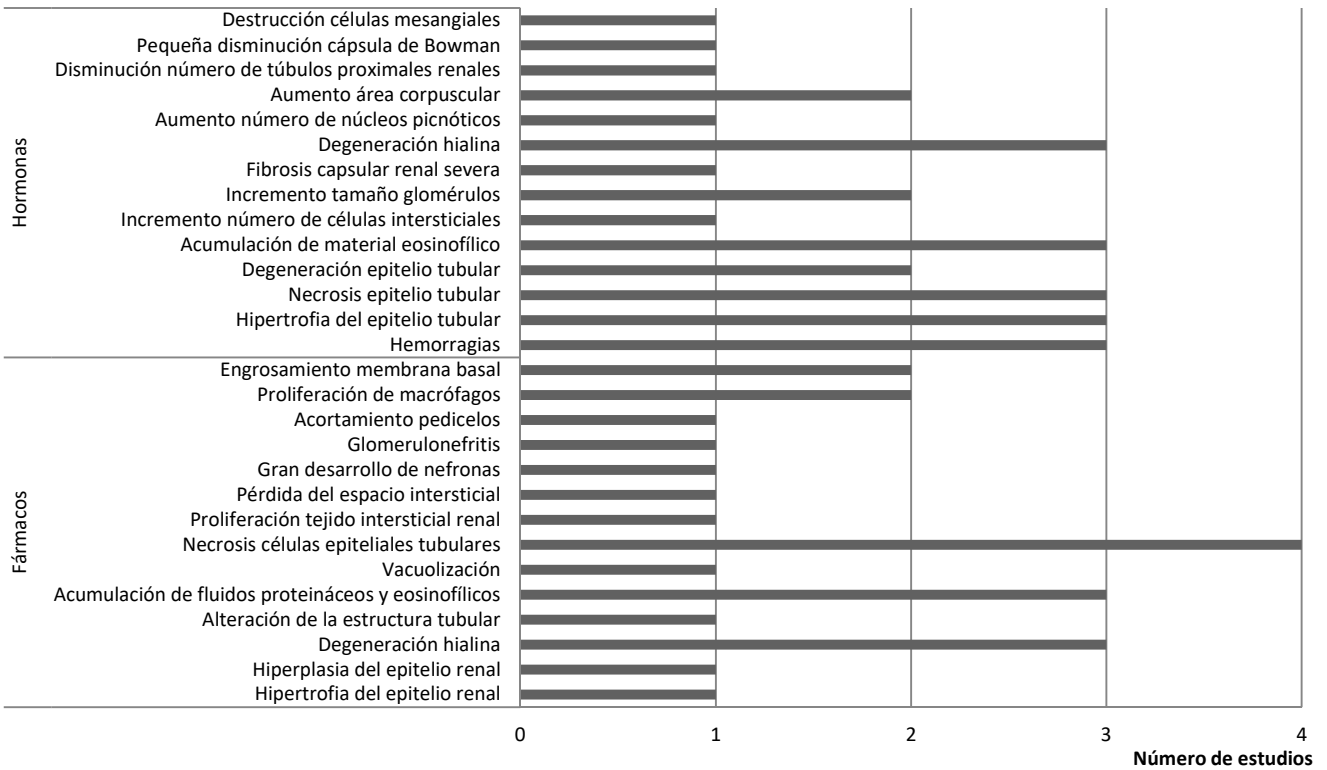

Figura 6: Lesiones en riñón de peces ocasionadas por la exposición a contaminantes emergentes (hormonas y fármacos)

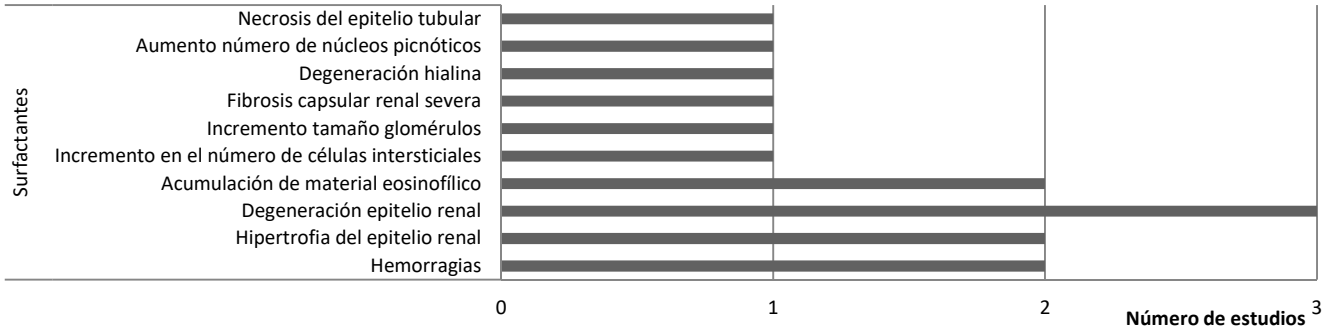

Figura 6 (continuación): Lesiones en riñón de peces ocasionadas por la exposición a contaminantes emergentes (surfactantes).

interviene en la metabolización y detoxificación de las sustancias químicas (Salamat y Zarie, 2012); por tanto, tales funciones pueden verse afectadas como consecuencia de las lesiones originadas tras la exposición a CEs. De hecho, Olufayo y Alade (2012) consideran que los fenómenos de necrosis pueden ser el resultado del excesivo trabajo de detoxificación realizado por el hígado. Otras funciones que también podrían verse alteradas son la síntesis de proteínas y el metabolismo de las grasas (Arellano et al,. 1999).

El riñón, al igual que el hígado, recibe un gran aporte de sangre post-branquial que vehicula los tóxicos. Por lo tanto, las lesiones renales pueden ser un buen biomarcador de la polución ambiental. Las principales lesiones encontradas en riñón de peces tras la exposición a CEs son: necrosis celular en los epitelios tubulares (Schwaiger et al., 2000; Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Triebskorn et al., 2007; Zha et al., 2007; Mehinto et al., 2010; Oropesa et al., 2013), degeneración hialina (alteración patológica de diferentes elementos tisulares adquiriendo un aspecto homogéneo y eosinófilo) (Weber et al., 2003; Schwaiger et al., 2004; Triebskorn et al., 2007; Oropesa et al., 2013), acumulación de fluidos proteináceos y eosinófilos (Galus et al., 2013), así como hemorragias (Schwaiger et al., 2000; Oropesa et al., 2013) (Fig. 6). Se observa una mayor afectación en riñón como consecuencia de la exposición a fármacos y hormonas (Schwaiger et al., 2000; Zaroogian et al., 2001; Weber et al., 2003; Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Triebskorn et al., 2007; Zha et al., 2007; Mehinto et al., 2010; Galus et al., 2013; Oropesa et al., 2013; Villeret et al., 2013). El riñón, junto con las branquias y el intestino, participa en el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales (Cengiz, 2006) y, además de producir orina, interviene en la excreción de los tóxicos y sus metabolitos (Hinton et al., 1992). Tales funciones de osmorregulación y de excreción pueden verse alteradas como consecuencia de las lesiones originadas en este órgano debido a la exposición de los peces a CEs.

En cuanto a las branquias, las lesiones que aparecen de una forma más frecuente son: descamación epitelial (Triebskorn et al., 2007; Gröner et al., 2016; Shirdel et al., 2016), hipertrofia e hiperplasia (aumento del número de células) de células cloruro y mucosas (Hoeger et al., 2005; Triebskorn et al., 2007; Memmert et al., 2013; Gröner et al., 2016; Shirdel et al., 2016) que conducen a un incremento en el área interlamelar y a la fusión de las laminillas branquiales (siendo éste un mecanismo de defensa para incrementar la barrera de contacto de los tóxicos con el torrente sanguíneo, Cengiz, 2006), telangiectasia (severa alteración en el sistema venoso como resultado de la vasodilatación, colapso de las células pilares y ruptura de la integridad vascular) (Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005) y necrosis (Schwaiger et al., 2004; Triebskorn et al., 2007). Los fármacos constituyen el grupo de CEs que originan mayoritariamente las lesiones citadas (Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Triebskorn et al., 2007; Memmert et al., 2013; Gröner et al., 2016; Shirdel et al., 2016). Por tanto, la función respiratoria y de mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico pueden verse seriamente afectadas en peces tras la exposición a estos compuestos.

Las lesiones en otros órganos como bazo (hipertrofia e hiperplasia de células retículoendoteliales, hemorragias, presencia de material eosinófilo) (Rosety et al., 1997; Schwaiger et al., 2000; Du et al., 2008) corazón (inflamación y procesos edematosos, hemorragias, necrosis de células endoteliales) (Steinbach et al., 2016), intestino (hiperplasia e hipertrofia de las células caliciformes; hiperplasia, fusión y necrosis de vellosidades) (Ribelles et al., 1995; Khalil et al., 2007; Mehinto et al., 2010; El-Sayed Ali et al., 2014; Gay et al., 2016; Gürcü et al., 2016; Shirdel et al., 2016), piel (incremento en el espesor de la dermis, disminución del número y tamaño de las células mucosas) (Zeni y Caligiuri, 1992; Gay et al., 2016) y vasos sanguíneos (dilatación y elongación) (Zeni y Caligiuri, 1992) no pueden considerarse representativas desde un punto de vista lesional debido a los escasos artículos que encontramos en relación a este tema.

En la mayoría de los estudios revisados los ensayos de toxicidad realizados son sub-crónicos originando por tanto efectos sub-letales, en este caso lesiones, que si bien no originan la muerte de los peces, sí que se considera que ciertas funciones fisiológicas reguladas por los órganos lesionados se pueden ver afectadas.

Conclusiones

Podemos considerar a las lesiones histopatológicas como un buen biomarcador de exposición a CEs y de los efectos originados por ellos. Las lesiones histopatológicas pueden: alterar las funciones reguladas por los órganos afectados, las cuales están relacionadas con procesos biológicos importantes; reflejar cambios subclínicos originados por la exposición a bajas concentraciones de tóxicos (particularmente importante en el caso de los CEs) así como permanecer en el tiempo si las condiciones ambientales no varían.

Apéndice A. Datos suplementarios

Los datos suplementarios (Tabla S.1 y Tabla S.2) relacionados con este artículo pueden ser encontrados en el archivo DS_Oropesa et al.

Bibliografía

1. Abdel-Moneim A, Mahapatra CT, Hatef A, Sepúlveda MS. Ovarian structure protein 1: a sensitive molecular biomarker of gonadal intersex in female Japanese medaka after androgen exposure. Environ. Toxicol. Chem. 2015; 34(9): 2087-2094.

2. Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, Solea senegalensis. Ecotoxicol. Environ. Safe. 1999; 44(1): 62-72.

3. Bartelt-Hunt S, Snow D, Damon T, Shockley J, Hoagland K. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. Environ.l Pollut. 2009; 157(3): 786-791.

4. Blair BD, Crago JP, Hedman CJ, Klaper RD. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. Chemosphere. 2013; 93: 2116-2123.

5. Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A.

Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environ. Pollut. 2010; 158(1): 41-47.

6. Blüthgen N, Castiglionic S, Sumpterd JP, Fent K. Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (Danio rerio): Reproductive and early developmental effects. Aqua. Toxicol. 2013; 144-145: 83-95.

7. Braunbeck T, Appelbaum S. Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp Cyprinus carpio induced orally by ultra-low doses of endosulfan. Dis. Aquat. Organ. 1999; 36: 183-200.

8. Bu Q, Wang B, Huang J, Deng S, Yu G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. J. Hazard. Mater. 2013; 262: 189-211.

9. Cengiz EI. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish Cyprinus carpio after acute exposure to deltamethrin. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2006; 22(2): 200-204.

10. Cripe G, Hemmer B, Raimondo S, Goodman L, Kulaw D. Exposure of three generations of the estuarine sheepshead minnow (Cyprinodon variegatus) to the androgen, 17β-trenbolone: Effects on survival, development, and reproduction. Environ. Toxicol. Chem. 2010; 29(9): 2079-2087.

11. Cuñat Zaira A, Ruiz MJ. Ensayos de ecotoxicidad de los fármacos y efectos tóxicos en el medio ambiente: Revisión. Rev. Toxicol. 2016; 33: 108-119.

12. Depiereux S, Liagre M, Danis L, De Meulder B, Depiereux E, Segner H, Kestemont P. Intersex occurrence in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) male fry chronically exposed to ethynylestradiol. PLoS ONE. 2014; 9(7): e98531.

13. Du YB, Li YY, Zhen YJ, Hu CB, Liu WH, Chen WZ, Sun ZW. Toxic effects in siganus oramin by dietary exposure to 4-tert-cctylphenol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2008; 80: 534-538.Fairbairn DJ, Karpuzcu ME, Arnold WA, Barber BL, Kaufenberg EF, Koskinen WC, Novak PJ, Rice PJ, Swackhamer DL. Sediment–water distribution of contaminants of emerging concern in a mixed use watershed. Sci. Total Environ. 2015; 505: 896-904.

14. Fent K, Weston A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 2006; 76(2):122-159.

15. Fernández C, González-Doncel M, Pro J, Carbonell G, Tarazona J. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. Sci. Total Environ. 2010; 408(3): 543-551.

16. Galus M, Kirischian N, Higgins S, Purdy J, Chow J, Rangaranjan S, Li H, Metcalfe C, Wilson J. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. Aquat. Toxicol. 2013; 132-133: 200-211.

17. Gaffney VJ, Almeida CMM, Rodrigues A, Ferreira E, Benoliel MJ, Cardoso VV. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. Water Res. 2015; 72: 199-208.

18. Gay F, Ferrandino I, Monaco A, Cerulo M, Capasso G, Capaldo A. Histological and hormonal changes in the European eel (Anguilla anguilla) after exposure to environmental cocaine concentration. J. Fish Dis. 2016; 39: 295-308.

19. Gheorghe A, van Nuijs A, Pecceu B, Bervoets L, Jorens P, Blust R, Neels H, Covaci A. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 391(4):1309-1319.

20. Ginebreda A, Muñoz I, de Alda M, Brix R, López-Doval J, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). Environ. Int. 2010; 36(2): 153-162.

21. Gray M. Metcalfe C. Induction of testis-ova in Japanese medaka (Oryzias latipes) exposed to p-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem. 1997; 16(5): 1082-1086.

22. Gröner F, Höhne C, Kleiner W, Kloas W. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in nile tilapia (Oreochromis niloticus). Chemosphere. 2017; 166: 473-481.

23. Gros M, Petrović M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta. 2006; 70(4): 678-690.

24. Gros M, Petrović M, Barceló D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (northeast Spain). Environ. Toxicol. Chem. 2007; 26(8): 1553-1562.

25. Gros M, Petrović M, Ginebreda A, Barceló D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. Environ. Int. 2010; 36(1): 15-26.

26. Gürcü B, Koca Y, Özkut M, Tuğlu M. Matrix changes due to the toxic effects of metronidazole in intestinal tissue of fish (Onchorhynchus mykiss). Chemosphere. 2016; 144: 1605-1610.

27. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicol. Let. 2002; 131(1-2): 5-17.

28. Hermoso V, Clavero M, Blanco-Garrido F, Prenda J. Assessing the ecological status in species-poor systems: A fish-based index for Mediterranean Rivers (Guadiana River, SW Spain). – Ecol. Indic. 2010; 10(6): 1152-1161.

29. Hinton DE, Baumann PC, Gardner GR, Hawkins WE, Hendricks JD, Murchelano RA, Okihiro MS. Histopathologic biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. En: Biomarkers. Lewis Publishers, Boca Raton. 1992. p. 155-209.

30. Hoeger B, Köllner B, Dietrich D, Hitzfeld B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (Salmo trutta f. fario). Aquat. Toxicol. 2005; 75(1): 53-64.

31. Johnson W, Finley M. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. 1st ed. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service. 1980.

32. Kaptaner, B. y Ünal, G. Effects of 17α-ethynylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in Chalcalburnus tarichi. Environ. Toxicol. 2010. 26(6): 610-622.Khalil W, Mahmoud M, Zahran M, Mahrous K. A sub-acute study of metronidazole toxicity assessed in egyptian Tilapia zillii. J. Appl.Toxicol. 2007; 27(4):380-390.

33. Kolpin D, Furlong E, Meyer M, Thurman E, Zaugg S, Barber L, Buxton H. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 2002; 36(6): 1202-1211.

34. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere. (2009); 75(4): 417-434.

35. Kwak H, Bae M, Lee M, Lee Y, Lee B, Kang K, Chae C, Sung H, Shin J, Kim J, Mar W, Sheen Y, Cho M. Effects of nonylphenol,

bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (Xiphophorus helleri). Environ. Toxicol. Chem. 2001; 20(4): 787-795.

36. Lei B, Huang S, Zhou Y, Wang D, Wang Z. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. Chemosphere. 2009; 76(1): 36-42.

37. Li H, Dong Z, Weng Q, Chang C, Liu B. Emerging pollutants – Part I: Occurrence, fate and transport. Water Environ. Res. 2015; 87(10): 1849-1872.

38. López de Alda MJ, Gil A, Paz E, Barceló D. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry. Analyst. 2002; 127: 1299-1304.

39. Liu S, Wang L, Qin F, Zheng Y, Li M, Zhang Y, Yuan C, Wang Z., Gonadal development and transcript profiling of steroidogenic enzymes in response to 17 α-methyltestosterone in the rare minnow Gobiocypris rarus. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2014; 143: 223-232.

40. Martínez Bueno M, Hernando M, Herrera S, Gómez M, Fernández-Alba A, Bustamante I, García-Calvo E. Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. Int. J. Environ. An. Ch. 2010; 90(3-6): 321-343.

41. Matongo S, Birungi G, Moodley B, Ndungu P. Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. Environ. Sci. Pollut. Res. 2015; 22: 10298-10308.

42. Mehinto A, Hill E, Tyler C. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environ. Sci. Technol. 2010; 44(6): 2176-2182.

43. Memmert, U., Peither, A., Burri, R., Weber, K., Schmidt, T., Sumpter, J. y Hartmann, A. (2013). Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. Environmental Toxicology and Chemistry, 32(2), pp.442-452.

44. Mohamed FAS. Histopathological studies on Tilapia zillii and Solea vulgaris from Lake Qarun, Egypt. - World Journal of Fish and Marine Sciences. 2009; 1(1): 29-39.

45. Obimakinde S, Patok, O, Opeolu B, Olatunji O. Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update. Environ. Sci. Pollut. Res. 2017; 24(4): 3274-3297.

46. OECD Environment, Health and Safety Publications. Guidance document on the diagnosis of endocrine-related Histopathology in fish gonads. Series on testing and assessment. No 123. 2010. Paris.

47. Olufayo, M.O., Alade, O.H. Acute toxicity and histological changes in gills, liver and kidney of catfish, Heterobranchus bidorsalis exposed to cypermethrin concentration. – Afr. J. Agr. Res. 2012; 7(31): 4453-4459.

48. Örn S, Holbech H, Madsen T, Norrgren L, Petersen G. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. Aquat. Toxicol. 2003; 65(4): 397-411.

49. Oropesa A, Jiménez B, Fallola C, Pula H, Cuesta J, Gómez L. Histological alterations on the structure of the excretory renal system in tench (Tinca tinca) after exposure to 17-alpha-ethynylestradiol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013; 91(6): 623-629.

50. Oropesa A, Jiménez B, Gil M, Osswald J, Fallola C, Pula H, Cuesta J, Gómez L. Histological alterations in the structure of the testis in tench (Tinca tinca) after exposure to 17 alpha-ethynylestradiol. Environ. Toxicol. 2014; 29(10): 1182-1192.

51. Oropesa A, Floro A, Palma P. Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of Daphnia magna. Environ. Sci. Pollut. Res. 2016; 23(17): 17311-17321.

52. Oropesa A, Novais S, Lemos M, Espejo A, Gravato C, Beltrán F. Oxidative stress responses of Daphnia magna exposed to effluents spiked with emerging contaminants under ozonation and advanced oxidation processes. Environ. Sci. Pollut. Res. 2017; 24(2): 1735-1747.

53. Ortiz de García S, Pinto Pinto G, García-Encina P, Irusta-Mata R. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. Ecotoxicology. 2014; 23(8): 1517-1533.

54. Pawlowski S, van Aerle R, Tyler C, Braunbeck T. Effects of 17α-ethinylestradiol in a fathead minnow (Pimephales promelas) gonadal recrudescence assay. Ecotoxicol. Environ. Safe. 2004; 57(3): 330-345.

55. Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda M, Barceló, D. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. Anal. Bioana. Chem. 2004; 378(3): 549-562.

56. Ribelles A, Carrasco MC, Rosety M, Aldana M. A histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulfate on the intestine of the gilthead seabream, Sparus aurata L. Ecotoxicol. Environ. Safe. 1995; 32(2): 131-138.

57. Rosety M, Ribelles A, Carrasco C. A morphological study in the kidney and spleen of gilthead, Sparus aurata, L., caused by sodium dodecyl sulphate. Histol. Histopathol. 1997; 12(4): 925-929.

58. Salamat N, Zarie M. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: A Review. - World Journal of Fish and Marine Sciences. 2012; 4(3): 223-231.

59. Santos J, Aparicio I, Alonso E. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). Environ. Int. 2007; 33(4): 596-601.

60. Schramm M, Muller E, Triebskorn R. Brown trout (Salmo trutta f. Fario) liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. Biomarkers. 1998; 3(2): 93-108.

61. Schramm M, Behrens AW, Braunbeck T, Eckert H, Köhler HR, Konradt J. Celullar histological and biochemical biomarkers. En: Retrospective Collection. Trans Tech Publications. 1999. p. 33-64.

62. She, ZG, Fan QX, Yang W, Zhang YL, Wang HP. Effects of 17α-methyltestosterone and aromatase inhibitor letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco. Biol. Bull. 2015; 228(2): 108-117.

63. Shirde, I, Kalbassi M. Effects of nonylphenol on key hormonal balances and histopathology of the endangered Caspian brown trout (Salmo trutta caspius). Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2016); 183-184: 28-35.

64. Stebbing A.R.D. A posible synthesis. En: B.L. Bayne. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York. 1985.

65. Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. Sci. Total Environ. 2012; 416: 1-21.

66. Schwaiger J, Spieser O, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele R.. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in

juvenile Common carp (Cyprinus carpio). Aquat. Toxicol. 2000; 51(1): 69-78.

67. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele R. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Aquat. Toxicol. 2004; 68(2): 141-150.

68. Shirdel I, Kalbassi M. Effects of nonylphenol on key hormonal balances and histopathology of the endangered Caspian brown trout (Salmo trutta caspius). Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2016; 183-184: 28-35.

69. Sridevi P, Chaitanya R, Prathibha Y, Balakrishna S, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B. Early exposure of 17α-ethynylestradiol and diethylstilbestrol induces morphological changes and alters ovarian steroidogenic pathway enzyme gene expression in catfish, Clarias gariepinus. Environ. Toxicol. 2013; 30(4): 439-451.

70. Steinbach C, Kroupova H, Wahli T, Klicnarová J, Schmidt-Posthaus H. Histopathological alterations of the heart in fish: proposal for a standardized assessment. Dis. Aquat. Organ. 2016; 118(3): 185-194.

71. Traversi I, Gioacchini G, Scorolli A, Mita D, Carnevali O, Mandich A. Alkylphenolic contaminants in the diet: Sparus aurata juveniles hepatic response. Gen. Comp. Endocr. 2014; 205: 185-196.

72. Triebskorn R, Köhler HR, Zahn T, Vogt G, Ludwig M, Rumpf S, Kratzmann M, Alberti G, Storch V. Invertebrate cells as targets for hazardous substances. Z. Angew. Zool. 1991; 78: 277-287.

73. Triebskorn R, Casper H Scheil V, y Schwaiger, J. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine , clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and common carp (Cyprinus carpio). Anal. Bioanal.l Chem. 2007; 387(4): 1405-1416.

74. Valcárcel Y, González Alonso S, Rodríguez-Gil J, Gil A, Catalá, M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. Chemosphere. 2011; 84(10): 1336-1348.

75. Valcárcel Y, Martínez F, González-Alonso S, Segura Y, Catalá M, Molina R, Montero-Rubio J, Mastroianni N, López de Alda M, Postigo C, Barceló D. Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. Environ. Int. 2012; 41: 35-43.

76. Velasco-Santamaría Y, Bjerregaard P, Korsgaard B. Gonadal alterations in male eelpout (Zoarces viviparus) exposed to ethinylestradiol and trenbolone separately or in combination. Marin. Environ. Res. 2010; 69: S67-S69.

77. Villeret M, Jolly, Wiest L, Vulliet E, Bado-Nilles A, Porcher J, Betoulle S, Minier C, Sanchez W. A potential biomarker of androgen exposure in European bullhead (Cottus sp.) kidney. Fish Physiol. Biochem. 2012 39(3): 573-580.

78. Weber L, Kiparissis Y, Hwang G, Niimi A, Janz D, Metcalfe C. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (Oryzias latipes). Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2002; 131(1): 51-59.

79. Weber L, Hill R, Janz D. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (Danio rerio): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. Aquat. Toxicol. 2003; 63(4): 431-446.

80. Zaroogian G, Gardner G, Borsay Horowitz D, Gutjahr-Gobell R, Haebler R, Mills L. Effect of 17β-estradiol, o,p′-DDT, octylphenol and p,p′-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (Paralichthys dentatus). Aquat. Toxicol. 2001; 54(1-2): 101-112.

81. Zeni C, Caligiuri AS. Morphological and ultrastructural changes induced by sublethal concentrations of an anionic detergent on Ictalurus species barbel taste buds. Microbios. 1992; 69(278): 41-52.

82. Zha J, Wang Z, Wang N, Ingersoll C. Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (Gobiocypris rarus) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. Chemosphere. 2007; 66(3): 488-495.

83. Zhao Y, Castiglioni S, Fent K. Synthetic progestins medroxyprogesterone acetate and dydrogesterone and their binary mixtures adversely affect reproduction and lead to histological and transcriptional alterations in zebrafish (Danio rerio). Environ. Sci. Technol. 2015; 49(7):