



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

## **Tesis doctoral**

**“Evaluación del estado de salud de peces marinos expuestos a contaminación  
antrópica. La histopatología como herramienta diagnóstica”**

Méd. Vet. Gabriela N. Novacovsky

Directoras: Dra. María Cruz Sueiro y

Dra. Cynthia Tamara Rubilar Panasiuk

Puerto Madryn, Chubut, Argentina

2025

## Resumen

La contaminación causada por actividades humanas es una de las principales amenazas para la biodiversidad, especialmente en zonas costeras que reciben grandes cantidades de residuos industriales y domésticos. Los peces que habitan estas áreas están expuestos desde temprana edad a mezclas de contaminantes, lo que puede afectar su salud y poblaciones. Comprender y monitorear los efectos de los contaminantes sobre la fauna acuática y, al mismo tiempo, generar herramientas confiables para tal monitoreo se ha convertido en un tema esencial para proteger estos sistemas. En este sentido, la histopatología es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar la salud de los organismos, así como para investigar los efectos adversos de los contaminantes ambientales sobre los mismos. En la zona costera del golfo Nuevo (Chubut, Argentina) se encuentra la ciudad de Puerto Madryn la cual cuenta con dos puertos con un alto tráfico marítimo, una importante actividad económica que involucra el turismo, la producción de aluminio y la actividad pesquera, las cuales representan fuentes antropogénicas de contaminantes. Estudios recientes, llevados a cabo en este sistema, han encontrado que peces provenientes de áreas impactadas poseen alteraciones en parámetros inmunológicos, de condición física y parasitológicos respecto de individuos provenientes de sitios de referencia. En este contexto, y teniendo en cuenta el grado de exposición a contaminación antrópica del golfo Nuevo y la importancia de su ictiofauna, el objetivo general de esta Tesis es evaluar el impacto de la contaminación sobre dos especies de peces marinos: el escrófalo (*Sebastes oculatus*) y el turco (*Pinguipes brasilianus*), a través del estudio histopatológico de órganos diana. Los individuos expuestos de ambas especies presentaron alteraciones histológicas en branquias, hígado y bazo. Las mismas fueron de leves a severas, sugiriendo que la exposición a contaminantes altera su estructura histológica pudiendo afectar el estado general de salud de estas especies. Estos resultados contribuyen a mejorar el entendimiento de las consecuencias biológicas de los contaminantes que afectan negativamente el estado de salud de los organismos en los sistemas naturales.

Palabras clave: HISTOPATOLOGÍA, PECES, CONTAMINACIÓN, PATAGONIA

## Abstract

Pollution caused by human activities is one of the main threats to biodiversity, especially in coastal areas that receive large amounts of industrial and domestic waste. Fish inhabiting these areas are exposed from an early age to mixtures of contaminants, which can affect their health and populations. Understanding and monitoring the effects of pollutants on aquatic fauna, while developing reliable tools for such monitoring, has become essential for the protection of these systems. In this context, histopathology is a widely used tool to assess organism health and investigate the adverse effects of environmental contaminants. The coastal area of Nuevo gulf (Chubut, Argentina) is home to the city of Puerto Madryn, which has two ports with high maritime traffic and significant economic activity including tourism, aluminum production, and fishing, activities that represent anthropogenic sources of pollution. Recent studies in this system have found that fish from impacted areas exhibit alterations in immunological, physical condition, and parasitological parameters compared to individuals from reference sites. Within this framework, and considering the degree of exposure to anthropogenic pollution in Nuevo gulf and the ecological importance of its fish fauna, the general objective of this thesis is to evaluate the impact of pollution on two marine fish species: the rockfish (*Sebastes oculatus*) and the Brazilian sandperch (*Pinguipes brasilianus*), through the histopathological study of target organs. Exposed individuals of both species exhibited histological alterations in gills, liver, and spleen. These lesions ranged from mild to severe, suggesting that exposure to contaminants alters their histological structure and may compromise the overall health status of these species. These results contribute to a better understanding of the biological consequences of pollutants that negatively affect the health of organisms in natural systems.

Keywords: HISTOPATHOLOGY, FISH, POLLUTION, PATAGONIA

*A mi amada Amaika, por elegirme como mamá y ser mi motor para reinventarme y buscar cada día una mejor versión de mí misma. Por enseñarme un amor infinito, inexplicable y eterno.*

*A Pipi, por elegirme y transformar para siempre mi mundo. Por trascender las fronteras de lo comprensible y permanecer eternamente en mí.*

*A mi amor, Pablo, por acompañar mi risa y secar mis lágrimas. Por permanecer a mi lado siempre y por construir juntos esta hermosa familia que es abrigo, refugio y motor.*

*A mis compañeros de viaje, cuyo amor y compañía incondicional fueron necesarios e indispensables para transitar y habitar cada etapa de este camino. Por brindarme la forma más pura de amor que existe: Oby, Mona y Theo.*

*A mí, por lograrlo. Por todo lo que dolió y también sanó. Por no bajar los brazos incluso cuando fue necesario volver a empezar.*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), principal organismo de promoción de la ciencia y la tecnología en Argentina, por otorgarme la Beca Doctoral que dio inicio a esta formación profesional de posgrado. Pero sobre todo, por haber actuado comprometidamente frente a una condición laboral irreparable, permitiéndome un cambio rotundo de directores y plan de beca para poder desenvolverme en un ambiente laboral nuevo, ameno y de respeto.

A la Universidad pública, gratuita y de calidad, derecho fundamental y pilar indispensable para la movilidad social ascendente. Su existencia constituye una herramienta clave para igualar oportunidades y promover el desarrollo científico, educativo y social de nuestro país.

A la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, y especialmente a la Facultad de Ciencias Veterinarias, donde realicé mi carrera de grado y obtuve el título de Médica Veterinaria. Es una institución de la que me enorgullece formar parte, que sentó las bases sólidas de mi formación profesional en un ambiente académico de excelencia, despertó mi vocación científica y me brindó un profundo sentido de pertenencia.

A la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, y a su Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, por brindarme la posibilidad de continuar mi formación a través del Doctorado en Ciencias Biológicas en un entorno académico comprometido y enriquecedor.

A mis Directoras Dra. María Cruz Sueiro y Dra. Cynthia Tamara Rubilar Panasiuk.

Querida Cruz, agradezco profundamente que hayas sido mi mentora. Tú guía y tú ejemplo me mostraron la excelencia con la que es posible ejercer la profesión: con entrega, compromiso, esfuerzo y perseverancia. Pero, por sobre todo, agradezco tu humanidad, tu generosidad, tu calidez y tu compañerismo. Fuiste fundamental, necesaria e irremplazable en este proceso y es gracias a tu compañía, guía y compromiso, que hoy pude llegar hasta acá. Has sido un verdadero sostén, tanto en lo profesional como en lo personal; no desististe nunca y supiste alentarme incluso en los momentos más difíciles. No existen palabras que alcancen para expresar todo lo que te agradezco, pero espero que estas se acerquen, al menos un poco, a lo que siento.

Tam, te agradezco por tu acompañamiento y asesoramiento profesional durante este proceso pero más aún quiero agradecerte por esa mano que me extendiste, decidida a ayudarme cuando más lo

necesité. Gracias por involucrarte desinteresadamente, ayudarme y guiarme en momentos fundamentales que permitieron que continúe con este posgrado y hoy pueda obtener este resultado.

Dra. Ma. Gabriela Palacios, Gaby, gracias por ser mi tutora, por acompañarme y enseñarme tu profesionalismo, por los consejos, las revisiones, la lectura detallada de la Tesis y principalmente por brindarme tu valiosa amistad. Gracias también por el camino que se viene con el proyecto posdoctoral.

Secretario de Investigación y Posgrado, Dr. Gabriel Casal. Por su vocación de servicio, predisposición y acompañamiento durante todo el proceso de Doctorado, haciendo posible lo imposible para que hoy pueda doctorarme.

A los jurados de esta Tesis: Dra. Assef, Dr. Irigoyen y Dra. Kroeck por el compromiso, por sus constructivas devoluciones y comprender y aceptar la premura en la instancia final de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Virkel, Wuilly, por ser parte de este camino, siempre predispuesto a ayudarme, a través de sus valiosos consejos y guía.

Gracias al CESIMAR–CENPAT–CONICET, institución que admiro profundamente y de la que me enorgullece formar parte. En ella encontré profesionales excepcionales, que colaboraron en distintas etapas de este trabajo con generosidad, compromiso y calidez. En algunos casos, ese vínculo trascendió los muros laborales y dio lugar a hermosas amistades, que atesoro con gratitud (Cami, Rami, Silvi, Marina, Nico, Ailén, Pablito, Leta, Vivi, Bocha, Cami, Ro, Pau; Hugo, Norberto).

Lic. Fernando Muratore, gracias Fer por recibirme en un momento bisagra de mi carrera y de mi vida y acompañarme en esa transición que tanto me costó pero que logré gracias a tu acompañamiento. Gracias por aconsejarme pero sobre todo por brindarme tu apoyo indispensable e incondicional hasta saber que estaba lista para recomenzar.

A todo el Grupo de Ecofisiología Aplicada al Manejo y Conservación de Fauna Silvestre (GEA), en especial al Dr. Marcelo Bertellotti, por recibirme y abrirme sus puertas en el momento que más lo necesité.

A la Dra. Virginia Martínez y Dr. Oscar Leone (Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales) por su transferencia de conocimientos durante mi capacitación en histopatología animal, por su calidez y compromiso.

A las Dras. Estefanía Bagnato y Carmen Gilardoni por su asesoramiento en parasitología y su predisposición y amabilidad.

Al PICT 2013-3006 por financiar parte de este proyecto de Tesis.

A la Dra. Marina Kroeck y su Laboratorio de Parasitología e Histopatología de Moluscos Bivalvos, por el procesamiento histológico de las muestras colectadas para este trabajo.

A mis afectos...

A mis amigos, que son la familia que elegí y que me acompañan en cada paso. A los de siempre, que considero hermanos; a los más recientes, y a los que se sumaron en este nuevo camino de la maternidad. A todos, gracias por alegrar mis días, por estar, por su afecto y apoyo incondicional: Micky, Pipe, Tati, Mely, Naty, Vane, Maxi, Ger, Bruno; Martín, Magui, Fede, Mati, Noe, Mati, Cata, Cuti, Pablo, Pame, Vicky, Mario, Ailu, Gas, Salta.

A mis seres amados que no están pero que han sido y serán siempre parte fundamental de mi vida. De los que me quedó su amor como tesoro y recuerdo cada día. Que sé que estarán orgullosos de este logro que tanto esfuerzo me ha costado y celebrarán conmigo este día: Tío Gustavo, Edy y Quito.

A mis hermanos, a quienes amo profundamente y de quienes tanto he aprendido. Han sido un sostén en los mejores y en los peores momentos, y un reflejo constante de fortaleza. Gracias por ser quienes son y por estar siempre:

Sele, por tu ayuda, tus consejos y hacerme saber que puedo contar con vos siempre. Por cada vez que cuidaste a Ami para que pueda terminar esta tesis. Por cada risa y cada lágrima que acompañaste firme, incansable, dispuesta a ayudarme. Por ser hermana, amiga y tía en la máxima expresión de amor, por la luz y magia que irradias y contagias.

Paula, por tu fortaleza y compañía, por venir corriendo siempre que lo necesité y hacerme saber que estás. Por cuidar mis enanos, mi mundo, como si fueran tuyos y por ser una gran persona, gran hermana y amiga.

Marcos, por haber sido mi compañero y ejemplo en muchos momentos, por tus consejos, por cuidarme y hacerme saber que estás.

A mi Papá, por acompañarme a lo largo de este proceso, por empujarme y aconsejarme cuando sentía que flaqueaba. Por leer y reconstruir las notas, los textos y todo lo que te enviaba para que me des tu opinión. Por ayudarme en la búsqueda de este resultado que tanto esfuerzo necesitó. Por decirme que me alejara cuando no estaba siendo respetada y alentarme a buscar un lugar mejor, que finalmente llegó y del que esta Tesis es el resultado.

A mis abuelos Tata, Alicia y Miguel, esta tesis es un humilde homenaje a la huella imborrable que dejaron en mi vida. Por su amor inmenso, por su integridad, por su presencia que sigue acompañándome en cada paso. Los admiro, los amo profundamente, y los extraño cada día.

A mi compañero, mi amor, Pablo. Gracias por todo, por lo que hacés cada día, por acompañarme en las risas y en las batallas. Por esta familia que construimos, por ser mi sol y hacerme sentir fuerte y valiente. Por incentivarne a seguir y buscar lo mejor para nosotros.

A mi Mamá! Que me tejiste un par de alas con la única lanita que tenías y te encargaste de que queden fuertes y listas. Por enseñarme a usarlas y empujarme a volar. Por todas las veces que fuiste sólo vos, por todas las veces que me dijiste “vos podés”, hasta convencerme de que podía. Por no dudar, por enseñarme a soñar y luego a luchar por esos sueños. Por aplaudir mis logros y abrazar mis fracasos. Por ser siempre la voz que me acompaña y guía. Porque no importa lo que pase, me haces saber que estás ahí. Por nunca dejarme caer, por tu amor incondicional, por tu fortaleza silenciosa. Por ser la mejor abuela del mundo. por todo... Gracias Ma.-

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción general	2
1.2. Objetivo e hipótesis general	8
1.3. Objetivos e hipótesis específicos	8

## 2. METODOLOGÍA GENERAL

2.1. Sitio de estudio.	11
2.2. Especies de estudio	14
2.3. Muestreo	16
2.4. Procesamiento histológico	17
2.5. Determinación de lesiones histológicas	17

## 3. CAPÍTULO I: EVALUACIÓN DE ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN BRANQUIAS DE PECES MARINOS EXPUESTOS A CONTAMINACIÓN

<b>3.1. Resumen</b>	20
<b>3.2. Introducción</b>	21
3.2.1. Anatomía y función de las branquias	21
3.2.2. Histología de las branquias	22
3.2.3. Las branquias como órganos indicadores de contaminación	25
3.2.4. Síntesis y objetivos de este capítulo	26

<b>3.3. Metodología</b>	28
3.3.1. Análisis histopatológico	28
3.3.2. Parásitos metazoos y quistes bacterianos	29
3.3.3. Tasa de prevalencia, intensidad y abundancia	29
3.3.4. Análisis estadísticos	30
<b>3.4. Resultados</b>	32
3.4.1. Análisis histopatológico	32
3.4.2. Distribución de lesiones histológicas	40
3.4.3. Prevalencias de lesiones histológicas	42
3.4.4. Índices histopatológicos	44
3.4.5. Parásitos metazoos y quistes bacterianos	48
3.4.6. Prevalencia y abundancia de parásitos metazoos y quistes bacterianos	49
<b>3.5. Discusión</b>	51
<b>4. CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN HÍGADO DE PECES MARINOS EXPUESTOS A CONTAMINACIÓN</b>	
<b>4.1. Resumen</b>	57
<b>4.2. Introducción</b>	58
4.2.1. Anatomía y función del hígado	58
4.2.2. Histología del hígado	59
4.2.3. El hígado como órgano indicador de contaminación	63

4.2.4. Síntesis y objetivos de este capítulo	65
<b>4.3. Metodología</b>	66
4.3.1. Análisis histopatológico	66
4.3.2. Recuento de centros de melanomacrófagos	67
4.3.3. Tasa de prevalencia y abundancia de parásitos metazoos	68
4.3.4. Análisis estadísticos	68
<b>4.4. Resultados</b>	70
4.4.1. Análisis histopatológico	70
4.4.2. Distribución de lesiones histológicas	79
4.4.3. Prevalencias de lesiones histológicas	81
4.4.4. Índices histopatológicos	84
4.4.5. Centros de melanomacrófagos	88
4.4.6. Tasa de prevalencia y abundancia de parásitos metazoos	90
<b>4.5. Discusión</b>	92
<b>5. CAPÍTULO III: EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE BAZOS DE PECES MARINOS EXPUESTOS A CONTAMINACIÓN</b>	
<b>5.1. Resumen</b>	100
<b>5.2. Introducción</b>	101
5.2.1. Anatomía y función del bazo	101
5.2.2. Histología del bazo	102

5.2.3. Centros de melanomacrófagos del bazo	103
5.2.4. Centros de melanomacrófagos como indicadores de contaminación	104
5.2.5. Síntesis y objetivos de este capítulo	105
<b>5.3. Metodología</b>	106
5.3.1. Análisis histopatológico: Recuento de centros de melanomacrófagos (CMM)	106
5.3.2. Índice bazosomático	106
5.3.3. Análisis estadísticos	106
<b>5.4. Resultados</b>	107
5.4.1. Evaluación histológica	107
5.4.2. Índice bazosomático	110
<b>5.5. Discusión</b>	111
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</b>	
6.1. Discusión general	114
6.2. Conclusiones	116
<b>7. ANEXO TABLA ADICIONAL Y ABREVIATURAS</b>	119
<b>8. CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	126

## **Introducción a la lectura**

Esta Tesis Doctoral comienza con una Introducción General, que presenta el contexto teórico que enmarca el estudio y expone los objetivos e hipótesis planteados. A continuación, se incluye una Metodología General, donde se detallan los materiales y métodos comunes aplicados en todos los capítulos, tales como la descripción del sistema de estudio, las especies seleccionadas y los protocolos utilizados para los análisis.

La Tesis se estructura en tres capítulos, cada uno con el formato clásico de una publicación científica: introducción, metodología, resultados y discusión. El sistema de estudio se sitúa en el golfo Nuevo (Chubut, Argentina), una zona costero-marina expuesta a múltiples fuentes de contaminación de origen antrópico, tales como el tráfico marítimo, la industria del aluminio, la pesca industrial y los efluentes urbanos provenientes de la ciudad de Puerto Madryn.

En este contexto, se seleccionaron dos especies representativas de los ensambles de peces de arrecifes norpatagónicos, el escrófalo (*Sebastes oculatus*) y el turco (*Pinguipes brasilianus*), como organismos indicadores para evaluar el impacto de la contaminación mediante el análisis histopatológico de tres órganos clave: branquias, hígado y bazo.

El objetivo general de esta Tesis es evaluar el impacto de la contaminación antrópica sobre peces marinos patagónicos a partir del estudio histopatológico de órganos específicos como indicadores de la susceptibilidad de los individuos. Cada uno de estos órganos es abordado en un capítulo independiente, en el que se articula el marco teórico general con enfoques conceptuales específicos de relevancia ecológica.

En el desarrollo de los capítulos y en las conclusiones generales, se describen y comparan las alteraciones histológicas detectadas en individuos provenientes de áreas impactadas respecto de aquellos provenientes de sitios de referencia o control. Además, se exploran diferencias interespecíficas y órgano-específicas en las respuestas observadas, proporcionando así un enfoque integral sobre los efectos de la contaminación en peces marinos expuestos a disturbios ambientales.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1. Introducción General

El agua desempeña un papel crucial en el equilibrio ecológico, y su contaminación es un problema actual con graves repercusiones para las poblaciones naturales y los ecosistemas. La contaminación del agua es la alteración de sus cualidades biológicas, químicas y/o físicas. Se define como la producción y/o introducción, directa o indirecta por parte del hombre, de sustancias o energía en el medio ambiente; provocando efectos dañinos para los recursos vivos y/o interfiriendo con los servicios y otros usos del medio ambiente (Don-Pedro, 1990). La contaminación puede ocurrir de forma continua, como en el caso de las aguas residuales de las ciudades o los desechos industriales que se vierten constantemente en cuerpos de agua; o de forma discontinua, cuando el vertido ocurre en intervalos regulares o irregulares de tiempo. Además puede ser puntual y/o accidental, como en el caso de los derrames de petróleo (o hidrocarburo) crudo; o difusa cuando no proviene de una fuente específica o identificable, sino que se origina de múltiples puntos dispersos sobre una amplia área. Y puede ser de forma directa a los cuerpos de agua o indirectamente como por ejemplo las impurezas contenidas en la atmósfera que son depositadas por la lluvia sobre agua y tierra (Butnariu, 2022).

Los contaminantes antrópicos son compuestos de origen humano que ingresan al ambiente y se caracterizan por poseer un efecto deletéreo para los ecosistemas y los organismos, son persistentes, fáciles de acumular y no degradables en el medio ambiente. De acuerdo con su naturaleza, se pueden clasificar en físicos (e.g. calor y radiactividad, ruido, plásticos), químicos (e.g. hidrocarburos, metales pesados) y biológicos (e.g. microorganismos patógenos transmitidos por aguas fecales) (Beiras, 2018). Los efectos de los contaminantes son complejos y variados, dependiendo de su naturaleza y concentración. Estos compuestos han sido reportados mundialmente y son considerados un problema global grave por su alto impacto ecosistémico. Han sido encontrados en todos los ambientes y taxones, incluyendo al ser humano. Algunos son altamente tóxicos, mutagénicos y cancerígenos, pudiendo producir serias alteraciones o inhibición de distintos sistemas como el inmunitario, endócrino y/o reproductivo, daño celular y tisular, y otros efectos fisiológicos, incluso la muerte de los organismos (Butnariu, 2022; Beiras, 2018; revisado por Islam & Tanaka, 2004). Contaminantes, como los hidrocarburos, metales pesados o pesticidas, se depositan en los tejidos y órganos de los organismos gracias a su lipofilia, acumulándose en los mismos (bioacumulación) en concentraciones mucho más elevadas que las del agua circundante. También son capaces de

magnificar su concentración a través de la trama trófica, ya que a medida que los organismos más pequeños son consumidos por organismos más grandes, la concentración de estos compuestos se magnifica (biomagnificación) representando una problemática grave para la salud de los ecosistemas (Beiras, 2018; revisado por Islam & Tanaka, 2004).

En la actualidad la contaminación por actividad antrópica está ampliamente reconocida como una de las amenazas más graves para la biodiversidad (Rands et al., 2010; Vörösmarty et al., 2010). Dado que las poblaciones humanas se concentran a lo largo de las costas (alrededor del 44% de la población mundial, incluidas 8 de las 10 ciudades más grandes del mundo, se ubican en las líneas costeras), los ecosistemas marinos y especialmente las zonas costeras son depositarios de enormes cantidades de contaminantes antrópicos y es por ello que estas zonas son de las más afectadas y alteradas a nivel global (Beiras, 2018; Halpern et al., 2008; Adger et al., 2005). Las principales fuentes de contaminación marino costeras incluyen la industria, el transporte marítimo, las actividades domésticas y la agricultura. En ellas se originan compuestos como hidrocarburos derivados del petróleo, metales pesados (e.g. plomo, arsénico, mercurio), productos domésticos y de cuidado personal (e.g. detergentes, limpiadores, cosmética), antibióticos y medicamentos de uso humano y veterinario, drogas de abuso y agroquímicos (pesticidas y fertilizantes) entre otros, que por diferentes vías son vertidos al mar (Butnariu, 2022).

Una gran familia de contaminantes antrópicos orgánicos que alcanzan los ecosistemas marinos, en mezclas complejas y cuya composición depende de su origen, son los hidrocarburos poliaromáticos derivados del petróleo. Éstos provienen, principalmente, de los destilados del crudo en forma de diésel, gasolina y aceite lubricante. Los efluentes de desechos industriales, junto al tráfico marítimo, las extracciones de los depósitos de crudo en altamar y los accidentes de derrame de crudo directos al mar son los principales responsables del petróleo que contamina los ecosistemas acuáticos a nivel global (Butnariu, 2022; Kuppusamy et al., 2020). Otro grupo de contaminantes de gran relevancia son los metales pesados, sus fuentes antrópicas son principalmente aguas residuales de actividades industriales (como metalúrgicas, electrónica, galvanoplastia), lixiviados de vertederos, minería, escurrentía urbana y aguas residuales municipales (Butnariu, 2022; Pujari & Kapoor, 2020).

Los contaminantes domésticos o también llamados “contaminantes emergentes” son otro grupo de contaminantes antrópicos que se liberan constantemente al medio acuático, principalmente a través de los efluentes de aguas residuales. Son compuestos químicos, de amplio uso doméstico, utilizados

en productos farmacéuticos, hospitalarios, cosmética, de cuidado personal o estética, surfactantes y drogas de abuso (revisado por Li et al., 2015). Otros contaminantes antrópicos que recientemente han tomado gran relevancia mundial son los micro y nanoplásticos. Los desechos plásticos generados por el ser humano se están acumulando en el entorno marino y oceánico a un ritmo alarmante y esto impacta directamente sobre la fauna marina representando una grave amenaza para los organismos y ecosistemas acuáticos (revisado por Gola et al., 2021). Por último, otro grupo que se incluye en los grandes contaminadores de sistemas acuáticos son los agroquímicos (fertilizantes y pesticidas principalmente), que desde el inicio de su uso han producido un gran e irreversible impacto ambiental. Un ejemplo de ellos es el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, que debido a su persistencia y a fuentes ocasionalmente inesperadas, aún se encuentran en los sedimentos costeros y en la biota, a pesar de haberse descontinuado su uso hace muchas décadas (Beiras, 2018).

Como se ha mencionado, existe considerable evidencia científica que demuestra que los contaminantes ambientales son capaces de afectar la salud y el fitness de los individuos de muchos taxones (Holmstrup et al., 2010), aumentando el potencial de impactar gravemente las poblaciones naturales (Köhler et al., 2013). Los ecosistemas marinos y la biodiversidad asociada sustentan la vida en nuestro planeta y tienen un valor intrínseco. Proporcionan servicios críticos como el mantenimiento de los ciclos globales de oxígeno y carbono, la producción de energía, alimentos y productos medicinales, la regulación climática, la protección costera y actividades recreativas y de bienestar humano y medios de vida (Selig et al. 2018; Peterson & Lubchenco 1997). A pesar de ello, estos ecosistemas continúan siendo altamente impactados por causas antropogénicas, lo que determina una gran amenaza para la supervivencia de su biodiversidad (Ward et al., 2022).

Entre la biodiversidad marina, los peces, poseen un valor incalculable para la humanidad, representando más de la mitad de los vertebrados vivos del mundo. Desde hace mucho tiempo han sido el alimento básico en la dieta de gran cantidad de pueblos, por ser un alimento de alta calidad y valor nutricional, que aporta nutrientes esenciales. Hoy en día, los peces forman una fracción importante, incluso la principal, en la economía de muchas naciones, al tiempo que brindan un valor recreativo y psicológico para naturalistas, entusiastas de los deportes y acuaristas aficionados. Son puntos de interés en discusiones gubernamentales y también son objeto de estudios científicos en todo el mundo (Nelson, 2016). Estos organismos son utilizados como indicadores generales de contaminación, para el beneficio directo de los humanos y para proteger los ecosistemas. Los peces

exhiben una enorme diversidad en su morfología, en los hábitats que ocupan y en su biología. Taxonómicamente, están descritos 85 órdenes, 536 familias y más de 60000 especies en todo el mundo de las cuales aproximadamente el 57% habitan en ambientes marinos (Nelson, 2016; 2006). Según Nelson (2006), el grupo de peces más numeroso es el de los osteíctios o peces óseos (28000 especies aproximadamente), que se caracterizan por poseer un esqueleto de tejido óseo. En zonas costeras, urbanas e industrializadas, los peces a menudo, están expuestos a complejas mezclas de contaminantes desde las primeras etapas de su desarrollo hasta la edad adulta (Sindermann et al., 1979). Estos organismos pueden absorber dichos tóxicos directamente del medio que les rodea o bien ingerirlos a través del alimento (Oropesa et al., 2017). Numerosos estudios han mostrado que tal exposición crónica puede deteriorar la salud de los individuos pudiendo afectar seriamente las poblaciones y comunidades de los mismos (Köhler et al., 2013; Holmstrup et al., 2010). Los contaminantes son capaces de producir severas alteraciones fisiológicas con efectos sobre parámetros inmunológicos (Dang & Brauner, 2021; Sueiro et al., 2016; Ali et al., 2014), reproductivos (Geraudie et al., 2017; Vignet et al., 2016), metabólicos (Meador et al., 2018; Ossana et al., 2016), y respiratorios (Troncoso et al., 2012; Banerjee, 2007), entre otros, pudiendo conducir incluso, hasta la muerte (Austin, 1999).

La región de Península Valdés en Patagonia, Argentina, declarada Patrimonio Natural de la Humanidad por la UNESCO en 1999, contiene hábitats naturales importantes para la conservación de varias especies de valor universal. Este sitio posee una gran importancia cultural y económica, ya que cada año cientos de miles de turistas de todo el mundo (~ 350.000 visitantes) llegan para admirar su fauna y paisajes. Al sur de la península se ubica el golfo Nuevo, una bahía semicerrada de aproximadamente 2500 km<sup>2</sup>. Este golfo alberga una gran variedad de organismos marinos, siendo los peces de arrecife patagónicos un componente esencial de su biodiversidad. Entre los cuales, dos de las especies más comunes y conspicuas son el escrófalo *Sebastes oculatus* (Perciformes, Sebastidae) y el turco *Pinguipes brasilianus* (Perciformes, Pinguipedidae) (Irigoyen et al., 2013; Galván et al., 2009). A orillas del golfo Nuevo, está ubicada Puerto Madryn (~120.000 habitantes), la única ciudad costera de la región. Sus principales actividades económicas son la actividad pesquera, la producción de aluminio y el turismo. Esta ciudad cuenta con dos puertos con un importante tráfico marítimo. Las principales descargas de aguas residuales en este golfo derivan de los efluentes de las plantas pesqueras, aguas residuales domésticas y las aguas subterráneas de drenaje; y aunque la planta de aluminio no produce efluentes líquidos, los contaminantes podrían

acceder al mar a través de la deposición atmosférica (Massara Paletto et al., 2008; Gil & Esteves, 2000). Estas actividades representan fuentes antrópicas de contaminación exponiendo a los organismos marinos que habitan el golfo a mezclas complejas de contaminantes que pueden afectar negativamente su salud. De hecho existen estudios que muestran que en las zonas de alto tráfico marítimo existe un alto porcentaje de imposex (desarrollo de órganos sexuales que están en contraste con el sexo real del organismo) en distintas especies de gasterópodos (Bigatti et al., 2009). Así mismo, recientemente, en los primeros estudios llevados a cabo en peces, se ha encontrado que individuos provenientes de las áreas impactadas poseen alteraciones en parámetros inmunológicos, de condición física y parasitológicos respecto de individuos provenientes de sitios de referencia (Sueiro et al., 2017; 2016).

Desde una perspectiva ecotoxicológica, la histopatología (estudio cualitativo y cuantitativo de anomalías o lesiones histológicas de células y tejidos de un organismo) es un indicador clave de la salud de los peces, ampliamente utilizado para evaluar los impactos de los contaminantes en los individuos y sus ecosistemas (Salmat & Zarie, 2016; Yancheva et al., 2015; Bernet et al., 1999). Las respuestas tisulares pueden relacionarse con la salud de los individuos, lo cual a su vez, permite extrapolar los efectos a nivel de población y de comunidad (revisado por Au et al., 2004). Los contaminantes pueden causar daño tisular mediante mecanismos directos e indirectos como el estrés oxidativo, la inflamación y la alteración de funciones biológicas, afectando la salud de diversos órganos (Lawrence & Hemingway, 2003). Entre estos, las branquias, el hígado y el bazo son particularmente sensibles debido a su intervención crítica en funciones vitales como el intercambio de gases, la osmorregulación, la acumulación y biotransformación de xenobióticos, la excreción de desechos, hematopoyesis y defensa inmunológica (Genten et al., 2009). En la literatura numerosos trabajos reportan alteraciones histopatológicas en branquias, hígado y/o bazo de peces expuestos a una amplia gama de contaminantes (Sobral dos Santos et al., 2023; Fonseca et al., 2016; Fesit et al., 2015; Ali et al., 2014; Santos et al., 2014; Steinfeld et al., 2014; Agamy, 2012; Troncoso et al., 2012; Couillard et al., 1999). Esto destaca la relevancia de la histopatología como herramienta para comprender y cuantificar la incidencia patológica en peces expuestos a contaminantes y, a su vez, realizar predicciones sobre los efectos en la población y/o comunidad. Cabe destacar, que el diagnóstico de alteraciones histopatológicas requiere pautas claras y objetivas. En su trabajo, Wolf y colaboradores (2014) señalan que identificar cambios histopatológicos significativos y diferenciarlos de características anatómicas normales o artefactos tisulares no es sencillo y requiere

de la experiencia y conocimientos necesarios para evitar diagnósticos erróneos o la falta de reconocimiento de ciertas condiciones.

Es claro que la ubicuidad y gravedad de la contaminación marina y sus efectos sobre los hábitats y la biodiversidad constituye uno de los principales problemas ecológicos de nuestros tiempos (Juareguiberry et al., 2024). Esto deja en evidencia la urgencia de, tanto desde la ciencia, la política y la sociedad en su conjunto, tomar acciones para promover la protección y conservación de estos ambientes y de los organismos que en ellos habitan. Por ello, estudiar y monitorear los efectos de los contaminantes a través de un enfoque sitio-específico resulta esencial para identificar problemas locales, permitiendo el desarrollo de estrategias de gestión efectivas mediante la implementación de medidas específicas, enfocadas y realistas que pueden conducir a mejores resultados de conservación. En este sentido, y teniendo en cuenta el grado de exposición a contaminación antrópica del área portuaria e industrial del golfo Nuevo y la importancia de su ictiofauna, el objetivo general de esta propuesta es ampliar el estudio del impacto de la contaminación antrópica sobre peces a través del uso de la histopatología como parte de un conjunto de indicadores del estado de salud de la fauna marina. Con los resultados de esta tesis la intención es aportar nuevos conocimientos y herramientas que puedan ser útiles para determinar el estado fisiológico y de salud de dos especies de arrecifes de nuestra región. Que a su vez, ante una problemática local, puedan ser tenidos en cuenta a la hora de desarrollar e implementar planes de gestión y/o conservación de las poblaciones así como de los sistemas que habitan.

## **1.2. Objetivo e hipótesis general**

Objetivo general: Determinar el estado histopatológico de distintos órganos diana, como indicadores de la susceptibilidad de los individuos, para evaluar el impacto de la contaminación antrópica sobre dos especies de peces marinos de Patagonia, *Sebastes oculatutus* y *Pinguipes brasilianus*.

Hipótesis general: Los peces marinos que habitan ambientes expuestos a contaminación antrópica presentan alteraciones histopatológicas significativas en órganos clave (branquias, hígado y bazo), en comparación con peces de sitios no contaminados, lo que refleja una alteración de su fisiología normal y un compromiso de su estado de salud general.

## **1.3. Objetivos e hipótesis específicos**

Objetivo 1. Determinar y comparar las características histopatológicas de órganos diana (branquias, hígado y bazo) de individuos provenientes de un sitio expuesto a contaminación antrópica con respecto a individuos procedentes de sitios de referencia (control).

Hipótesis 1. Los contaminantes químicos presentes en zonas costeras afectadas por actividad antrópica inducen múltiples lesiones histopatológicas en órganos clave como branquias, hígado y bazo, en comparación con individuos de sitios de referencia no contaminados.

Objetivo 2. Comparar entre las especies estudiadas, las características histopatológicas de los órganos diana (branquia, hígado y bazo).

Hipótesis 2. Las características histopatológicas inducidas por la exposición a contaminantes varían entre diferentes especies de peces, lo que indica una sensibilidad diferencial frente a un mismo disturbio ambiental.

Objetivo 3. Comparar entre órganos diana (branquias, hígado y bazo) pertenecientes a individuos provenientes de sitios expuestos a contaminación, el grado de sensibilidad (cambios histopatológicos) a este disturbio ambiental.

Hipótesis 3. Los distintos órganos analizados (branquias, hígado y bazo) responden con diferente grado de sensibilidad histopatológica frente a la misma exposición contaminante, debido a sus características estructurales y funcionales.

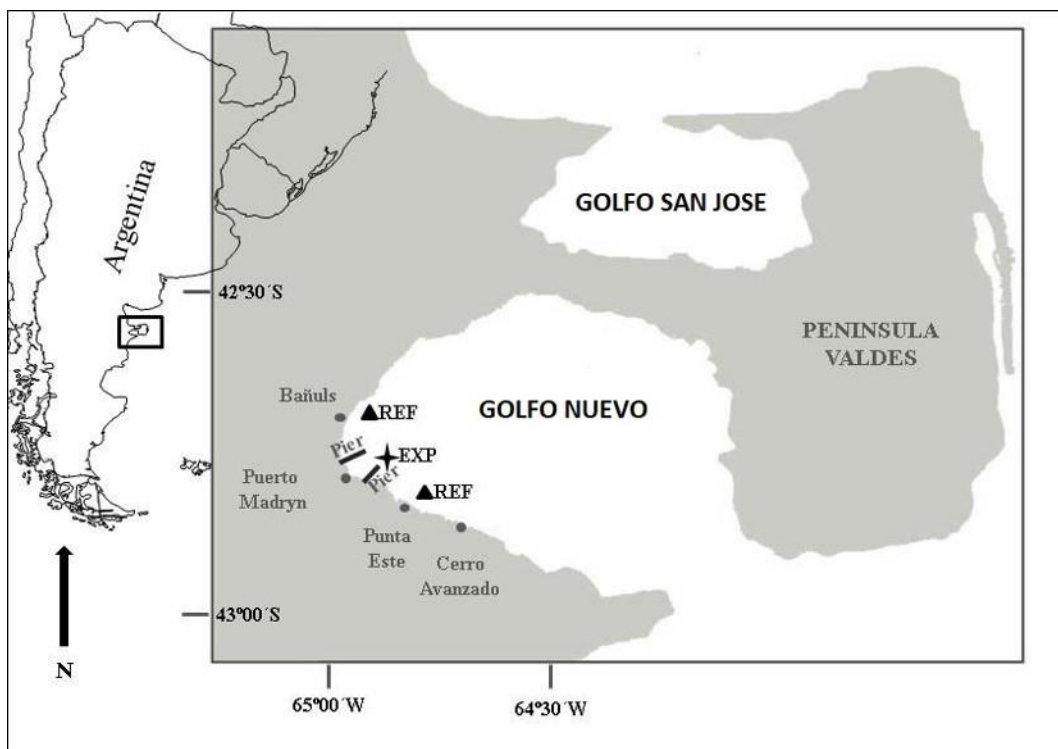
Objetivo 4. Contextualizar la relación entre los indicadores histopatológicos y diversos indicadores fisiológicos obtenidos en investigaciones previas realizadas en los mismos individuos.

Hipótesis 4. Es posible establecer un marco interpretativo acerca de la relación entre los indicadores histopatológicos y los indicadores fisiológicos previamente determinados en los mismos individuos, reflejando de manera integrada el estado de salud de los peces expuestos a contaminación antrópica.

# **METODOLOGÍA GENERAL**

## 2.1. Sitio de estudio.

Los trabajos de campo y muestreos de la presente Tesis fueron llevados a cabo dentro una zona calificada Patrimonio Natural de la Humanidad y fueron autorizados por la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas del Chubut (Disp. 156-SsCyAP/17) y Secretaría de Pesca (Disp. N° 076-SsCyAP/16). Los individuos fueron obtenidos en tres sitios diferentes dentro del golfo Nuevo (provincia de Chubut, Argentina, Fig. 1). Las aguas del golfo Nuevo están influenciadas por cambios en la dirección del calor superficial y por una limitada renovación de su agua debido al flujo de agua dulce hacia la atmósfera a medida que la evaporación supera a la precipitación (Saraceno et al., 2021). Estas características producen una amplitud térmica de la temperatura del agua de mar que va desde 8,4 °C durante la estación fría hasta 20 °C en verano, un rango de salinidad media de 34,39-35,50 PSS y un rango medio de concentración de oxígeno disuelto de 249,66-309,99  $\mu\text{l}/\text{m}^3$  (Assis et al., 2017; Tyberghein et al., 2012).



**Figura 1.** En la figura se indican los sitios de estudio y muestreo utilizados en este trabajo. REF: sitios de referencia (Bañuls y Punta Este). EXP: sitio expuesto a contaminación (Pier). Pier: Muelles ubicados en la zona portuaria de Puerto Madryn.

Como el sitio expuesto a la contaminación antropogénica se seleccionó el área alrededor de los dos muelles de la ciudad de Puerto Madryn (EXP; Fig. 1). En esta zona, el tráfico marítimo alcanza >700

embarcaciones por año (APPM, 2017), incluyendo grandes buques de carga y pesca comercial, así como grandes cruceros turísticos y embarcaciones de pesca deportiva y recreativa. De esta manera, estas aguas reciben continuamente vertidos de aguas residuales provenientes de efluentes de procesamiento pesquero, operaciones marítimas incluyendo el transporte de crudo y carga-descarga de productos derivados del petróleo, operaciones de pesca, desechos de sentinas y vertidos de agua de lastre de buques. Además, en Puerto Madryn opera una importante fundición de aluminio, cuyos contaminantes llegan al mar por deposición atmosférica (Massara Paletto et al., 2008). Para estos sitios, existen numerosos trabajos que han determinado la presencia de diversos tipos de contaminantes incluyendo metales pesados (Primost et al., 2018; 2017; Gil et al., 1999), hidrocarburos (Commendatore & Estevez, 2007) y compuestos químicos con capacidad de actuar como disruptores endocrinos (Miglioranza et al., 2021; Häder et al., 2020; Del Brio et al., 2016; Bigatti et al., 2009) (ver Tabla 1 para un resumen del tipo y nivel de contaminantes en el área). Así mismo, en estos sitios se ha registrado un enriquecimiento oránico en los primeros centímetros de la columna sedimentaria, asociado a la actividad portuaria (Ferrando & Sturla, 2020). Como sitios de referencia, se seleccionaron arrecifes ubicados a más de 20 km del sitio expuesto, Punta Este (42.47°S; 64.56°W) y Bañuls (42.39°S; 64.59°W) (REF; Fig. 1). Estos sitios comparten condiciones de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto con el área alrededor de los muelles (Ferrando & Sturla, 2020; Giarratano et al., 2013), pero no están expuestos a evidentes fuentes de estrés antropogénico al no haber tráfico de grandes embarcaciones, ni industrias, ni asentamientos urbanos (Bökenhans et al., 2017). Al no recibir desechos industriales, urbanos u otros, han sido considerados sitios de referencia en estudios ecotoxicológicos previos (Sueiro et al., 2022; 2020; 2017; Primost et al., 2017, 2018; Del Brio et al., 2016; Sueiro & Palacios, 2016; Bigatti et al., 2009). De hecho, los niveles de contaminantes registrados en estos sitios, tanto en sedimentos como en tejidos de invertebrados, han sido inferiores (incluso por debajo del nivel de detección) respecto de los sitios expuestos (Tabla 1) (Primost et al., 2017, 2018; Del Brio et al., 2016).

**Tabla I.** Máximas concentraciones de diferentes contaminantes detectados en sedimentos del sitio expuesto y valores registrados en zonas referencia control.

Contaminante	Zonas expuestas*	Zonas referencia/control**	Cita
<b>Metales traza (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> dw)</b>			
Al	5633/12958 <sup>a</sup>	10541	Primost et al., 2017
Fe	12179/13581 <sup>a</sup>	10492	
Cu	2,50/6,10 <sup>a</sup>	2,99	
Pb	5,00/7,47 <sup>a</sup>	Nd	
Zn	19,36/32,99 <sup>a</sup>	16,84	
<b>TBTs (ng (Sn) <math>\text{g}^{-1}</math> dw)</b>			
Tributyltin	174,81	Nd/Nd <sup>a</sup>	Del Brio et al., 2016
Dibutyltin	19,9	Nd/Nd <sup>a</sup>	
Monobutyltin	71,79	24,05/Nd <sup>a</sup>	
<b>PAHs (ng <math>\text{kg}^{-1}</math> dw)</b>			
Fluoranthene	30	Nd	Primost et al., 2018
Pyrene	20	Nd	
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	30	Nd	
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	40	Nd	
Benzo[ <i>a</i> ]anthracene	50	Nd	
Chrysene	30	Nd	
Dibenzo[ <i>a,h</i> ]anthracene	20	Nd	
Benzo[ <i>ghi</i> ]perilene	20	Nd	
Total PAHs	270	--	

**Nota.** \*Se expresan niveles de contaminantes detectados en sedimentos muestreados en sitios incluidos en las zonas consideradas expuestas. \*\* Se expresan niveles de contaminantes detectados en sedimentos muestreados en sitios incluidos en las zonas consideradas control o referencia. <sup>a</sup> Se expresan dos valores correspondientes con sedimentos muestreados en dos sitios. dw: peso seco; TBT: tributilo de estaño; PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos, Nd: no detectado y/o por debajo del límite de detección. Tabla modificada de Sueiro et al., 2022.

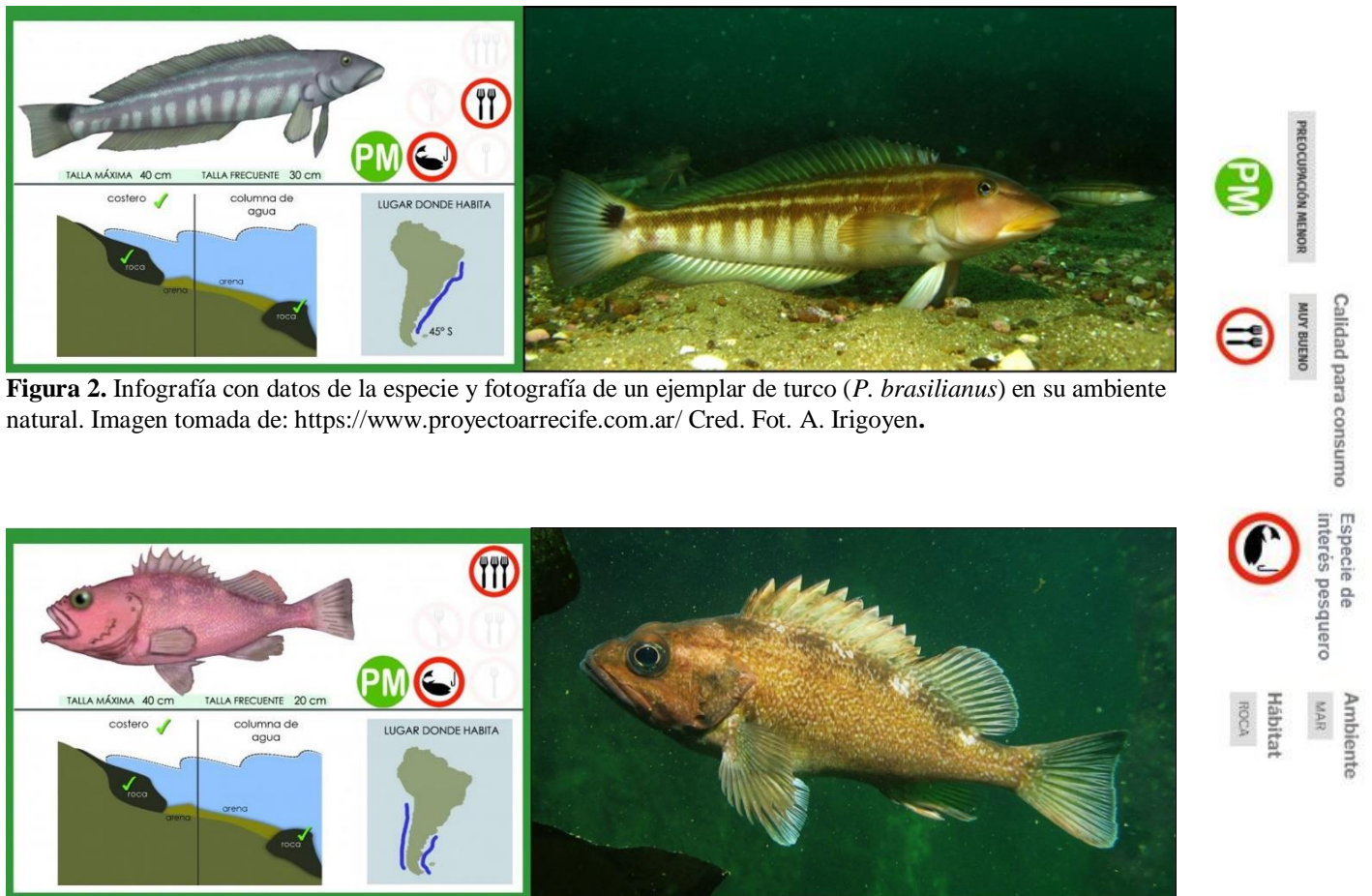
## 2.2. Especies de estudio.

El turco (*Pinguipes brasilianus*) (Fig. 2), también conocido como chanchito en la costa bonaerense y en Uruguay y desde hace poco como salmonete (haciendo referencia a su parecido y parentesco con el salmón de mar), se distribuye desde Río de Janeiro (20° S) en Brasil hasta el golfo San Jorge (45° S) en Argentina. Dentro de los golfos San Matías, San José y Nuevo es una de las especies más abundantes que habita los arrecifes rocosos, donde es comúnmente visto por buzos que los describen como animales “curiosos”. Esta especie, que al igual que el salmón de mar pertenece a la familia Pinguipedidae, es principalmente costera (común hasta 50-60 m, aunque puede alcanzar los 150 m de profundidad). Durante el día, los turcos que viven en los arrecifes más costeros realizan pequeñas migraciones asociadas a los ciclos de marea, ya que durante la marea alta se observan turcos en las zonas intermareales rocosas, mientras que durante la marea baja aumenta su abundancia en los arrecifes submareales. En las zonas intermareales se los observa con mucha actividad y patrullando en busca de alimento (principalmente cangrejos, moluscos y también pequeños peces). Los turcos que habitan los arrecifes costeros a lo largo del año (hasta 15-20 m de profundidad), durante los meses fríos migran a otros más profundos por debajo de los 20 m. Si bien realizan estos movimientos entre áreas costeras y áreas más profundas en general los individuos no se alejan demasiado de los arrecifes que habitan. Esto podría deberse a que su alimento se encuentra en los arrecifes o en sus cercanías. A su vez, el turco es presa de otras especies de peces que habitan los arrecifes rocosos, como el salmón de mar y el mero. Presentan reproducción ovípara con actividad en los meses más cálidos, seguido de un período de recuperación durante los meses más fríos (Irigoyen et al., 2018; Villanueva-Gomila et al., 2015). Con respecto a la talla, los machos pueden alcanzar los 44 cm de largo total y 1,2 kg de peso, mientras que las hembras pueden alcanzar los 42 cm de largo total y 0,9 kg de peso como máximo. Es considerada una especie de interés pesquero (Irigoyen et al., 2018).

El escrófalo (*Sebastes oculatus*) (Fig. 3) habita arrecifes desde el golfo San Matías hasta el extremo sur del Atlántico y desde el extremo sur de Chile hasta Perú en el Pacífico, desde los primeros metros de profundidad hasta aproximadamente los 300 m. Desde el norte del golfo San Jorge es la especie más abundante del ensamble de peces de arrecife. Pertenece a los escorpeniformes. Tiene una reproducción vivípara con actividad reproductiva durante los meses más fríos e inactiva durante los meses más cálidos (Marcinkevicius, 2009; 2015). Es un predador principalmente nocturno que se alimenta de pequeños peces e invertebrados asociados al fondo y también a la columna de agua. En los arrecifes de baja profundidad (< 15 m) tiene un comportamiento principalmente críptico y se

halla generalmente apoyado sobre el fondo u oculto a la sombra de grietas y cuevas. En los arrecifes más profundos suele estar “suspendido” sobre las rocas que habita, formando grupos junto con los meros. Respecto a la talla, alcanza como máximo un kilo de peso y 40 cm de longitud (Irigoyen et al., 2018).

Estas especies fueron seleccionadas para este proyecto principalmente por su marcada fidelidad al sitio que habitan. Al no ser migratorias y mantener una asociación constante con los mismos arrecifes o con otros cercanos (Irigoyen et al., 2013; Galván et al., 2009), se convierten en bioindicadores especialmente valiosos. Esta permanencia espacial resulta crucial en estudios ecotoxicológicos, ya que permite vincular con mayor certeza la presencia de alteraciones biológicas con condiciones locales de contaminación. Además, estas especies ocupan posiciones elevadas en la red trófica bentónica, son longevas y presentan hábitos relativamente sedentarios, cualidades que refuerzan su utilidad como modelos para evaluar impactos ambientales de origen antrópico.



**Figura 2.** Infografía con datos de la especie y fotografía de un ejemplar de turco (*P. brasiliensis*) en su ambiente natural. Imagen tomada de: <https://www.proyectoarrecife.com.ar/> Cred. Fot. A. Irigoyen.

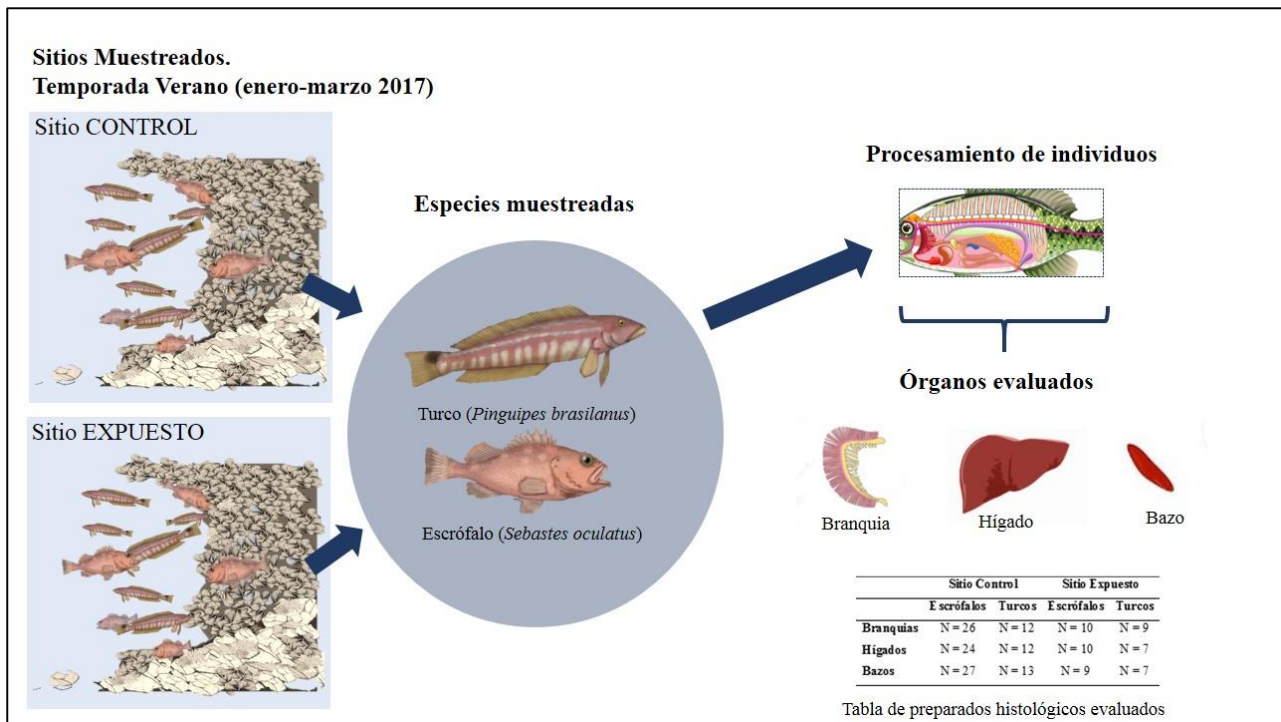


**Figura 3.** Infografía con datos de la especie y fotografía de un ejemplar de escrófalo (*S. oculatus*) en su ambiente natural. Imagen tomada de: <https://www.proyectoarrecife.com.ar/> Cred. Fot. A. Irigoyen.

### 2.3. Muestreo.

Se obtuvieron un total de 37 individuos adultos de escrófalos (referencia: n=27, rango de talla: 16,0-32,3 cm; expuestos: n=10, rango de talla: 20,5-29,10 cm) y 22 individuos adultos de turcos (referencia: n=13, rango de talla: 25,5-38,2 cm; expuestos: n=9, rango de talla: 26,5-32,4 cm) mediante técnicas de pesca con línea o arpón, durante los meses de enero a marzo del año 2017 (temperatura  $18,0 \pm 0,5$  °C) (Fig. 4). Estos métodos de captura permiten una alta selectividad de especies y tamaños, reducen el tiempo de manipulación y minimizan la captura incidental y el disturbio físico en el arrecife. Luego los peces fueron sacrificados mediante la sección espinal o el *pithing*, ya que aseguran una muerte rápida e inmediata, lo cual es fundamental para minimizar el sufrimiento animal y reducir el tiempo hasta la fijación tisular, a pesar de que pueden generar ciertos artefactos, como hemorragias en las branquias, que fueron considerados durante el análisis histológico de estos órganos. Finalmente se registraron el peso y la talla de los individuos y se colocaron en hielo hasta ser transportados al laboratorio donde se realizó la disección de los mismos. Durante la disección se obtuvieron un arco branquial, el hígado y el bazo de cada individuo (Fig. 4) y se determinó el sexo mediante la examinación interna de las gónadas. El número de muestras colectadas permite evaluar los parámetros incluidos en la Tesis y representa el número mínimo de animales suficientes para obtener resultados válidos y confiables minimizando el impacto sobre el sitio de muestreo. Los mayores tamaños muestrales de individuos de referencia, respecto de los individuos controles, se deben a que el diseño de muestreo incluyó dos sitios de referencia y un único sitio expuesto. En el laboratorio, las muestras fueron colocadas en cassettes histológicos previamente etiquetados y luego fijados en formaldehído tamponado al 10%. En todos los casos, la fijación se realizó durante 24-48hs con agitación ocasional para asegurar la fijación uniforme de los tejidos. Las muestras se transfirieron luego a alcohol al 70% hasta el momento del procesamiento histológico. El bazo, previo a la fijación, fue pesado para calcular el índice bazosomático (IBS), que expresa el peso del órgano como un porcentaje del total del cuerpo. Los valores de peso se expresaron en gramos.

Todos los procedimientos de manipulación realizados durante este estudio estuvieron basados en las recomendaciones realizadas para el cuidado y bienestar de peces (Canadian Council on Animal Care 2005; Iwama GK 2007; Laborde 2021).



**Figura 4.** Diseño de muestreo. Se indican los sitios de toma de muestras (control y expuesto), las especies y órganos evaluados y el número de muestras obtenidos en cada caso.

## 2.4. Procesamiento histológico

Para iniciar el procesamiento histológico, las muestras de los tres órganos se deshidrataron en baterías de etanol. Las branquias fueron además descalcificadas con una solución buffer TRIS-EDTA (pH 7.4), luego los órganos fueron clarificados en xilol y se incluyeron en paraplast. Posteriormente se realizaron cortes de 5 micras de espesor con un micrótopo de rotación. Los cortes obtenidos se colorearon con Hematoxilina-Eosina, tinción de rutina para poner de manifiesto la estructura histológica de los órganos. Los preparados histológicos se observaron en microscopio óptico LEICA DM2500 con cámara de fotos incorporada (DFC 450C). Se utilizó el programa LAS V4.5 para procesar las imágenes obtenidas desde el microscopio. Todas las imágenes histológicas presentes en este manuscrito fueron obtenidas durante el desarrollo de este plan de Tesis y para la misma.

## 2.5. Determinación de lesiones histológicas

Para cuantificar, estandarizar y establecer el grado de lesiones presentes en el hígado y branquias de las especies en estudio se utilizó el método propuesto por Bernet et al., (1999). El mismo está basado

en el análisis de la extensión de la lesión en el órgano y la importancia patológica de la alteración. Este método semicuantitativo incluye la determinación de índices sobre los que se pueden realizar análisis estadísticos. El método propone que las histopatologías registradas, para cada órgano investigado, se clasifiquen o engloben en cinco patrones de reacción. Cada uno de ellos incluye múltiples alteraciones que afectan a unidades funcionales del órgano o a un órgano completo. Estos patrones de reacción buscan estandarizar las alteraciones histológicas según los disturbios ocasionados por la base de las mismas. De esta manera se describen 5 patrones: (1) los **disturbios circulatorios** que comprenden todas las alteraciones circulatorias resultantes de una condición patológica del flujo de sangre y fluido tisular; (2) **cambios regresivos**, que abarcan los procesos que culminan en una reducción funcional o pérdida de un órgano; ya sea atrofia, degeneración y/o necrosis; (3) **cambios progresivos**, aquellas alteraciones que conducen a un aumento de la actividad de las células o los tejidos; (4) **disturbios inflamatorios**, relacionados a patologías inflamatorias e inmunológicas; (5) **tumores**, que se presentan ante una proliferación incontrolada de células y tejidos. Este procedimiento ha sido ampliamente aceptado y replicado, desde sus inicios hasta la actualidad, para la evaluación, determinación y comparación de daño tisular, originado por exposición a contaminantes ambientales (Magnoni et al., 2023; Sobral dos Santos et al., 2023; Rašković et al., 2015; Liebel et al., 2013; Schmidt et al., 1999).

En el caso de los bazo, sólo se consideraron los recuentos totales de centros de melanomacrófagos (CMM) presentes en los mismos. La evaluación de otras alteraciones histológicas, así como el cálculo de índices histológicos estuvieron por fuera del alcance de este estudio. Los melanomacrófagos (MM) son un tipo característico de célula inmune en teleósteos, que se encuentran predominantemente en el bazo. Su conjunto y asociación se denomina centros de melanomacrófagos. Estas estructuras son ampliamente utilizadas como indicadores de contaminación en estudios ecotoxicológicos ya que su número y tamaño son susceptibles a alteraciones en condiciones de exposición a diversos tipos de contaminantes (Agius & Roberts, 2003).

**CAPÍTULO I\***

**EVALUACIÓN DE ALTERACIONES  
HISTOPATOLÓGICAS EN BRANQUIAS DE  
PECES MARINOS EXPUESTOS A  
CONTAMINACIÓN**

\*Parte de este capítulo fue publicado como:

-Novacovsky, G. N., Palacios, M. G., & Sueiro, M. C. (2021). Epitheliocystis in wild marine fishes and its relation with anthropogenic pollution. *Journal of Fish Biology*, 1–5. <https://doi.org/10.1111/jfb.14826>

-Novacovsky, G. N., Rubilar, T., & Sueiro, M. C. (2020). Primer registro de epitelocistis en dos especies de peces de arrecifes rocosos en golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina). *Naturalia Patagónica*, 16, 77–92.

### 3.1. Resumen

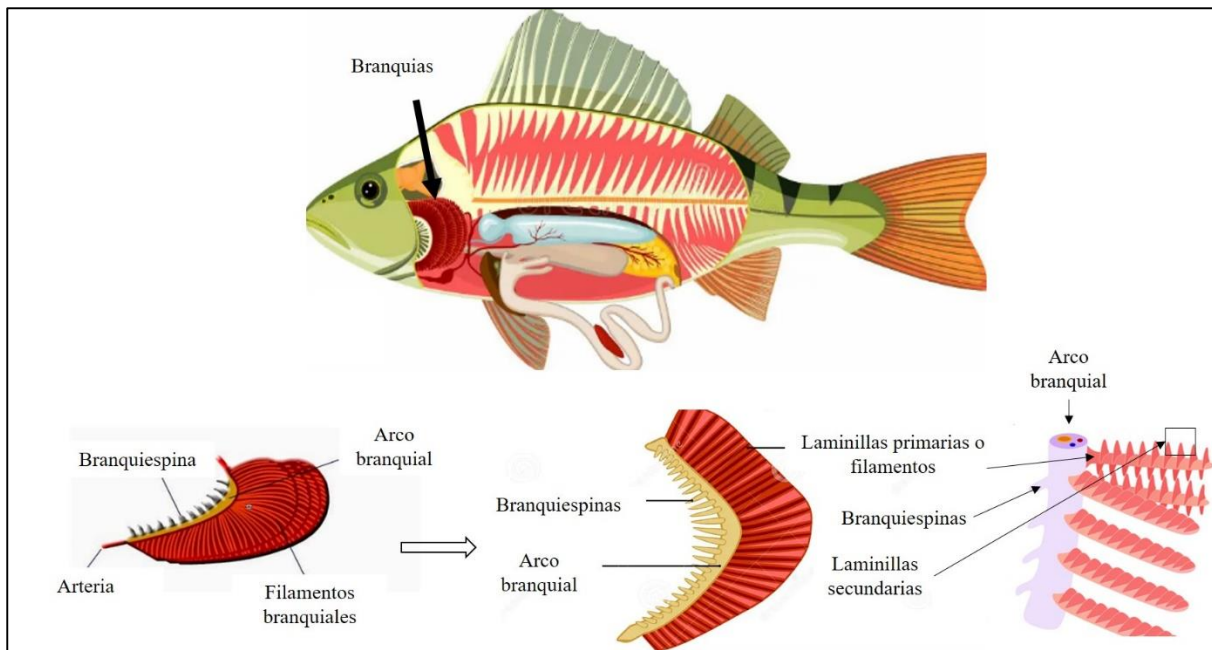
Las branquias de los peces, adaptadas para un eficiente intercambio de gases e iones, también actúan como principal vía de entrada de tóxicos y pueden ser severamente impactadas por los mismos debido a su gran superficie de contacto directo con el agua. Por ello, su estudio histopatológico permite evaluar el impacto de la contaminación y diagnosticar el estado de salud de los peces y su ambiente. En este capítulo se evaluaron los cambios histopatológicos en branquias de individuos de escrófalo *Sebastes oculatus* y turco *Pinguipes brasilians*, provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica y de sitios de referencia. Ambas especies mostraron principalmente lesiones histopatológicas de leves a moderadas (como levantamiento del epitelio, aneurismas lamelares y rupturas epiteliales), así como mayores índices histopatológicos de daño en los sitios expuestos a contaminación. Estos resultados evidencian que dos de las especies más representativas de los arrecifes Norpatagónicos presentan daños branquiales asociados a contaminantes, con posibles consecuencias fisiológicas que reflejan un estado de salud alterado. El uso de la histopatología resultó adecuada para diagnosticar estos efectos, destacando la importancia de su aplicación en el monitoreo ambiental de ecosistemas marinos afectados.

## 3.2. Introducción

### 3.2.1. Anatomía y función de las branquias

Los peces, al igual que los vertebrados terrestres, respiran oxígeno y liberan dióxido de carbono. El oxígeno que consumen se encuentra disuelto en el agua en concentraciones muy bajas, cerca del 1%, mientras que en el aire la concentración de oxígeno es del 21%. Para poder capturar este gas los peces tienen órganos especializados llamados branquias. Las branquias se encuentran en la cavidad faríngea, a ambos lados de la cabeza, por detrás de los ojos y delante de la aleta pectoral y se comunican con el exterior mediante las hendiduras branquiales (Fig. 1). En peces teleósteos las branquias están cubiertas por el opérculo, una placa cartilaginosa móvil que le otorga protección y una adecuada circulación del agua. Durante la respiración el pez mantiene cerradas las hendiduras branquiales y abre la boca, de manera tal que el agua entra a la cavidad bucal por succión. Posteriormente procede a cerrar la boca y el agua pasa a través de los filamentos branquiales, donde se produce el intercambio gaseoso gracias a un mecanismo de contracorriente con la sangre, siendo expulsada hacia el exterior (Genten et al., 2009; Hughes & Morgan, 1973). Además de permitir el intercambio de gases, estos órganos multifuncionales, están involucrados también en el transporte de iones, la regulación ácido-base y la excreción de desechos (Genten et al., 2009).

Macroscópicamente, las branquias de los teleósteos están compuestas por cuatro pares de arcos branquiales que se extienden desde el suelo hasta el techo de la cavidad bucal (Fig. 1). Asociados a estos arcos branquiales se ubican músculos abductores y aductores estriados, que facilitan el movimiento de las branquias hacia posiciones respiratorias favorables (Genten et al., 2009; Ferguson, 2006). En su parte anterior los arcos branquiales poseen una serie de proyecciones óseas y/o cartilaginosas llamadas branquiespinas, que clasifican y posicionan los alimentos antes de que pasen al esófago y luego al estómago o intestino. En su parte posterior cada arco branquial lleva una serie de filamentos u holobranquias formados por dos mitades, las hemibranquias. Cada hemibranquia posee múltiples subdivisiones finas denominadas filamentos o laminillas branquiales primarias. A su vez, cada uno de estos filamentos, posee una hilera de laminillas secundarias que corren a cada lado y perpendicularmente a su eje. En la superficie de estas laminillas secundarias tiene lugar el intercambio gaseoso y la combinación de todas estas estructuras especializadas, tiene como propósito, proporcionar una gran superficie de área para dicho intercambio (Genten et al., 2009).



**Figura 1.** Ubicación y estructura macroscópica branquial. Imagen modificada, obtenida de: <https://www.dreamstime.com>.

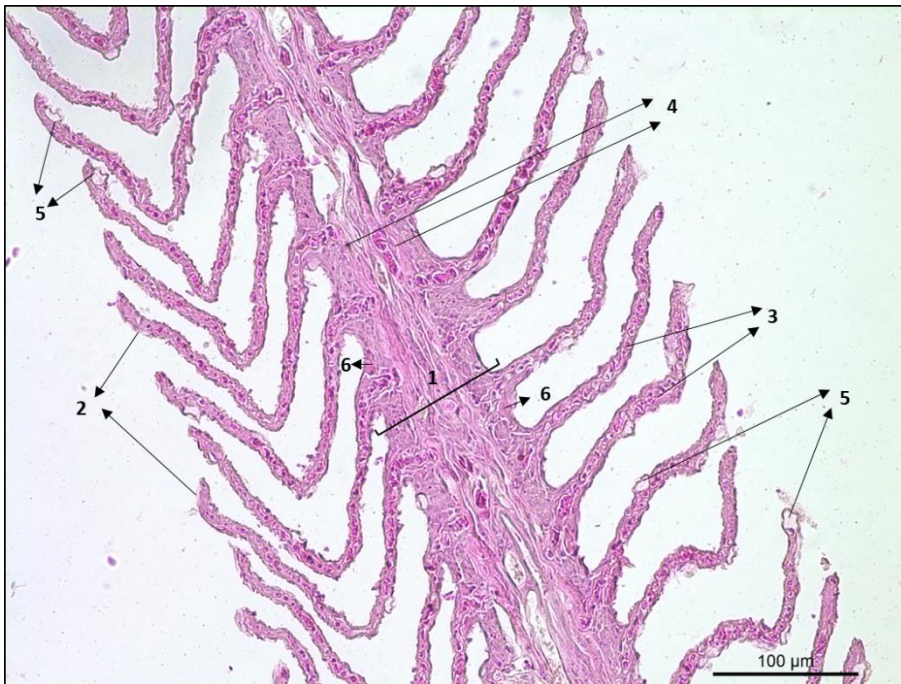
### 3.2.2. Histología de las branquias

Histológicamente, cada uno de los arcos branquiales posee un armazón de tejido óseo y/o cartilaginoso cubierto por tejido epidérmico plano y en su superficie interna una membrana serosa. Por ella discurren vasos sanguíneos aferentes, eferentes y nutricios, desde y hacia las branquias, que están involucrados en el intercambio gaseoso, así como en la perfusión sanguínea de la propia branquia (Genten et al., 2009; Ferguson, 2006). En las laminillas primarias también están presentes un núcleo de cartílago que les brinda soporte, las arteriolas filamentosas aferentes y eferentes, y otros vasos anastomosados que comprenden el seno venoso central (Fig. 2 y 3). Las laminillas primarias, están cubiertas por un epitelio, contiguo al de la cubierta de los arcos branquiales y al de la mucosa de la cavidad oral, y una lámina de tejido conectivo laxo (Fig. 3 y 4). En este epitelio, además de las células epiteliales planas, se encuentran células mucosas o caliciformes, secretoras de mucina, una proteína que participa en la regulación iónica y protección inmunológica, actuando como barrera contra agentes patógenos y sustancias tóxicas (Fig.3). Otro tipo celular presente en el intersticio filamentosos son los macrófagos que constituyen la primera línea de defensa lamelar. En la porción basal de las laminillas primarias, principalmente en la unión con las laminillas secundarias, se pueden observar células de cloro, también llamadas osmoreguladoras, por su rol clave en el intercambio iónico, y en procesos de aclimatación salina y desintoxicación (Genten et al., 2009; Hughes &

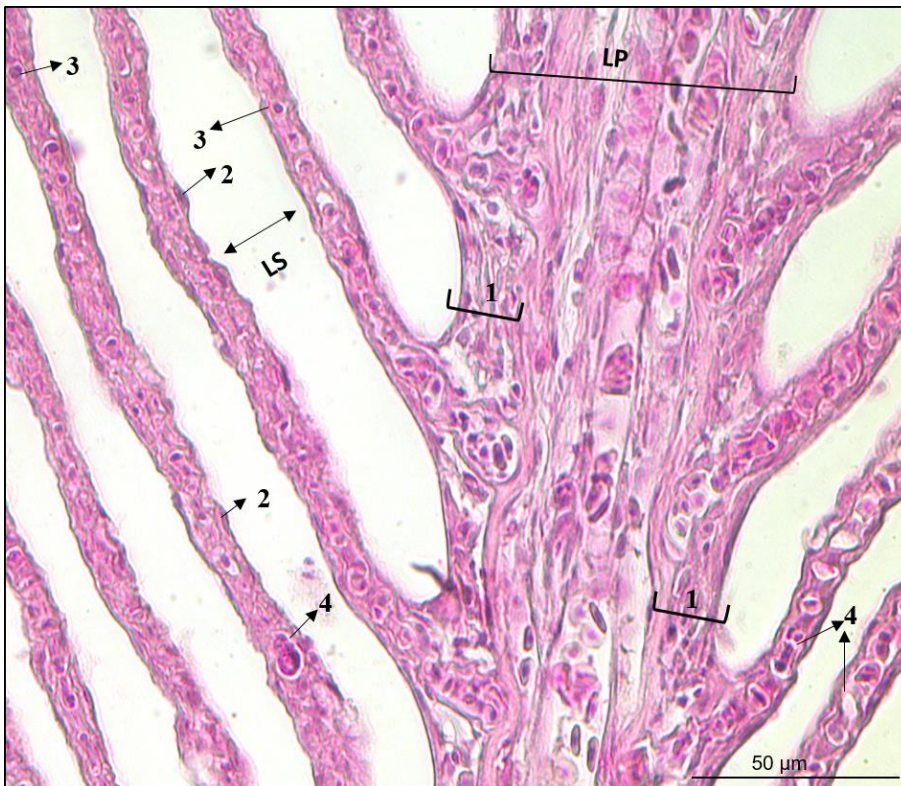
Morgan, 1973) (Fig. 3). Las laminillas secundarias (Fig. 2; 3 y 4), constituidas como evaginaciones del epitelio de las laminillas primarias, poseen una estructura histológica fundamental que consta de una única capa de células epiteliales planas superpuestas o interdigitadas sobre una membrana basal, sostenidas y separadas por células pilares dispuestas en filas (Fig. 4). Los espacios entre las células pilares, llamados lagunas, están colmados de eritrocitos y conectan las arteriolas aferentes y eferentes (Fig. 4). Las células pilares contráctiles, controlan el diámetro de las lagunas, regulando así el flujo sanguíneo y también tienen la función de soporte. En este epitelio también pueden encontrarse células caliciformes (Genten et al., 2009; Morrison, 2007).



**Figura 2.** Sección sagital a través de un filamento branquial normal de individuos de escrófalo (*S. oculatus*). Se observan numerosas laminillas secundarias paralelas y filiformes (1), dispuestas casi en ángulo recto con respecto al filamento (laminilla primaria). El esqueleto cartilaginoso, que soporta la lámina primaria, también es evidente (2).



**Figura 3.** Sección sagital de un filamento branquial normal de individuos de escófalo (*S. oculatus*). (1) Filamento branquial o laminilla primaria. (2) Laminillas secundarias con red capilar central. (3) Eritrocitos dentro del lumen capilar de las láminas secundarias. (4) Seno venoso central de la laminilla primaria con eritrocitos (sangre oxigenada). La dirección del flujo sanguíneo de las arteriolas aferentes a las eferentes es opuesta a la dirección del flujo de agua sobre las laminillas (intercambio a contracorriente). (5) Células mucosas. (6) Células de cloruro.



**Figura 4.** Porción de una sección sagital de una branquia de turcos (*P. brasiliensis*). Cada laminilla primaria (LP) está cubierta por un epitelio estratificado (1). Las laminillas secundarias (LS) están recubiertas por un delgado epitelio (2). Las células pilares de soporte (3) encierran los canales sanguíneos capilares (lagunas llenas de eritrocitos) (4).

### 3.2.3. Las branquias como órganos indicadores de contaminación

Las branquias de los peces han evolucionado para maximizar el intercambio de gases y el transporte de iones mediante la disposición morfológica de su tejido. De esta manera, la extensa superficie respiratoria de las laminillas, así como el amplio y delgado epitelio que perfila los filamentos, proveen una gran área de contacto entre los peces y el agua ambiental. Sin embargo, aunque esto facilita un intercambio eficiente de gases e iones, representa además una superficie de constante exposición a los tóxicos y patógenos que pueden estar presentes en el ambiente (Bonga & Lock, 2008). Dado que las branquias constituyen más del 50% del área de superficie de un pez y son los primeros órganos, junto con la piel, que entran en contacto con el agua, representan la principal vía de entrada de los tóxicos en el organismo (Playle, 1998), pudiendo, como consecuencia, presentar modificaciones en su estructura. Por ello, estos órganos son considerados primarios o blancos, y son útiles para evaluar el efecto de la contaminación sobre los peces (Poleksic & Mitrovic, 1994; revisado por Mallat, 1985). En particular, el estudio histopatológico de las branquias puede dar idea del grado de exposición a contaminantes y facilitar la detección de respuestas fisiológicas de los peces, estableciendo así un diagnóstico del estado general de salud tanto de los individuos como del ambiente (Silva et al., 2009). En este sentido, existen numerosos trabajos que analizan la exposición de peces a contaminantes a través de los cambios histopatológicos branquiales, bajo distintas condiciones y ambientes. Por ejemplo, Fonseca et al. (2016) en Portugal, encontraron mayor extensión y severidad de lesiones histopatológicas en branquias, así como mayor prevalencia de individuos afectados, en barbo común *Luciobarbus bocagei* y boga *Pseudochondrostoma sp.* que habitan sectores de río con mayor contaminación. Del mismo modo, en Macedonia, individuos de carpa *Squalius vardarensis*, la prevalencia, extensión y reversibilidad de las alteraciones histopatológicas en las branquias reflejaron diferencias en los niveles de contaminación de los ríos, siendo mayores en individuos provenientes de ríos con niveles más elevados de contaminantes (Barišić et al., 2015). En condiciones controladas se observó que a concentraciones crecientes de arsénico, individuos de tilapia *Oreochromis mossambicus* mostraron diversas alteraciones histopatológicas en las branquias, con una variación dosis-pendiente respecto del tipo, extensión y severidad de las mismas, mientras que los individuos control no presentaron alteraciones (Ahamed et al., 2013). Por su parte, Hasan et al. (2022), en Bangladesh, evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de hidrocarburos sobre branquias de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*, registrando que los individuos expuestos presentaban alteraciones de distinto tipo y severidad,

respecto de los individuos control. A su vez, determinaron que la reversibilidad de las alteraciones resultó dosis dependiente en la mayoría de los casos. Para Sudamérica también existen diversos estudios donde la histología branquial constituye un indicador de contaminación. En Brasil por ejemplo, en condiciones naturales, Santos et al. (2014) reportaron lesiones histológicas en branquias de róbalo común *Centropomus undecimalis* y sardina *Sardinella sp* que habitan lagunas expuestas a mezclas de contaminantes no específicos. También en Brasil y en condiciones naturales, se registraron alteraciones histopatológicas en 5 especies de peces (de diferentes niveles tróficos) provenientes de estuarios que históricamente han sido afectados por la contaminación por mercurio y la industria azucarera (Sobral dos Santos et al., 2023). En Argentina, se han realizado trabajos sobre especies de agua dulce, como por ejemplo en sistemas lagunares con contaminantes orgánicos persistentes (COP). Ballesteros et al. (2017b) registraron alteraciones histopatológicas en branquias de pejerrey *Odontesthes bonariensis* y encontraron índices histopatológicos más altos en tejido branquial de individuos expuestos a niveles más elevados de COP. Leone et al. (2018) reportaron que *O. bonariensis* provenientes de embalses con mayor contaminación presentan mayores prevalencias de lesiones e índices de alteraciones histopatológicas que los individuos que habitan embalses con menor contaminación. De igual manera, Troncoso et al. (2012) registraron que sábalos *Prochilodus lineatus*, provenientes de sectores contaminados de cuencas fluviales presentan altos índices de alteraciones histopatológicas y alteraciones morfométricas en sus branquias respecto de los individuos que habitan zonas prístinas. En condiciones controladas, Ossana et al. (2019) expusieron a madrecitas de agua *Cnesterodon decemmaculatus* a aguas receptoras de un río altamente contaminado, encontrando diferencias estructurales en las branquias en individuos expuestos respecto de los controles.

#### 3.2.4. Síntesis y objetivos de este capítulo

Los ejemplos expuestos evidencian que para distintas especies de peces, las alteraciones histopatológicas en branquias son una respuesta frecuente a condiciones de exposición a una amplia variedad de contaminantes, tanto en condiciones naturales como experimentales y ya sea de forma aguda o crónica. Si bien la mayoría de los trabajos que se encuentran en la literatura se han realizado en el hemisferio norte y con especies de interés comercial, es evidente que para nuestro hemisferio existe una creciente tendencia de estudios evaluando, en especies propias de esta región, los efectos de la contaminación sobre el estado histopatológico de las branquias. En este contexto, el objetivo

que se presenta en este capítulo es evaluar los cambios histopatológicos en branquias de dos especies marinas que integran el ensamble de peces de arrecifes Norpatagónicos, el escrófalo *Sebastes oculatus* y el turco *Pinguipes brasilianus*. Para ello, se estudió y comparó la histología de las branquias de individuos provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica y de sitios de referencia. Los resultados obtenidos aportan información sobre el estado de salud de estos organismos, lo que a su vez podría reflejar las condiciones ambientales del sistema acuático bajo estudio.

### 3.3. Metodología

Se procesaron histológicamente un total de 58 arcos branquiales. Los preparados se observaron en microscopio óptico LEICA DM2500 con cámara de fotos incorporada (DFC 450C) con aumentos de 10x, 20x y 40x de magnificación. Los mismos fueron evaluados en una primera instancia para realizar descartes por fallas que pudiesen haber sucedido durante la toma de muestra y/o el procesamiento histológico (conservación; tinción, corte, montaje, etc) (total descartes=1; quedando un n final de *Pinguipes brasilianus*=21 y *Sebastes oculatus*=36). Luego se procedió a realizar el análisis histológico y recuento de patologías. Los datos obtenidos se analizaron como se detalla a continuación.

#### 3.3.1. Análisis histopatológico

Para cada especie y por sitio, se determinó la distribución de las lesiones halladas mediante el cálculo de la frecuencia con la que se presentó cada tipo de lesión sobre el total de tipo de lesiones registradas. Por otro lado, para cada alteración histopatológica se calcularon las tasas de prevalencia como el número de individuos que presenta la alteración sobre el total de individuos observados.

La condición histopatológica de las branquias fue establecida para ambas especies siguiendo el método semicuantitativo propuesto por Bernet et al. (1999) (ver detalles en Metodología general). Las patologías se clasificaron en cinco patrones de reacción (PR): circulatorios, progresivos, regresivos, inflamatorios y neoplásicos, cada patrón engloba distintas alteraciones patológicas. Luego, a cada alteración encontrada se le asignó un **factor de importancia**, que determina la relevancia de la lesión dependiendo de cómo afecta la función de las branquias y la capacidad de los peces para revertir las mismas. El factor de importancia puede tomar tres valores, I: alteración con importancia patológica mínima, la lesión es fácilmente reversible cuando finaliza la exposición a irritantes; II: alteración con importancia patológica moderada, la lesión es reversible en la mayoría de los casos si se neutraliza el factor estresante; y III: alteración de marcada importancia patológica, la lesión es generalmente irreversible, conduciendo a la pérdida parcial o total de la función del órgano. También se asignó un **valor de puntuación** según el grado y extensión de la alteración patológica. El valor de puntuación puede ser cualquier número comprendido entre el 0 y el 6 e indican 0: sin alteraciones patológicas; 1 y 2: ocurrencia muy leve y leve; 3: ocurrencia algo moderada; 4 y 5: ocurrencia severa y muy severa y 6: aparición grave (lesión difusa) (Tabla I). Con

los factores de importancia y los valores de puntuación establecidos se calcularon los siguientes índices:

1) **Índice de la branquia ( $I_{brq}$ )**. Este índice representa el grado de daño total en cada branquia. Es la suma de las multiplicaciones de los factores de importancia y los valores de puntuación de todos los cambios histológicos encontrados dentro de la branquia examinada. Un índice alto indica un alto grado de daño. El cálculo de este índice permite comparar el grado de daño de un mismo órgano en diferentes individuos.

$$I_{brq} = \sum_{pr} \cdot \sum_{alt} (a_{brq,pr,alt} \times W_{brq,pr,alt})$$

Donde, brq: branquias (constante), pr: patrón de reacción, alt: alteración, a: valor de puntuación, W: factor de importancia.

2) **Índice de reacción de las branquias ( $I_{brq\ pr}$ )**. La calidad de las lesiones en una branquia se expresa mediante este índice de reacción. Se calcula mediante la suma de las multiplicaciones de los factores de importancia y los valores de puntuación de las alteraciones del patrón de reacción correspondiente. La suma de los cinco índices de reacción de un órgano equivale al índice de órgano

$$I_{brq\ pr} = \sum_{alt} (a_{brq,pr,alt} \times W_{brq,pr,alt})$$

Donde, brq: branquias (constante), pr: patrón de reacción, alt: alteración, a: valor de puntuación, W: factor de importancia.

### 3.3.2. Parásitos metazoos y quistes bacterianos

Para cada individuo se registró el número total de parásitos y quistes bacterianos presentes sobre la superficie total de cada preparado histológico. En el caso de los ectoparásitos se los clasificó hasta nivel de clase. En el caso de quistes bacterianos se categorizó la presencia (individuos identificados como positivos) o su ausencia (individuos identificados como negativos).

### 3.3.3. Tasa de prevalencia, intensidad y abundancia

Para los parásitos metazoos y los quistes bacterianos, las prevalencias fueron definidas como el número de individuos infectados para cada caso sobre el total de individuos examinados. Estas tasas fueron calculadas por sitio y por especie. Los valores fueron expresados en porcentaje. Además para los parásitos se calculó la abundancia media como el número total de parásitos dividido el número

total de individuos examinados (incluyendo a los no infectados). Para los quistes bacterianos se calculó la intensidad individual como la cantidad de quistes por sección analizada sólo en individuos infectados.

#### 3.3.4. Análisis estadísticos

Las posibles diferencias de los índices calculados entre individuos provenientes de sitios expuestos y control se evaluaron mediante test de ANCOVA de un factor, donde se estableció como factor fijo el sitio (con dos niveles: EXP, expuesto; REF, referencia) y como covariable el largo total (LT), debido a que la talla puede influir en los parámetros estudiados. Los análisis se hicieron para cada especie por separado. La normalidad y homocedacea de las variables fueron examinadas mediante los tests de Kolmogorov y de Levene respectivamente. Los índices de reacción circulatorios ( $I_{brq\ circ}$ ) y progresivos ( $I_{brq\ prog}$ ) para ambas especies, así como el índice branquia ( $I_{brq}$ ) en turcos cumplieron los supuestos para análisis paramétricos. En el caso de los índices de reacción regresivos ( $I_{brq\ reg}$ ) para ambas especies y el índice branquia ( $I_{brq}$ ) para escrófalos se aplicó la transformación  $\text{Log}_{10}(\text{variable}+1)$ . Los índices de reacción inflamatorios ( $I_{brq\ inf}$ ) para ambas especies no se ajustaron a los supuestos incluso después de la transformación (variables muy asimétricas) y, por lo tanto, se analizaron mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney.

La prevalencia de parásitos y quistes bacterianos se analizaron mediante pruebas de Chi cuadrado y la abundancia parasitaria mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney.

En todos los casos los resultados fueron considerados como significativos a un  $p < 0.05$ . Todos los análisis fueron desarrollados utilizando el programa SPSS 15.0.

**Tabla I.** Herramientas de evaluación histopatológica para branquias en relación a los patrones de reacción, a la unidad funcional del tejido analizada y a categorías generales de alteraciones, con sus factores de importancia correspondientes según Bernet et al. (1999).

<b>Patrón de reacción</b>	<b>Unidad funcional de tejido</b>	<b>Alteración</b>	<b>Factor de importancia</b>
Disturbios Circulatorios		Hemorragia	I
		Hiperemia	I
		Congestión	I
		Aneurisma/Talangiectasia	I
Cambios Regresivos	Epitelio	Alteraciones de arquitectura y estructura	I
		Alteraciones plasmáticas	I
		Depósitos	I
		Alteraciones nucleares	II
		Atrofia	II
		Necrosis	III
	Tejido de soporte	Alteraciones de arquitectura y estructura	I
		Alteraciones plasmáticas	I
		Depósitos	I
		Alteraciones nucleares	II
		Atrofia	II
		Necrosis	III
Cambios progresivos	Epitelio	Hipertrofia	I
		Hiperplasia	II
	Tejido de soporte	Hipertrofia	I
		Hiperplasia	II
Disturbios inflamatorios		Exudado	I
		Infiltrado	II
Tumores		Tumores benignos	II
		Tumors malignos	III

### 3.4. Resultados

Para ambas especies, la estadística descriptiva de los parámetros determinados se encuentra en la Tabla I en el Anexo Tabla adicional y Abreviaturas. En la misma se detallan los números de muestras utilizados, promedios, medianas, desvío estándar, mínimos y máximos de los datos morfométricos, de la extensión de cada alteración histológica y de los índices de Bernet et al. (1999) calculados.

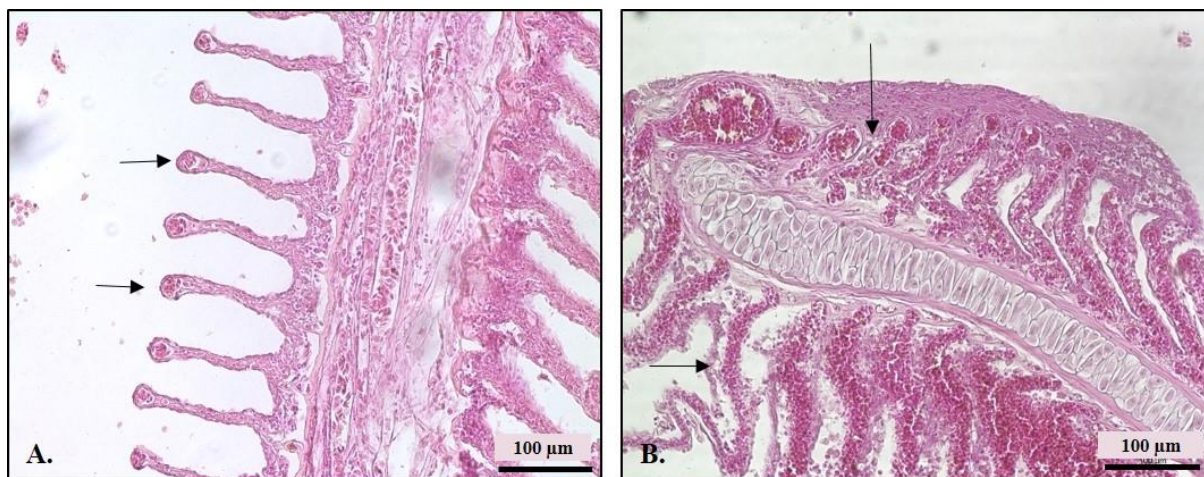
#### 3.4.1. Análisis histopatológico

Para ambas especies se registraron un total de 14 lesiones histológicas tanto en sitios de referencia como expuestos, con excepción de la hiperplasia de células de cloruro que sólo fue registrada en individuos provenientes de sitios expuestos a contaminación. Las alteraciones encontradas se correspondieron con los patrones de reacción circulatorio, progresivo, regresivo e inflamatorio, no habiéndose registrado lesiones incluidas en el patrón neoplásico. Las mismas se describen a continuación según el patrón de reacción en el que se incluyen:

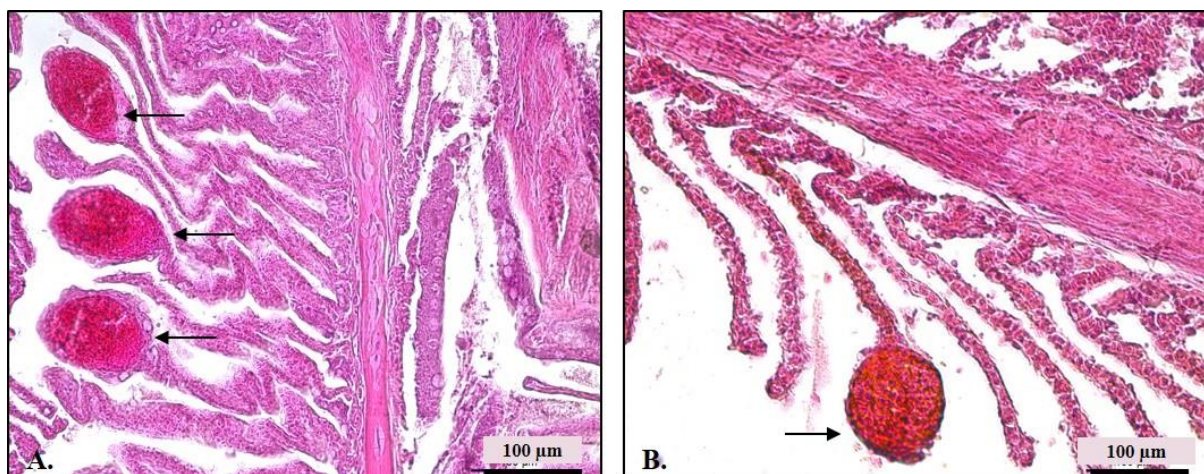
##### Patrón de reacción circulatorio:

**Congestión:** Se observó dilatación de los capilares laminillares con células sanguíneas estancadas en su interior, en algunos casos además se observó extravasación de glóbulos rojos. La congestión se registró asociada a edema y telangiectasia en múltiples casos. Esta lesión posee un factor de importancia grado I, es decir, con importancia patológica mínima (afección de la funcionalidad de la branquia) y la lesión puede revertirse cuando finaliza la exposición a irritantes (Fig. 5).

**Telangiectasia o aneurisma:** esta alteración en el sistema venoso, que se da como resultado de la vasodilatación, colapso de las células pilares y ruptura de la integridad vascular, se observó como dilataciones bien delimitadas de los vasos sanguíneos arteriales, con sangre acumulada y estancada en su interior. Se la registró principalmente en el extremo distal de la laminilla secundaria (punta) y asociada a la congestión y/o hemorragia en múltiples casos. Esta alteración posee un factor de importancia grado I, pero podría pasar a ser II según el grado de desarrollo y extensión de la misma, es decir, con importancia patológica moderada y la lesión podría revertirse en algunos casos si se neutraliza el factor estresante (Fig. 6).



**Figura 5.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos (A) escrófalo (*S. oculatus*) indicando congestión en puntas laminillares secundarias (flechas) y (B) turco (*P. brasilianus*) indicando congestión en epitelio distal de la laminilla primaria (flechas).



**Figura 6.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos (A) escrófalo (*S. oculatus*) y (B) turco (*P. brasilianus*) indicando telangiectasias que afectan la punta de las laminillas secundarias (flechas).

Patrón de reacción progresivo:

Hiperplasia y/o hipertrofia de células mucosas: se observó como incremento en el número y/o tamaño de las células mucosas presentes en el epitelio. En casos severos pudo observarse un reemplazo casi total de las células epiteliales por las mucosas. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 7).

Hipertrofia epitelial: se observó como un aumento en el grosor del epitelio que recubre las laminillas primarias y/o secundarias, ocasionado por el aumento del tamaño de las células epiteliales. Esta alteración posee un factor de importancia grado I (Fig. 8).

Hiperplasia epitelial: se observó como un aumento en el grosor del epitelio que reviste las laminillas primarias y secundarias, ocasionado por un aumento en el número de células epiteliales. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 8).

Hiperplasia en las puntas de las laminillas secundarias (también llamadas *clubbing tips*): particularmente en los extremos distales de las laminillas secundarias (puntas), se observó una hiperplasia severa, con crecimiento excesivo del tejido epitelial. En los casos más severos en los que se presentó esta lesión, pudo evidenciarse fusión entre las puntas de las laminillas e incluso pérdida de arquitectura normal y degeneración del tejido. Esta alteración posee un factor de importancia grado II pero puede pasar a III dependiendo de la severidad del caso (Fig. 9).

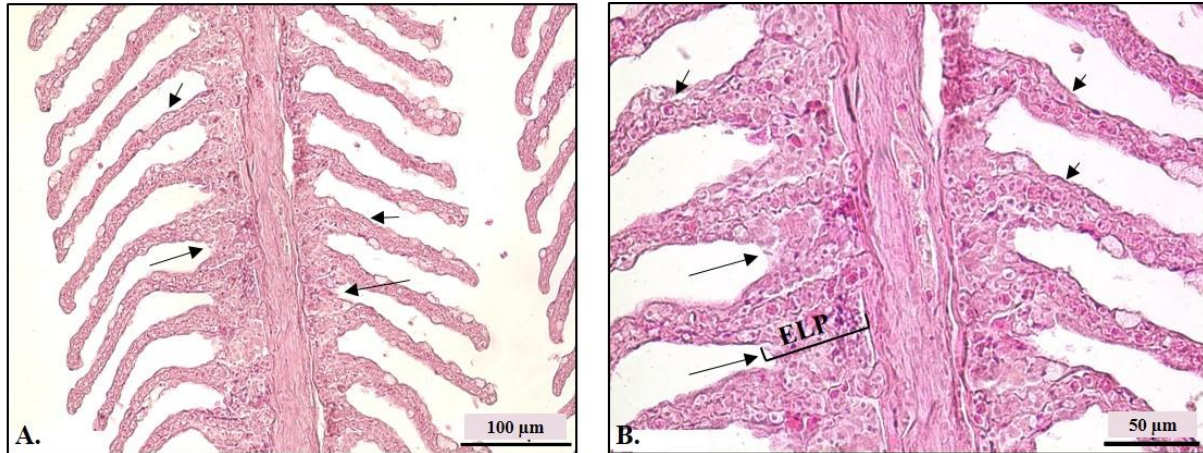
Fusión laminillar: Se observó cómo las laminillas secundarias se fusionan entre sí desde sus puntas, su base o parte media (fusión parcial) y/o se fusionan completamente, en toda su extensión, dando lugar a la fusión severa o total (metaplasia). Se registró sobre las laminillas secundarias, principalmente en zonas que presentaban hiperplasia epitelial en laminillas primarias. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 10).

Metaplasia: se observó como una fusión total y severa de las laminillas secundarias. Se distinguieron dos tipos de metaplasias, la mucosa, en la que se observó células mucosas como tipo celular predominante sobre la superficie de la fusión y la metaplasia escamosa, similar a una fusión total, pero las células superficiales son planas y no están presentes las células mucosas. Además en algunos casos pudo observarse atrofia o ausencia de capilares laminillares. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 11).

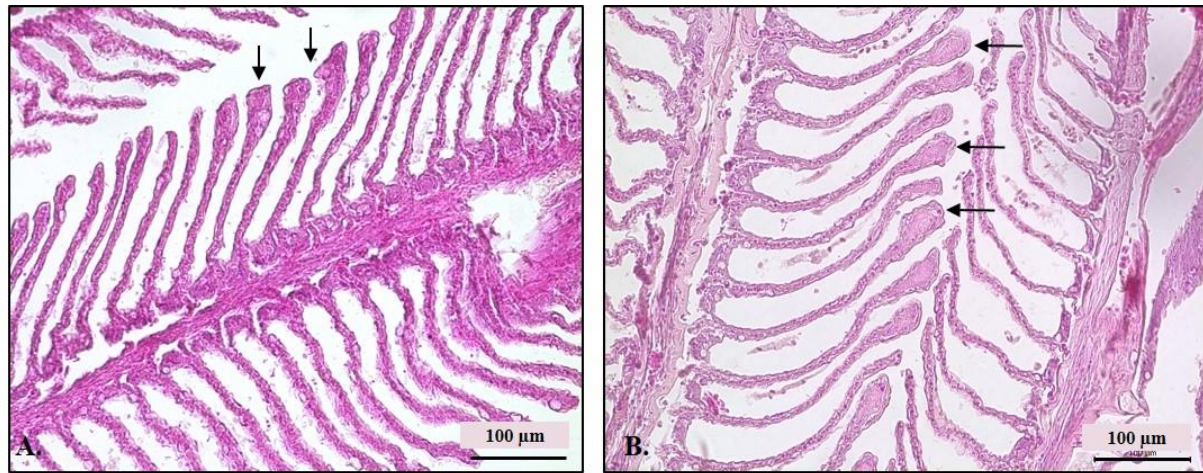
Hipertrofia y/o hiperplasia de células de cloruro: se observó como un aumento de tamaño de células de cloro presentes en el filamento. También pero menos frecuente, se observó un aumento en el número de las mismas. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 12).



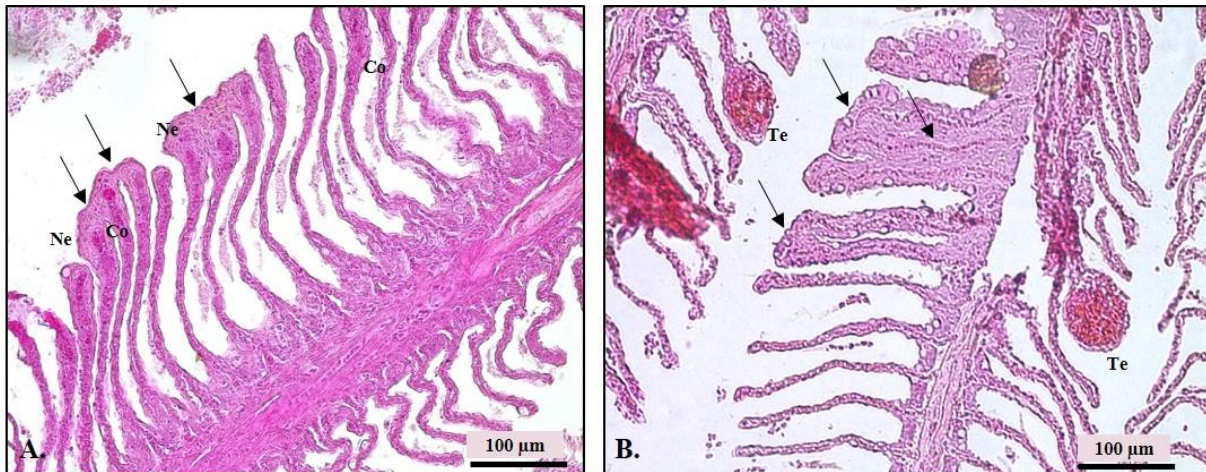
**Figura 7.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de escrófalos (*S. oculatus*) muestreados en (A) sitio de referencia, sin alteraciones histológicas y (B) en sitio expuesto, indicando hiperplasia e hipertrofia de células mucosas en las laminillas primarias y principalmente en las laminillas secundarias (flechas).



**Figura 8.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*) con aumento de (A) 20x y (B) 40x. Las flechas largas indican aumento en el grosor del epitelio que reviste las laminillas primarias (ELP) y las flechas cortas indican aumento del epitelio respiratorio en las laminillas secundarias, a causa de hiperplasia e hipertrofia de células epiteliales.



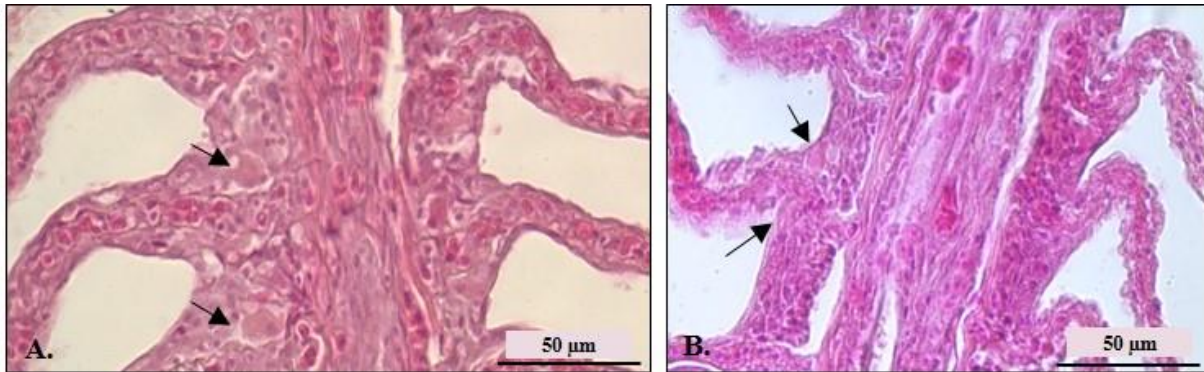
**Figura 9.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) turco (*P. brasiliensis*) y (B) escrófalo (*S. oculatus*). Las flechas indican hiperplasia e hipertrofia epitelial en las puntas laminillares secundarias (flechas).



**Figura 10.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) turco (*P. brasiliensis*) y (B) escrófalo (*S. oculatus*). Se indican fusiones en las laminillas secundarias iniciadas desde (A) las puntas y desde (B) el epitelio de revestimiento de la laminilla primaria (flechas). Además puede observarse congestión (Co), necrosis (Ne) y telangiectasias (Te).



**Figura 11.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) escrófalo (*S. oculatus*) indicando metaplasia escamosa (flecha) y de (B) turco (*P. brasilianus*) indicando metaplasia mucosa (flecha). Además pueden observarse fusiones casi completas (Fu).



**Figura 12.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) escrófalo (*S. oculatus*) y de (B) turco (*P. brasilianus*) indicando hipertrofia de células de cloruro (flechas).

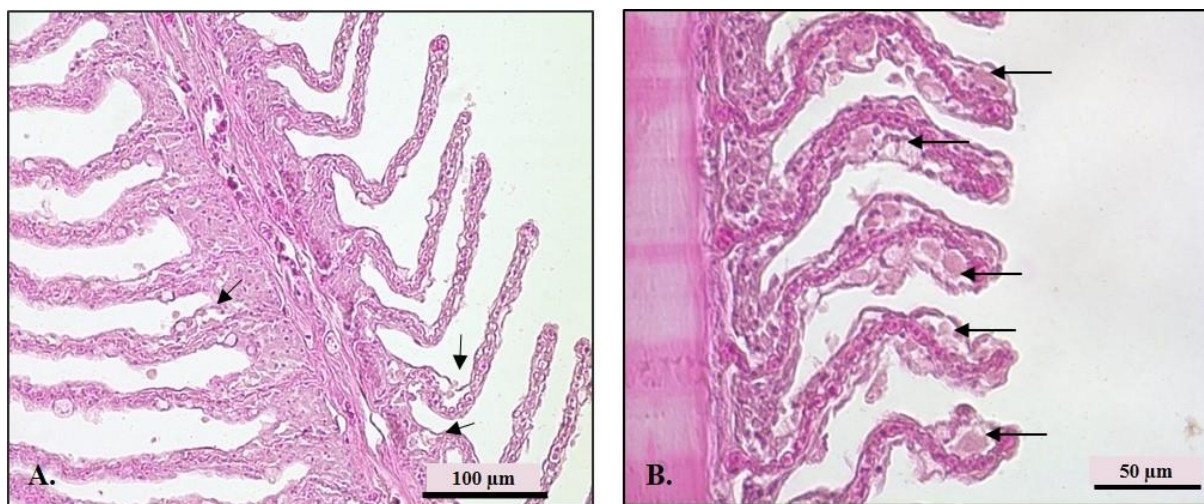
#### Patrón de reacción regresivo:

Levantamiento o *lifting* del epitelio: se evidenció como el levantamiento y/o desprendimiento de las células epiteliales de las laminillas branquiales secundarias y las zonas interlamelares. En casos severos se observó ruptura del epitelio y pérdida de estructura. Esta alteración posee un factor de importancia grado I, pero puede considerarse grado II según la gravedad del caso (Fig. 13).

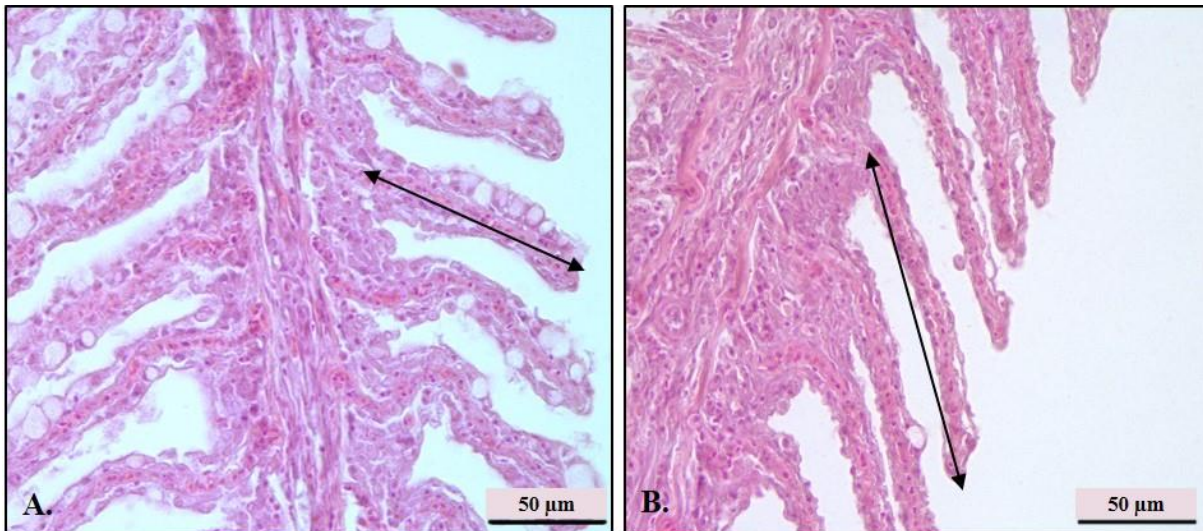
Acortamiento o atrofia laminillar: se observó como un acortamiento en el largo de las laminillas secundarias ocasionado por la reducción del número y volumen de las células y/o disminución de la cantidad de componentes intracelulares. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 14).

Necrosis: este estado morfológico de una célula o tejido, que aparece tras una pérdida irrevocable de la función, se caracterizó por un daño estructural irreparable en el tejido o un reemplazo del mismo por tejido conectivo (fibrosis). Esta alteración posee un factor de importancia grado III, es decir, posee marcada importancia patológica, es generalmente irreversible y conduce a la pérdida parcial o total de la función del órgano (Fig. 15).

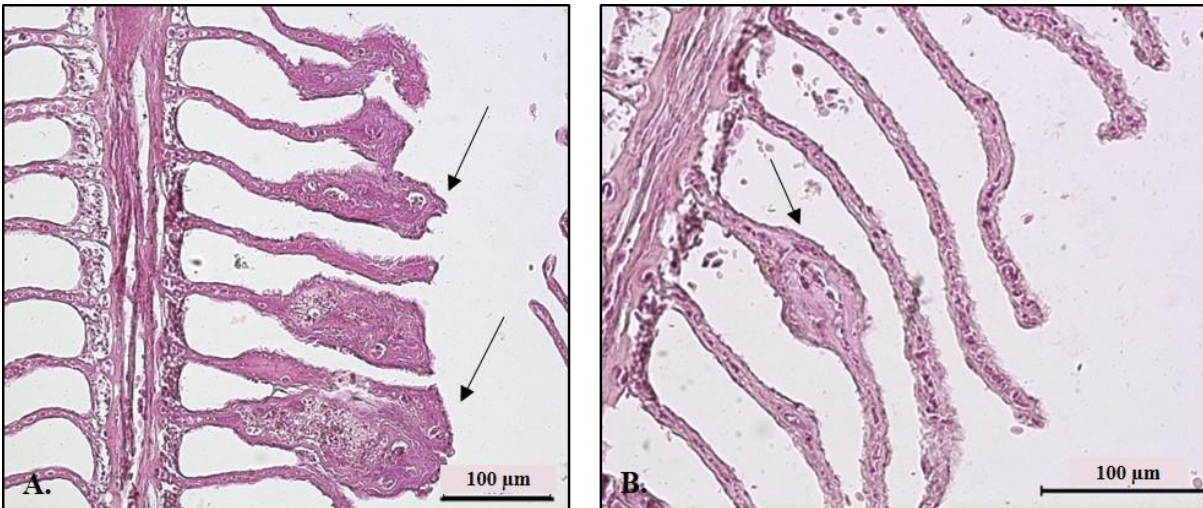
Edema: se observó como líquido tisular claro (que se ha filtrado desde los capilares al tejido), frecuentemente rosado, estancado en el intersticio tisular. En ocasiones pudo observarse que la presencia de edema provocó la separación del epitelio laminar de los capilares y células pilares (levantamiento o lifting del epitelio). Esta alteración posee un factor de importancia grado I (Fig. 13).



**Figura 13.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*) indicando (A) edema y levantamiento del epitelio respiratorio leve y (B) severo.



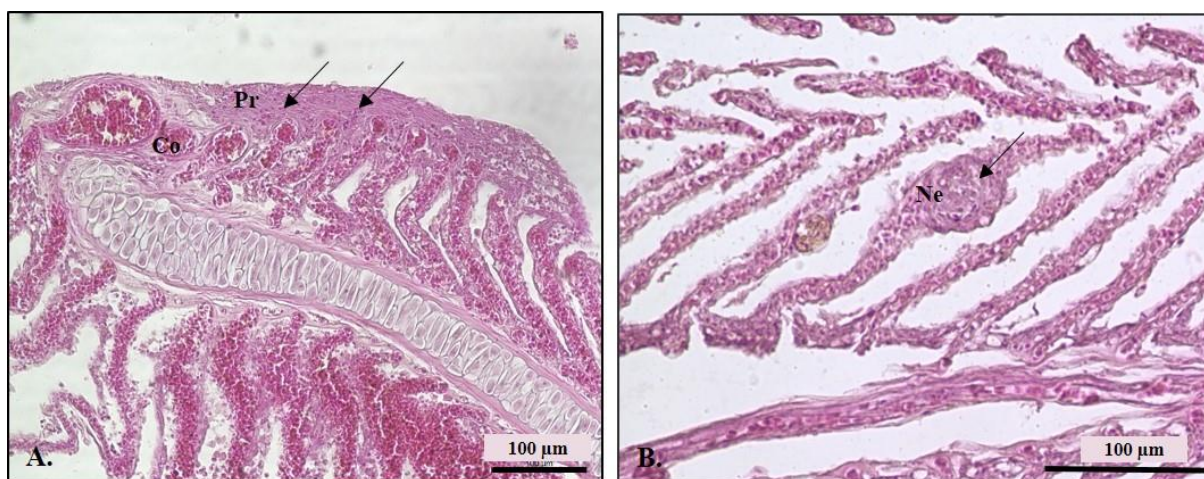
**Figura 14.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de un individuo expuesto de escrófalo (*S. oculatus*) indicando (A) acortamiento laminillar y (B) laminillas del mismo individuo de tamaño conservado (flechas).



**Figura 15.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) escrófalo (*S. oculatus*) y de (B) turco (*P. brasiliensis*) indicando necrosis con degeneración de tejido e infiltrado inflamatorio (flechas).

#### Patrón de reacción inflamatorio:

Infiltrado leucocitario: se observaron leucocitos que penetraron las paredes de los vasos sanguíneos e infiltraron el tejido circundante. Comúnmente se observaron asociados con inflamación e hiperplasia. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 17).

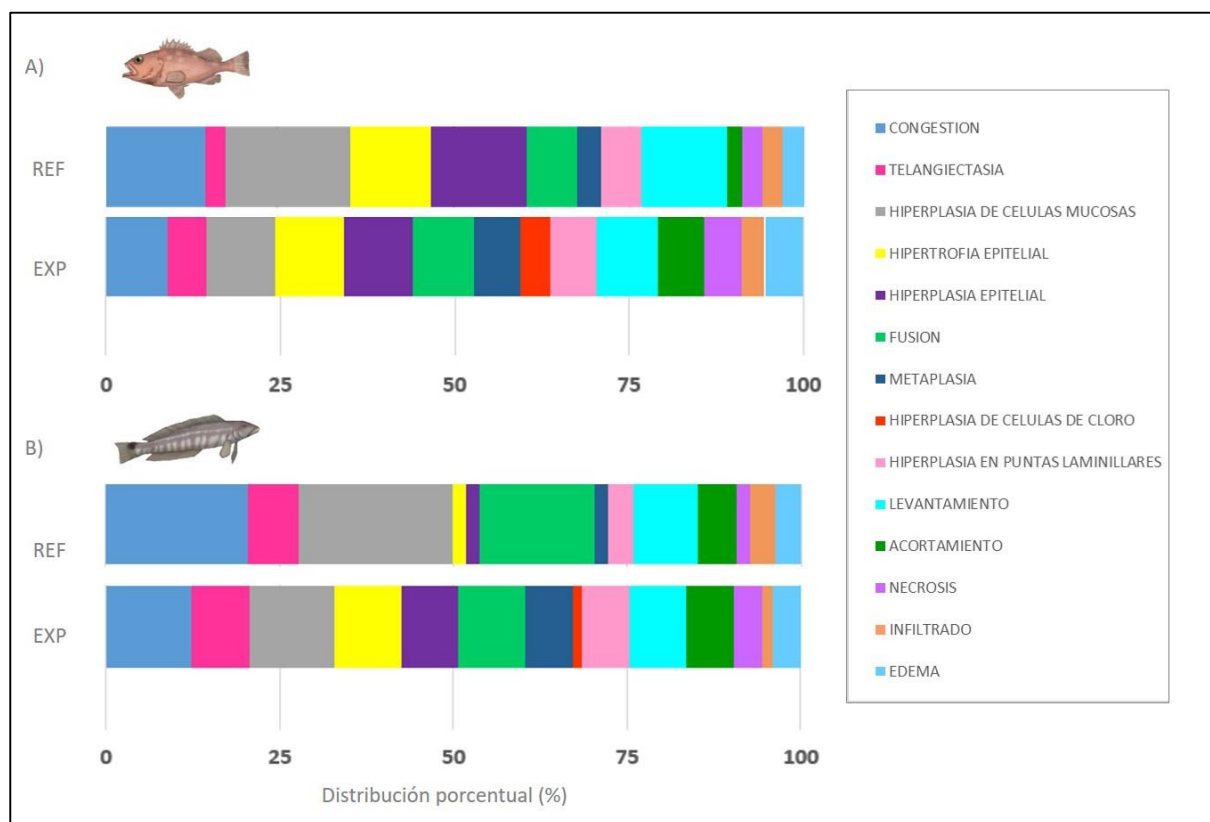


**Figura 17.** Cortes histológicos de filamentos branquiales de individuos expuestos de (A) turco (*P. brasiliensis*) y de (B) escrófalo (*S. oculatus*) indicando los puntillados de infiltrado inflamatorio (flechas). Se observa además congestión (Co), proliferación del epitelio de revestimiento del filamento (Pr) y necrosis localizada (Ne).

### 3.4.2. Distribución de lesiones histológicas

La distribución de las lesiones presentes para cada especie y sitio puede observarse en la Fig. 18. Para ambas especies los individuos provenientes de sitios control tendieron a una distribución de frecuencia de lesiones más irregular, mientras que los gráficos para los individuos de sitio expuestos sugieren una distribución uniforme. Para los individuos control, de ambas especies, las lesiones más frecuentes estuvieron incluidas en los patrones de reacción circulatorio y progresivo, mientras que en los individuos expuestos estuvieron en los patrones circulatorio, progresivo y también en el regresivo. Respecto de los escrófalos control, las cuatro lesiones más frecuentes representaron casi el 60% de la totalidad de las mismas y fueron hiperplasia de células mucosas (17,73%), congestión (14,89%), hiperplasia epitelial (13,47 %) e hipertrofia epitelial (11,35%). De las 10 lesiones restantes, tres representaron menos del 10% y siete representaron menos del 5% de la totalidad, entre ellas, las menos frecuentes fueron el acortamiento lamelar (2,13%) y la hiperplasia de células de cloruro, que no fue encontrada en escrófalos control. En el caso de los escrófalos expuestos, las lesiones registradas mostraron frecuencias de 0 a 10%, siendo las predominantes la hiperplasia de células mucosas, hipertrofia e hiperplasia epitelial (9,89% cada una) y congestión, fusión y levantamiento (8,79% cada una). Mientras que de las ocho lesiones restantes reportadas, seis representaron menos del 7% y dos de ellas (hiperplasia de células de cloruro e infiltrado leucocitario) menos del 5% de la totalidad de las lesiones.

Con respecto a los turcos, para los individuos control las tres lesiones más frecuentes representaron el 60% de la totalidad y fueron hiperplasia de células mucosas (22,22%), congestión (20,37%) y fusión (16,67%). Mientras que de las 11 lesiones restantes, tres representaron menos del 10% y ocho menos del 5% de la totalidad, entre las cuales, las menos frecuentes fueron hipertrofia epitelial, metaplasia y necrosis (1,85% cada una) y la hiperplasia de células de cloruro, que no fue registrada en turcos control. En el caso de los turcos provenientes de sitios expuestos las lesiones que representaron el 70% del total fueron congestión e hiperplasia de células mucosas (12,33%), hipertrofia epitelial y fusión (9,59% cada una) y telangiectasia, hiperplasia epitelial y levantamiento (8,22% cada una). Mientras que, las siete lesiones restantes registradas representaron menos del 10% de la totalidad de las lesiones.

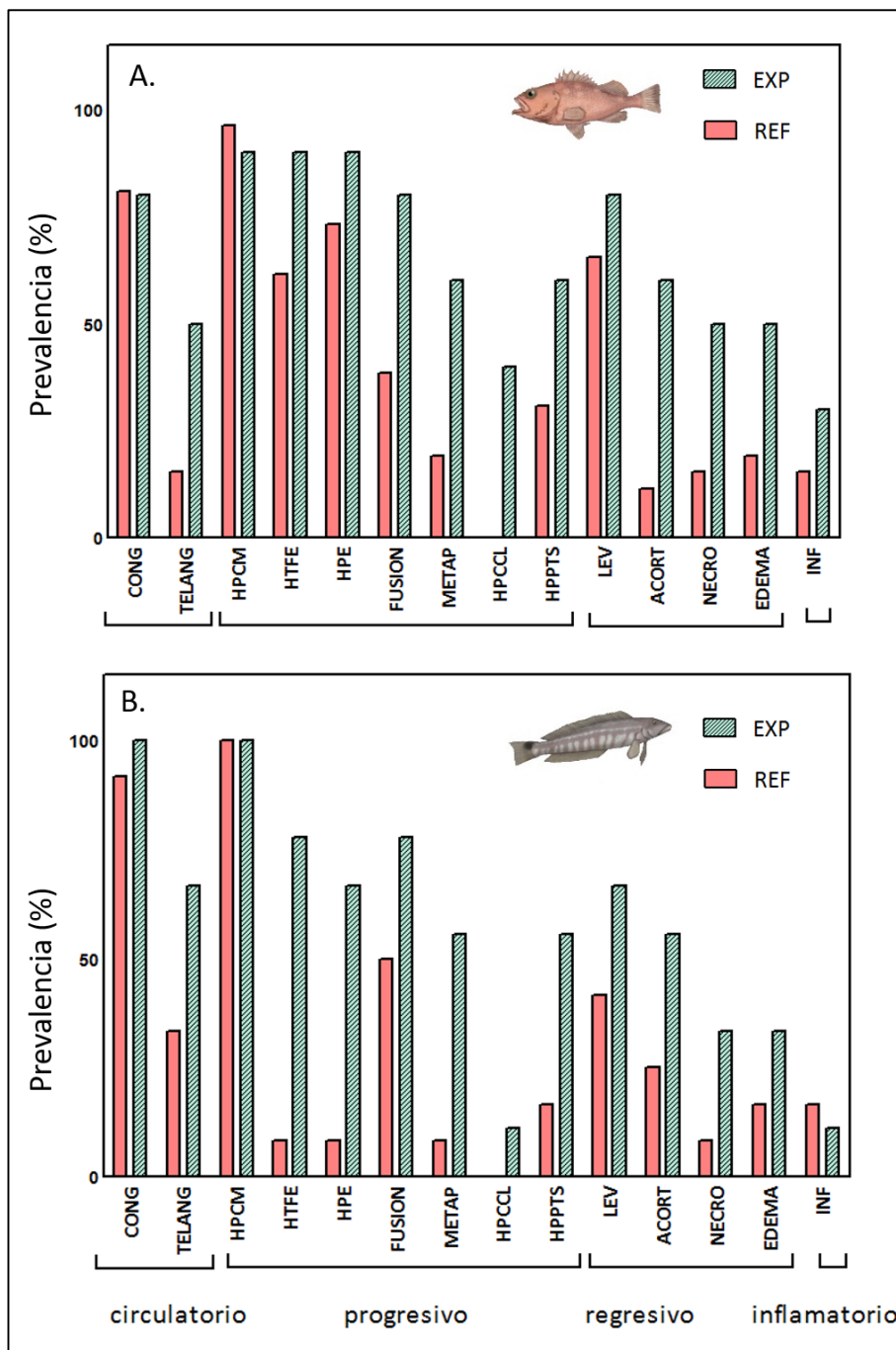


**Figura 18.** Distribución porcentual de las lesiones histopatológicas registradas en (A) esdrófalos (*S. oculatus*) y (B) turco (*P. brasiliensis*) provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica (EXP) y de sitios de referencia (REF).

### 3.4.3. Prevalencias de lesiones histológicas

Las prevalencias (número de individuos afectados con la lesión sobre el total de individuos examinados) de las alteraciones histológicas registradas en las branquias de escrófalos y turcos de sitios de referencia y expuestos se encuentran detalladas en la Fig. 19. Las patologías con mayor prevalencia en ambas especies y sitios correspondieron a los patrones circulatorio, progresivo y regresivo. Para los escrófalos control las lesiones más prevalentes (>50%) fueron hiperplasia de células mucosas (96%), congestión (80%), hiperplasia epitelial (73%), levantamiento del epitelio respiratorio (65%) e hipertrofia epitelial (62%) incluidas en los patrones circulatorio, progresivo y regresivo. El resto de las lesiones presentaron prevalencias entre el 10 y el 35% y estuvieron incluidas en los patrones circulatorio, progresivo y regresivo. La menos prevalente fue el acortamiento (11%) y ningún individuo presentó hiperplasia de células de cloruro. En el caso de los escrófalos expuestos, 12 de las 14 lesiones reportadas tuvieron una prevalencia mayor o igual al 50%, siendo las más prevalentes la congestión, hiperplasia de células mucosas, hipertrofia e hiperplasia epitelial, fusión y levantamiento, con prevalencias entre 80 y 90%. Estas alteraciones estuvieron incluidas en los patrones de reacción circulatorio, progresivo y regresivo. Seguidas, con prevalencias de entre 50 y 60%, se registraron telangiectasia, hiperplasia en puntas laminillares, acortamiento, metaplasia, necrosis y edema, correspondientes a los patrones, progresivos, regresivos e inflamatorios. Por último, las dos patologías con menor prevalencia fueron hiperplasia de células de cloruro (40%) e infiltrado (30%), incluidas en los patrones de reacción progresivo e inflamatorio respectivamente.

Con respecto a los turcos, para los individuos provenientes de sitios control, sólo dos alteraciones histológicas de las 14 registradas, presentaron prevalencias mayores al 50%. Estas lesiones fueron la hiperplasia de las células mucosas, presente en todos los individuos muestreados y la congestión presente en el 92% de los individuos. El resto de las lesiones presentaron prevalencias de menos del 20%. Al igual que en los escrófalos, la hiperplasia de células de cloro no estuvo presente en este grupo de individuos. Con respecto a los turcos provenientes de sitios expuestos, 10 de las 14 lesiones registradas tuvieron una prevalencia mayor al 50%. Entre las cuales, la congestión y la hiperplasia de células mucosas estuvieron presentes en la totalidad de los individuos, seguidas por telangiectasia, hipertrofia epitelial, hiperplasia epitelial, fusión, metaplasia, hiperplasia en puntas laminillares, levantamiento del epitelio y acortamiento laminillar. De las restantes lesiones, necrosis y edema presentaron prevalencias de 33%, y al igual que en los escrófalos, las dos lesiones menos prevalentes, fueron infiltrado e hiperplasia de células de cloruro (ambas 11%).

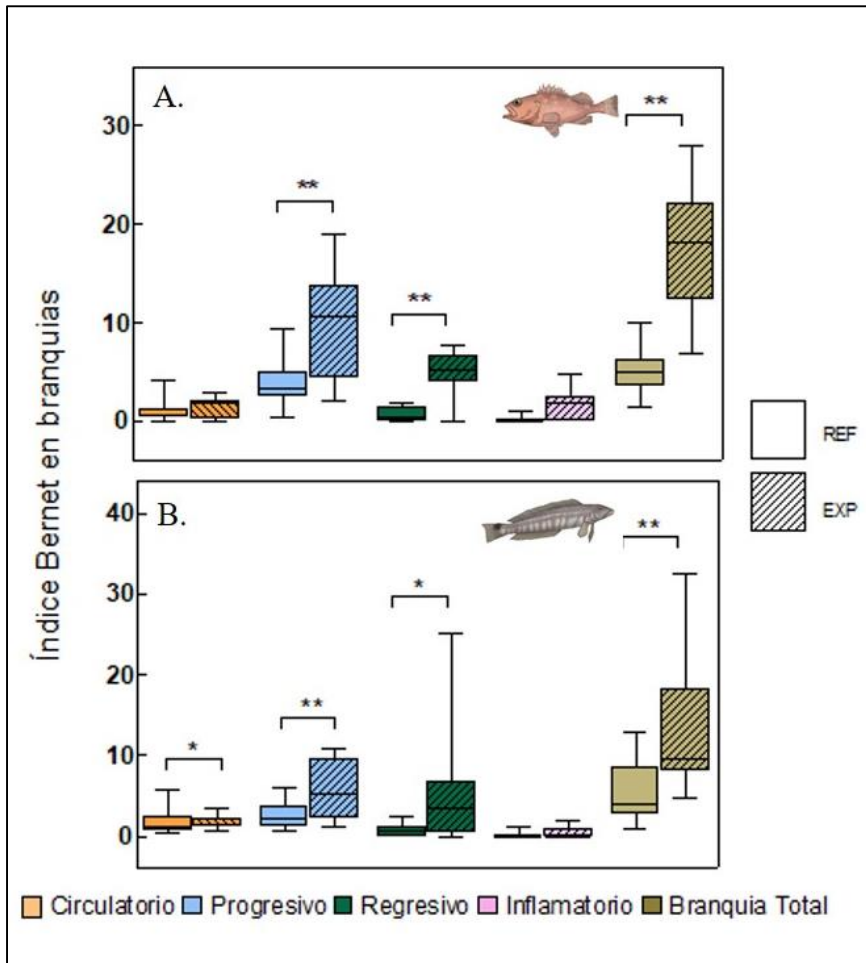


**Figura 19.** Prevalencias de las lesiones histopatológicas branquiales registradas en (A) escrófalo (*S. oculatus*) y (B) turco (*P. brasilianus*) provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica (EXP) y de sitios de referencia (REF). Para las abreviaturas de las lesiones ver Anexo Tabla adicional y Abreviaturas.

#### 3.4.4. Índices histopatológicos

Para los escrófalos se encontró que los índices de reacción progresivo, regresivo y el índice branquia (total) fueron mayores en los individuos provenientes de sitios expuestos que en los individuos control (Tabla II). Mientras que los índices circulatorio e inflamatorio no mostraron diferencias entre sitios (Tabla II; Fig. 20). En el caso de los turcos, los índices de reacción circulatorio, progresivo, regresivo y el índice branquia fueron mayores en los individuos provenientes de sitios expuestos respecto de los controles (Tabla III; Fig. 20). Para el patrón de reacción inflamatorio, tampoco se encontraron diferencias entre sitios (Tabla III; Fig. 20).

La influencia de la talla sobre las alteraciones registradas resultó no significativa ( $p > 0,05$ ) para todos los índices calculados, excepto para turcos respecto del índice de patrón de reacción circulatorio ( $I_{Brq\ Circ} p = 0,035$ ).



**Figura 20.** Diagrama de cajas de índices de reacción e índices branquia obtenidos para (A) escrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasiliensis*) mostrando los efectos del sitio (REF: referencia, EXP: expuesto) según los análisis de las Tablas II y III. Los efectos significativos se indican con asteriscos (\*\* =  $p < 0,01$  \* =  $p < 0,05$ ). Los diagramas de caja representan medianas (líneas horizontales dentro de cajas), percentiles 25 y 75 (bordes de cajas) y mínimos y máximos (bigotes).

**Tabla II.** Análisis estadísticos sobre los índices de reacción e índice total de las alteraciones histopatológicas en branquias de escrófalos (*S. oculatus*) de sitios expuestos y de referencia.

Índice	Análisis	Estadístico	n	P
I <sub>Brq Inf</sub>	Mann-Whitney U-test	U = 106,000	36	0,413
I <sub>Brq Circ</sub>	ANCOVA	F = 2,358	36	0,134
		Covariable LT F = 0,007	36	0,934
I <sub>Brq Prog</sub>	ANCOVA	F = 29,511	36	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT F = 0,004	36	0,953
I <sub>Brq Reg</sub>	ANCOVA	F = 57,945	36	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT F = 0,064	36	0,802
I <sub>Brq</sub>	ANCOVA	F = 70,858	36	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT F = 0,005	36	0,942

**Nota.** I<sub>Brq Inf</sub> = Índice de reacción inflamatorio de las branquias. I<sub>Brq Circ</sub> = Índice de reacción circulatorio de las branquias. I<sub>Brq Prog</sub> = Índice de reacción progresivo de las branquias. I<sub>Brq Reg</sub> = Índice de reacción regresivo de las branquias. I<sub>Brq</sub> = Índice branquia. LT = Largo total; n = número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.

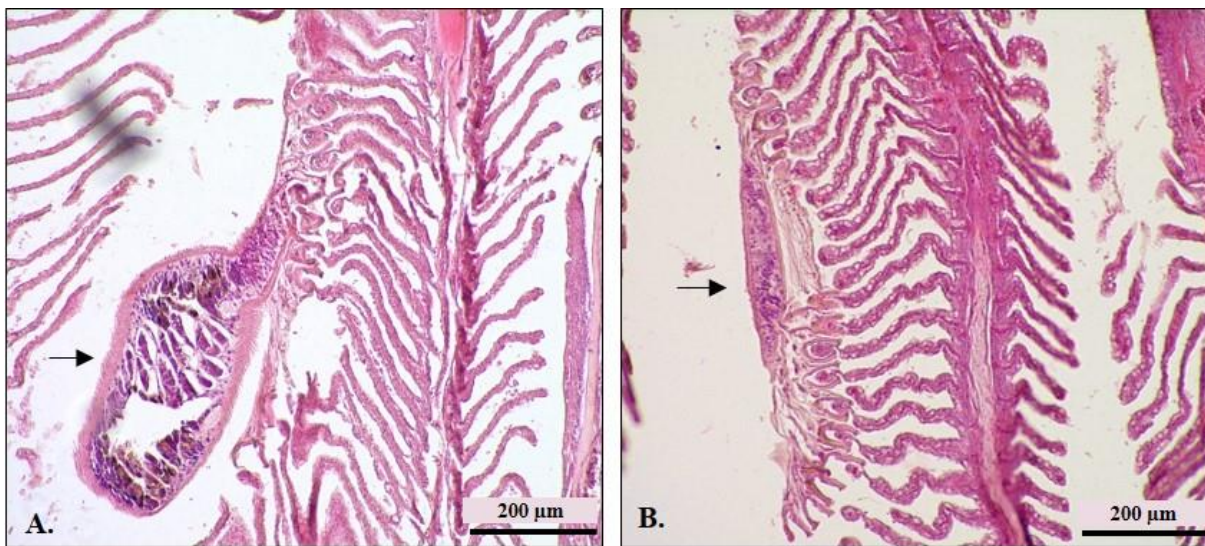
**Tabla III.** Análisis estadísticos sobre los índices de reacción e índice total de las alteraciones histopatológicas en branquias de turcos (*P. brasiliensis*) de sitios expuestos a contaminación antrópica y de referencia.

Índice	Análisis	Estadístico	n	P
I <sub>Brq Inf</sub>	Mann-Whitney U-test	U = 52,000	21	0,917
I <sub>Brq Circ</sub>	ANCOVA	F = 7,501	21	<b>0,013</b>
		Covariable LT F = 5,212	21	0,035
I <sub>Brq Prog</sub>	ANCOVA	F = 4,768	20	<b>0,042</b>
		Covariable LT	20	0,365
		F = 0,863		
I <sub>Brq Reg</sub>	ANCOVA	F = 9,173	21	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT	21	0,235
		F = 1,509		
I <sub>Brq</sub>	ANCOVA	F = 9,119	21	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT	21	0,339
		F = 0,966		

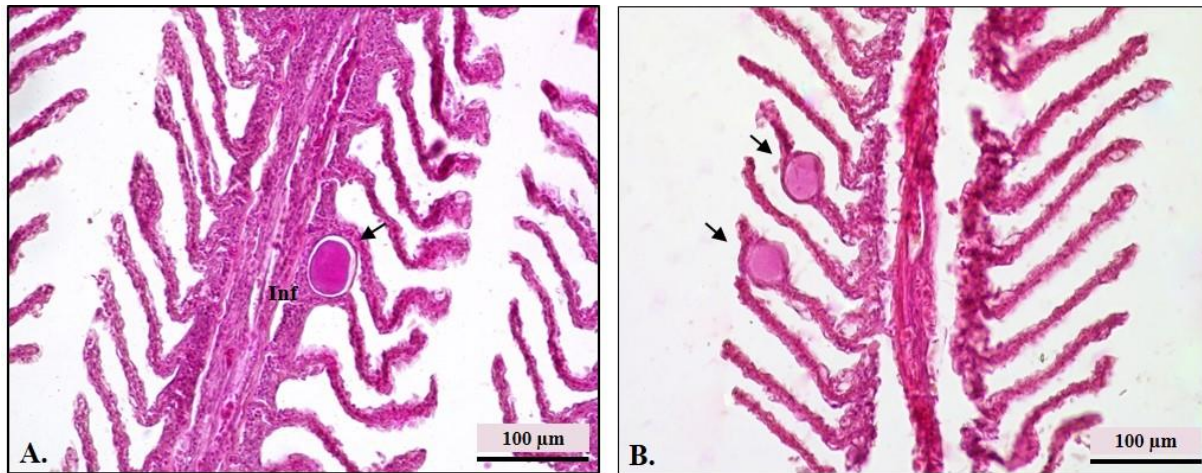
Nota. I<sub>Brq Inf</sub> = Índice de reacción inflamatorio de las branquias. I<sub>Brq Circ</sub> = Índice de reacción circulatorio de las branquias. I<sub>Brq Prog</sub> = Índice de reacción progresivo de las branquias. I<sub>Brq Reg</sub> = Índice de reacción regresivo de las branquias. I<sub>Brq</sub> = Índice branquia. LT = Largo total; n = número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.

### 3.4.5. Parásitos metazoos y quistes bacterianos

Tanto para escrófalos como para turcos se identificaron y cuantificaron ectoparásitos metazoos pertenecientes a la clase Monogenea (Van Beneden, 1858). Estos parásitos fueron encontrados adheridos a las laminillas branquiales mediante su estructura de fijación (opistohaptor) (Fig. 21). Así mismo, para ambas especies se registraron quistes bacterianos correspondientes a la enfermedad infecciosa denominada epiteliocistis. Estos quistes se observan como estructuras basofílicas, homogéneas, rodeadas por un halo claro, en el interior de células epiteliales de las laminillas. Su presencia induce una hipertrofia de leve a moderada de la célula afectada y la translocación del núcleo al margen de la misma (Fig. 22).



**Figura 21.** Secciones histológicas branquiales de (A) escrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasiliensis*) procedentes de sitios expuestos, parasitadas con monogeneos. Las flechas indican parásitos adheridos a las laminillas branquiales secundarias a través de su órgano de fijación (opistohaptor).



**Figura 22.** Secciones histológicas branquiales de (A) turcos (*P. brasiliensis*) y (B) escrófalos (*S. oculatus*) procedentes de sitios expuestos, infectados por epitelocistis. Se observa la presencia de quistes. En ambos casos se observan los quistes (flechas) en las células epiteliales de las laminillas branquiales, ubicándose en la base (A) y en el centro y hacia la punta de las mismas (B). Estos inducen a una hipertrofia leve a moderada de la célula afectada, con las bacterias formando un centro basofílico homogéneo rodeado por un halo claro y la translocación del núcleo de la célula huésped al margen de la misma. Puede observarse además la presencia de infiltrado inflamatorio (Inf).

#### 3.4.6. Prevalencia y abundancia de parásitos metazoos y quistes bacterianos

En el caso de los escrófalos, no se observaron diferencias entre los individuos expuestos y referencia respecto de la prevalencia y abundancia de parásitos metazoos en branquias (Tabla IV). Por su parte, los turcos de sitios expuestos mostraron una mayor prevalencia de parasitosis respecto de los individuos procedentes de sitios de referencia, mientras que la abundancia no difirió entre individuos de ambos sitios (Tabla IV).

**Tabla IV.** Prevalencia (P), abundancia media (AM) y desvío estándar (DE) de monogeneos encontrados en el escrófalo (*Sebastes oculatus*) y en el turco (*Pinguipes brasilianus*) procedentes de sitios expuestos a contaminación (EXP) y referencia (REF).

	Escrófalos		Turcos	
	EXP (n = 10)	REF (n = 26)	EXP (n = 9)	REF (n = 12)
P (%)	20	11,54	33,33	16,67*
AM ± DE	0,20 ± 0,42	0,19 ± 0,57	0,33±0,50	0,17±0,39

**Nota.** n: tamaño de la muestra. \* indican efecto significativo del sitio en la prevalencia a partir de pruebas de Chi-Cuadrado (Escrófalos:  $X^2 = 2,00$ ,  $p = 0,16$ ; Turcos:  $X^2 = 5,12$ ,  $p < 0,05$ ).

Respecto de la epitelocistis, tanto para escrófalos como turcos, se encontró que la prevalencia de esta enfermedad infecciosa fue mayor en los individuos provenientes de sitios expuestos, mientras que la intensidad media no difirió entre sitios (Tabla V).

**Tabla V.** Valores de Prevalencia (P), intensidad media (IM), y desvío estándar (DE) de epitelocistis en el escrófalo (*Sebastes oculatus*) y en el turco (*Pinguipes brasilianus*) procedentes de sitios expuestos a contaminación antrópica (EXP) y referencia (REF).

	Escrófalos		Turcos	
	EXP (n = 10)	REF (n = 26)	EXP (n = 9)	REF (n = 12)
P	70	4*	44.4	7.7*
IM ± DE	0,13 ± 0,13	0,17 ± -	0,25 ± 0,13	0,17 ± -

**Nota.** n: tamaño de la muestra; P (%); IM (quistes por sección / filamentos por sección). \* Asteriscos indican efecto significativo del sitio en la prevalencia a partir de pruebas de Chi-Cuadrado (Escrófalos:  $X^2 = 58,83$ ; Turcos:  $X^2 = 29,93$ , ambos  $p \leq 0,01$ ).

### 3.5. Discusión

En este capítulo se evaluaron los cambios histopatológicos en branquias de escrófalo *Sebastes oculatus* y turco *Pinguipes brasilianus*, expuestos a contaminación antrópica. Se encontró, para ambas especies, que los individuos expuestos presentaron mayores alteraciones en su histología branquial, respecto de los individuos que habitan las zonas control. Estos resultados están alineados con la hipótesis de que los contaminantes presentes en el medio acuático pueden inducir lesiones y daños en órganos diana. Las principales lesiones histológicas de branquias observadas en escrófalos y turcos expuestos a contaminación estuvieron incluidas dentro de los patrones circulatorio, progresivo y regresivo. A continuación se discuten en detalle los resultados más relevantes.

De las lesiones de origen circulatorio observadas, predominó la telangiectasia en distintos estadios de desarrollo. Esta lesión se origina a causa de daño o ruptura de las células pilares, lo que resulta en la fusión de los capilares laminillares secundarios formando un espacio uniforme lleno de sangre. Finalmente, se produce la dilatación de la laminilla llegando, en algunos casos, a la destrucción de la misma (revisado por Strzyzewska et al., 2016). Numerosos estudios han descripto esta lesión en relación a disturbios antrópicos como la contaminación (Sobral dos Santos et al., 2023; Hasan et al., 2022; Ossana et al., 2019; Ale et al., 2018; Fonseca et al., 2016; Barišić et al., 2015; Agamy, 2013b) y se ha sugerido que podría estar ocasionada por un efecto directo de diversos xenobióticos sobre el tejido branquial (Ternmink et al., 1983).

Dentro de los cambios progresivos o proliferativos, las principales lesiones fueron la hiperplasia e hipertrofia epitelial, hiperplasia en las puntas laminillares y fusión parcial o total (metaplasia) de laminillas secundarias. Estas lesiones se caracterizan por un aumento en el tamaño y/o actividad de los tejidos, a causa de un aumento en el tamaño o en el número de sus células (Bernet et al., 1999). Se cree que estos cambios representan mecanismos generales de defensa destinados a aumentar la distancia entre el ambiente externo y la sangre, funcionando como una barrera frente a la entrada de xenobióticos desde el agua hacia los vasos sanguíneos branquiales y, posteriormente hacia la sangre (revisado por Mallat, 1985). Si bien estos mecanismos tienen una función defensiva, también aumentan la distancia entre la sangre y el oxígeno disuelto para el intercambio gaseoso, por lo tanto, con el tiempo y la persistencia del irritante, conducen a una reducción de la superficie respiratoria-excretora de las branquias en detrimento de la eficiencia respiratoria (revisado por Mallat, 1985), que eventualmente superará cualquier efecto protector contra la absorción de contaminantes (Cengiz, 2006). Otro mecanismo de protección incluido en los cambios proliferativos, que además estuvo

ausente en los individuos de sitios de referencia, fue la hipertrofia y/o hiperplasia de las células de cloruro. El aumento en el tamaño y/o densidad de estas células se produce ante cambios en el equilibrio iónico que pueden ser causados por distintos factores estresantes en el agua, entre ellos los contaminantes (Genten et al., 2009; Hughes & Morgan, 1973). De hecho, esta proliferación ha sido registrada en presencia de diversos tipos de contaminantes (Nimet et al., 2020; Ossana et al., 2019; Neves et al., 2018; Ballesteros et al., 2017; Paulino et al., 2014; Agamy, 2013b) sugiriendo el papel que juegan estas células en la extrusión o neutralización de tóxicos (Paulino et al., 2014; Mallat, 1985; Crespo et al., 1981; Karnaky, 1980). Además, situaciones de exposición continua podrían resultar en el deterioro de las funciones respiratorias y osmorreguladoras de las branquias (Agamy, 2013b; Paulino et al., 2012; Tang & Au, 2004).

Dentro de las lesiones degenerativas o regresivas se observaron principalmente, edema, lifting o levantamiento de epitelio y acortamiento lamelar. El edema, que puede estar acompañado o no de infiltrados de células y proteínas, es el resultado de un proceso inflamatorio que se inicia a través de una dilatación de vasos sanguíneos y congestión y continúa con la extravasación de componentes sanguíneos al tejido circundante (revisado por Wood, 2001; revisado por Mallat, 1985). El lifting del epitelio laminar, que es el desprendimiento del epitelio respiratorio de la lámina basal subyacente, suele producirse debido a la acumulación de líquido en el espacio subepitelial, es decir, es el resultado de trastornos circulatorios, como congestión y edema (Roberts, 2012; Mallatt, 1985). El acortamiento lamelar o laminillar se presenta a causa de atrofia tisular, es decir, reducción en el número y volumen de células y/o decreciente cantidad de componentes intracelulares (Bernet et al., 1999). Se cree que estas lesiones degenerativas también están relacionadas con una función defensiva, aumentando la distancia a través de la cual los irritantes presentes en el agua deben difundir para alcanzar el torrente sanguíneo (revisado por Mallat, 1985). Pueden además, con el tiempo y la persistencia de los irritantes, presentar las mismas consecuencias sobre la función respiratoria que las descritas para las alteraciones proliferativas (revisado por Strzyzewska et al., 2016; Banerjee, 2007; revisado por Mallat, 1985). Finalmente, otra lesión registrada de tipo regresivo y de máxima importancia patológica (Bernet et al., 1999), fue la necrosis. Esta lesión puede conducir a un deterioro en la condición de salud de los peces y podría sugerir que una mezcla compleja de contaminantes está presente en el ambiente (Montes et al., 2020). En este trabajo, la lesión se presentó en escasos individuos y, en general, como necrosis aisladas y circunscriptas a pequeñas áreas de extensión. Sin embargo, a pesar de su baja prevalencia, las necrosis alteran de

forma irreversible la superficie funcional de las branquias, pudiendo tener efectos negativos sobre la salud de turcos y escrófalos expuestos.

Por otra parte, dentro de los patrones circulatorio y regresivo se registraron congestión vascular e hiperplasia/hipertrofia de células mucosas, respectivamente. Si bien estas lesiones estuvieron en alta prevalencia tanto en individuos expuestos como controles, su importancia patológica es mínima siendo fácilmente reversibles (Bernet et al., 1999). La congestión vascular se presenta por una alteración de las células pilares que provoca un aumento del flujo sanguíneo dentro de las laminillas branquiales, causando dilatación de los capilares con células sanguíneas estancadas en su interior, en algunos casos puede acompañarse de extravasación de glóbulos rojos (Bernet et al., 1999; Takashima & Hibiya, 1995). Al igual que en este trabajo, varios estudios sobre disturbios antrópicos han registrado esta lesión tanto en individuos expuestos como controles (Ballesteros et al., 2017; Fonseca et al., 2016; Barišić et al., 2015), sugiriendo una baja especificidad de la lesión respecto de la contaminación. Alternativamente, se ha reportado que dicha congestión puede aparecer como resultado de lesiones mecánicas durante la captura, el transporte prolongado, y/o cultivos intensivos (revisado por Strzyzewska et al., 2016; Noga, 1996). Por su parte, la hiperplasia y/o hipertrofia de células mucosas en branquias es considerado un mecanismo de defensa que actúa como barrera protectora inmunológica (Fernandes & Mazon, 2003). Esta alteración ha sido relacionada con la salinidad, el pH del ambiente, el gradiente osmótico, el estrés, la etapa del desarrollo, el estado reproductivo, así como a disturbios antrópicos (Genten, 2009; revisado por Shephard, 1993).

En general, tanto para escrófalos como para turcos, el daño integral de branquias registrado en individuos expuestos a contaminación fue mayor que para individuos referencia. Dicho daño histológico fue cuantificado a través de índices que indican el grado de distribución de las lesiones a lo largo de las branquias, teniendo en cuenta tanto la prevalencia, como la extensión o porcentaje de afectación y la importancia patológica de cada lesión (Bernet et al., 1999). En particular, los índices de reacción progresivos, que incluyen las lesiones con proliferación de tejidos, y regresivos que incluyen las lesiones degenerativas, así como el índice branquia que indica la afección total del órgano, mostraron valores más altos en los individuos de sitios expuestos en ambas especies. Esto coincide con lo reportado para otras especies y sistemas, en presencia de una gran variedad de contaminantes como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos orgánicos persistentes, compuestos organofosforados, carbamatos, organoclorados, herbicidas, compuestos nitrogenados, y microplásticos, tanto en condiciones naturales (Sobral dos Santos et al., 2023; Nimet

et al., 2020; Ballesteros et al., 2017b; Fonseca et al., 2016; Barišić et al., 2015; Stentiford et al., 2003) como controladas (Hasan et al., 2022; Fu et al., 2021; Ossana et al., 2019; Ale et al., 2018; Monteiro et al., 2008; Simonato et al., 2008). Por ejemplo, Kostić-Vuković et al. (2021), encontraron mayores índices en besugos comunes (*Abramis brama*) que habitan un río de Serbia expuesto a aguas residuales municipales no tratadas que contiene altas concentraciones de metales y metaloides. Del mismo modo, en ciprínidos (*Squalius vardarensis*), que habitan ríos de Macedonia impactados por minas activas de Pb/Zn y desechos agrícolas, registraron mayores índices en los individuos provenientes de las zonas más impactadas (Barišić et al., 2015). En situaciones controladas, Agamy (2013b) observó en meros de manchas marrones (*Epinephelus chlorostigma*) expuestos a hidrocarburos, índices de reacción y totales más altos respecto de los controles. Ballesteros et al. (2017), registraron índices más altos en mojarritas (*Jenynsia multidentata*) expuestas experimentalmente a aguas de un río impactado con mezclas de contaminantes antrópicos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que estos índices poseen una alta sensibilidad como marcadores de impacto antrópico, posiblemente debido a que las lesiones incluidas en los mismos son aquellas que aumentan la distancia de difusión entre el agua y la sangre como mecanismo de protección contra la absorción de irritantes como los contaminantes (Mohamed, 2009; Fernandes & Mazon 2003; Rev. por Mallat 1985; Morgan & Tovell, 1973). Además, para turcos expuestos se registraron mayores valores del índice circulatorio, que incluye lesiones originadas por una condición patológica del flujo sanguíneo (Bernet et al., 1999). Esto podría sugerir una mayor sensibilidad de esta especie para este tipo de lesiones, en un contexto de contaminación.

Durante la evaluación microscópica, además de las lesiones histológicas, se identificaron y cuantificaron ectoparásitos metazoos pertenecientes a la clase Monogenea. Los mismos estuvieron adheridos a las laminillas branquiales mediante su estructura de fijación. Este tipo de parásitos son platelmintos con un ciclo de vida simple y directo, comúnmente encontrados en peces (Roberts, 2012; Reed et al., 2009). Su infección puede causar daños fisiológicos (p. ej., proliferación celular, inmunosupresión, alteración del crecimiento y respuestas conductuales perjudiciales) o mecánicos (p. ej., fusión de las láminas branquiales, descamación epitelial, hipertrofia y reemplazo tisular de las branquias) (Roberts, 2012; Abdelmonem et al., 2010; Mansell et al., 2005). De hecho, en escrófalos y turcos parasitados se observó daño tisular en torno a los mismos con lesiones que variaron desde infiltrados leucocitarios e hiperplasia del tejido epitelial hasta ruptura del epitelio, hemorragias profusas y pérdida de arquitectura laminillar. Sin embargo, excepto para los turcos

expuestos, que mostraron una mayor prevalencia de monogeneos respecto de los turcos referencia, el resto de las variables (abundancia para ambas especies y prevalencia para escrófalos) no difirieron entre los individuos expuestos y referencia. Por su parte, en el caso de los quistes bacterianos de la enfermedad infecciosa denominada epiteliocistis, se encontró que tanto para escrófalos como para turcos, la prevalencia fue mayor en los individuos provenientes de sitios expuestos. Estos resultados concuerdan con la idea de que los contaminantes ambientales, a través del impacto en la salud general de los individuos, pueden aumentar su susceptibilidad a contraer enfermedades (Roberts 2012). Así mismo, los contaminantes también podrían haber favorecido un aumento en la densidad de los patógenos, resultando en una mayor probabilidad de infección (Dar et al., 2020; Vethaak et al., 1992). Hallazgos similares asociando la exposición a contaminantes y la presencia de enfermedades han sido reportados por otros autores (Blandford et al., 2018; Agamy, 2013; Nowak & LaPatra, 2006; Schmidt-Posthaus et al., 2001).

En resumen, en este estudio se evidencia que dos de las especies marinas más abundantes y representativas de los ensambles de peces de arrecife de los golfos Norpatagónicos, presentan daños en el tejido branquial asociados con la exposición a contaminantes. Si bien, según la importancia patológica de las lesiones halladas, el daño branquial puede ser clasificado de leve a moderado (Bernet et al., 1999), estos daños pueden afectar su estructura y función potencialmente resultando en consecuencias negativas sobre la fisiología de los organismos. De hecho, estudios previos en las mismas especies, han mostrado alteraciones en parámetros indicadores de estado inmunológico (conteos leucocitarios, capacidad bactericida del plasma, niveles de anticuerpos naturales) y del estado de salud general (hematocrito, factor de condición física, relación neutrófilos/linfocitos, cargas parasitarias) (Sueiro et al., 2017; Sueiro & Palacios, 2016). En consecuencia, estos resultados permiten inferir una posible relación entre las alteraciones histopatológicas branquiales registradas y la presencia de contaminantes y evidencian un estado de salud alterado en las poblaciones expuestas.

**CAPÍTULO II:**  
**EVALUACIÓN DE ALTERACIONES  
HISTOPATOLÓGICAS EN HÍGADO DE  
PECES MARINOS EXPUESTOS A  
CONTAMINACIÓN**

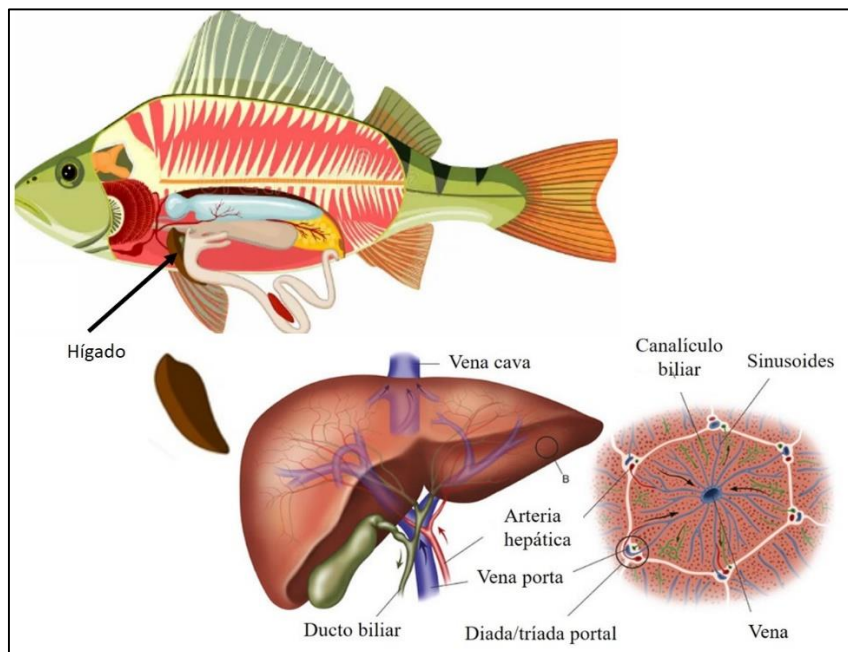
#### 4.1. Resumen

El hígado de los peces desempeña un papel clave en la desintoxicación de contaminantes ambientales por ser el órgano encargado de la biotransformación y excreción de los mismos. Diversos aspectos funcionales y estructurales, contribuyen a su alta susceptibilidad al daño químico, siendo un órgano blanco en contextos de contaminación ambiental. Por ello, el estudio de las alteraciones histológicas del hígado es ampliamente utilizado para determinar el estado de salud de las poblaciones así como de los ambientes que habitan. En este capítulo se evaluaron los cambios histopatológicos en hígados de individuos de escrófalo *S. oculatus* y turco *P. brasiliensis*, provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica y de sitios de referencia. Ambas especies mostraron lesiones histopatológicas de moderadas a severas (como congestión, vasculitis, necrosis, infiltrados inflamatorios, alteración del número de centros de melanomacrófagos), así como mayores índices histopatológicos de daño en los sitios expuestos a contaminación. Estos resultados evidencian que ambas especies presentan daños hepáticos asociados a contaminantes, con posibles consecuencias fisiológicas que reflejan un estado de salud alterado. El uso de la histopatología hepática resultó adecuada para detectar estos efectos, destacando la importancia de su aplicación en el monitoreo ambiental de ecosistemas marinos afectados.

## 4.2. Introducción

### 4.2.1. Anatomía y función del hígado

El hígado es el órgano abdominal más grande fuera del canal alimentario. Macroscópicamente es un órgano macizo y homogéneo, que se ubica en la porción anterior de la cavidad abdominal. En muchas especies es bilobulado e incluso, en algunas, está dividido en lóbulos que pueden extenderse a lo largo del abdomen o se disponen estrechamente junto a otras vísceras. Suele ser de color marrón rojizo en especies carnívoras y de un marrón más claro en herbívoras, aunque en ciertas épocas del año puede tornarse amarillo o incluso blanquecino (Robert, 2012; Ferguson, 2006). En los peces, el hígado cumple funciones metabólicas similares a las de los mamíferos. Es una glándula mixta con porción endocrina (compuesta por los hepatocitos) y porción exocrina (sistema de conductos que drena la bilis). Entre sus funciones metabólicas se destacan la asimilación de nutrientes, la producción de bilis y el mantenimiento de la homeostasis metabólica del organismo, incluyendo el procesamiento de carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas. También, interviene en la síntesis de proteínas séricas, como la albúmina, el fibrinógeno, los factores del complemento y las proteínas de fase aguda. Además, el hígado desempeña un papel clave en la desintoxicación de productos de desecho endógenos, así como de compuestos exógenos tóxicos, como fármacos, metales pesados, pesticidas, etc. (Robert, 2012; Genten et al., 2009; Ferguson, 2006) (Fig. 1).

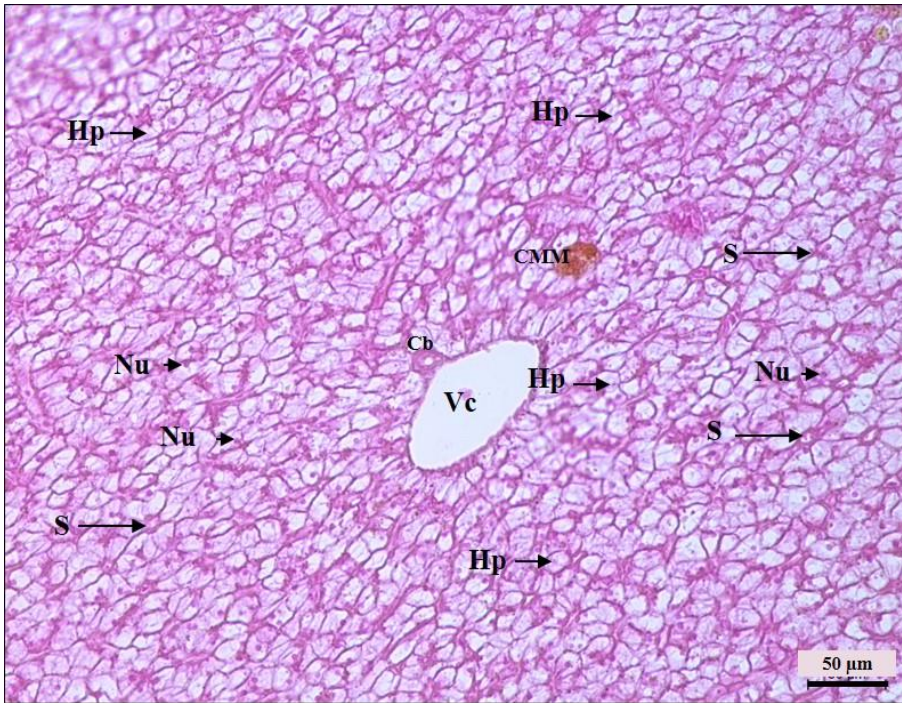


**Figura 1.** Ubicación y estructura del hígado. Imagen modificada, obtenida de: <https://www.dreamstime.com>.

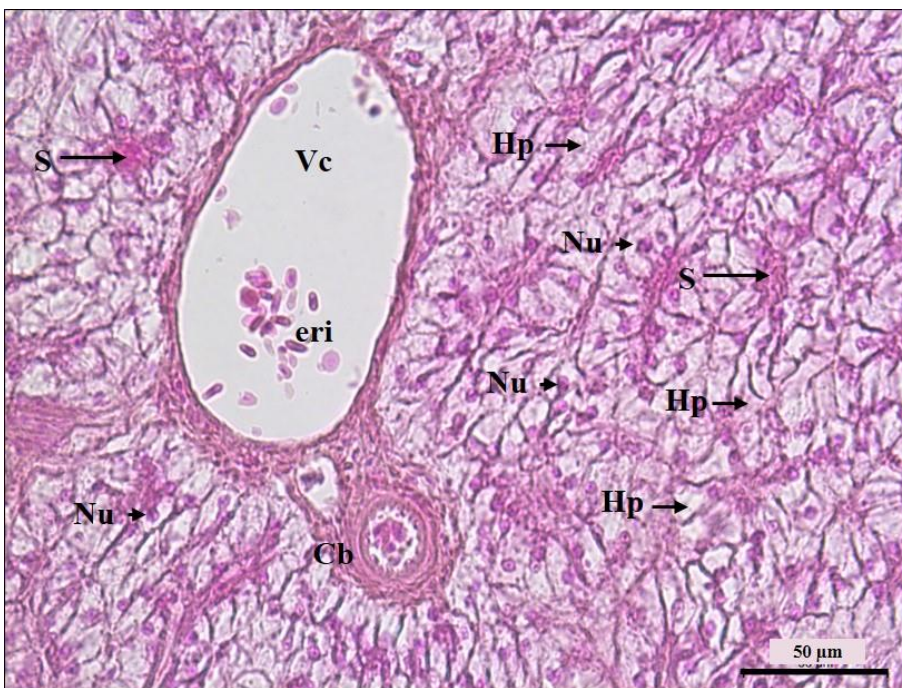
#### 4.2.2. Histología del hígado

La histología del hígado varía entre especies, pero existen características generales que se encuentran en la mayoría de ellas. Está contenido dentro de una cápsula delgada de tejido fibroconectivo. Su parénquima está compuesto principalmente por hepatocitos poliédricos, con citoplasmas basófilos y núcleos centrales que a menudo pueden observarse desplazados hacia la periferia por el acúmulo de vacuolas de glucógeno o grasa (Robert, 2012; Ferguson, 2006). Dichas vacuolas, que en reiteradas ocasiones producen hinchazón de los hepatocitos, son frecuentes durante las fases fisiológicas no reproductivas y además pueden presentarse aun cuando la nutrición es incluso ligeramente inferior a lo ideal (Robert, 2012). La membrana celular del hepatocito, en sus superficies laterales se evagina formando microvellosidades que se proyectan hacia un espacio ubicado entre el hepatocito y el sinusoides, denominado espacio perisinoidal, también conocido como espacio de Disse. Los hepatocitos se disponen en láminas alrededor de los sinusoides, observándose como cordones tubulares (Robert, 2012). La histología del hígado de los peces difiere de la de los mamíferos en que los hepatocitos no tienden a formar cordones o lobulillos definidos y las típicas tríadas portales (vena porta, arteria hepática y conducto biliar) no son evidentes, en cambio, las “diadas” son más comunes, compuestas por un conducto biliar en conjunto con una vena o una arteriola. Además, las células de Kupffer (macrofágicas) típicas de los hígados de mamíferos, en la mayoría de los teleósteos no están presentes (Robert, 2012; Ferguson, 2006). Los sinusoides, que se distribuyen de forma irregular entre los hepatocitos, están revestidos por células endoteliales que forman una lámina citoplasmática muy delgada. Los núcleos de estas células son alargados y protruyen hacia la luz sinusoidal. El endotelio se apoya en hebras fibrilares que forman un material semejante a una membrana basal, aunque no se encuentra una membrana definida. Las células endoteliales que recubren los sinusoides están fenestradas lo que permite una comunicación abierta entre la luz sinusoidal y el espacio de Disse (Robert, 2012; Ferguson, 2006). Los conductos biliares también están presentes dentro del parénquima hepático. Éstos se originan como canalículos entre hepatocitos adyacentes, y se anastomosan para formar conductos de diámetro creciente. Luego se fusionan y, en la mayoría de las especies, terminan en la vesícula biliar. Los conductos o canalículos más pequeños dentro del hígado están revestidos por una sola capa de células epiteliales cuboidales. Los conductos más grandes pueden incorporar tejido conectivo y una capa muscular delgada (Genten, 2009; Ferguson, 2006). La estructura hepática, principalmente la de los hepatocitos, varía considerablemente en relación directa con el sexo, la edad, la disponibilidad de alimento (especialmente en cuanto al

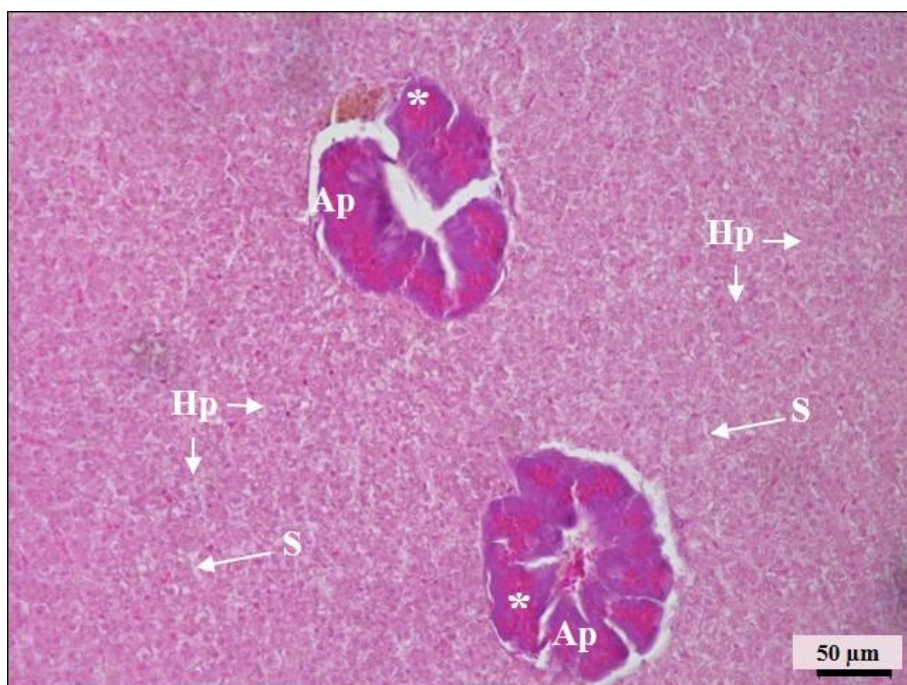
contenido de glucógeno y grasa), la temperatura, las influencias endocrinas (fuertemente asociadas a las condiciones de reproducción), que a su vez están reguladas por el ambiente, y la exposición a contaminantes. Además, los depósitos de glucógeno y el almacenamiento de grasa, que pueden disolverse durante el proceso histológico, producen una considerable variabilidad histológica (Robert, 2012; Genten et al., 2009; Ferguson, 2006) (Figura 2; 3; 4 y 5).



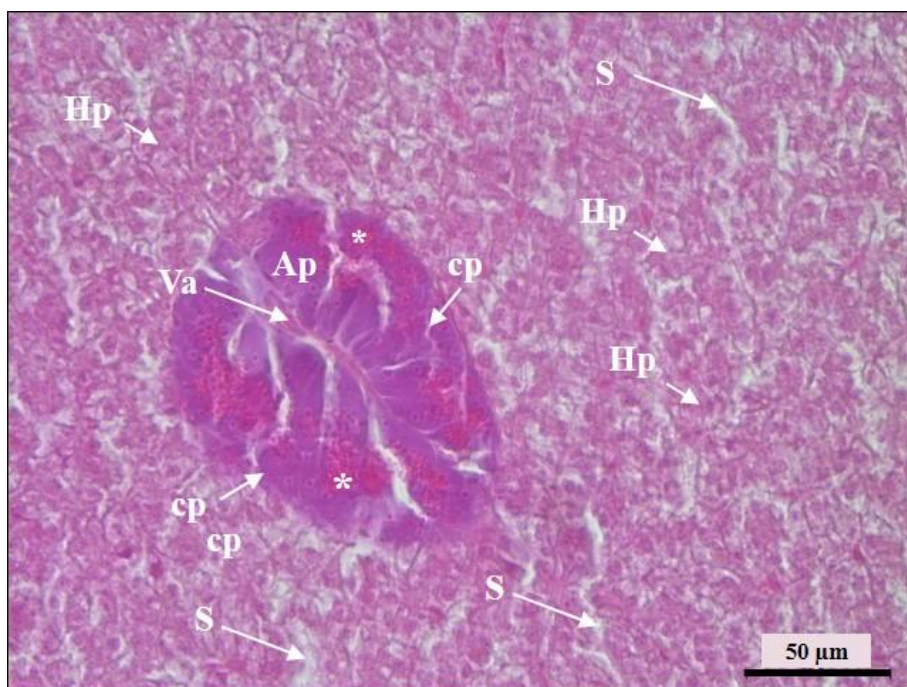
**Figura 2.** Sección histológica de tejido hepático de escrófalo (*S. oculatus*) control. Se muestra la apariencia del parénquima hepático con cordones de hepatocitos vacuolizados (Hp) y núcleos (Nu) desplazados hacia la periferia celular, distribuidos uniformemente por el parénquima en torno a los sinusoides (S). Además se observa una diada hepática compuesta por vena central (Vc) y conducto biliar (Cb). Centro de melanomacrófagos (CMM)



**Figura 3.** Sección histológica de tejido hepático de escrófalo (*S. oculatus*) control. Se observan hepatocitos vacuolizados (Hp) separados por sinusoides (S). Pueden distinguirse núcleos de hepatocitos (Nu) desplazados hacia la periferia celular. Además se observa una diada hepática compuesta por vena central (Vc) (nótese eritrocitos en su interior (eri)) y conducto biliar (Cb).



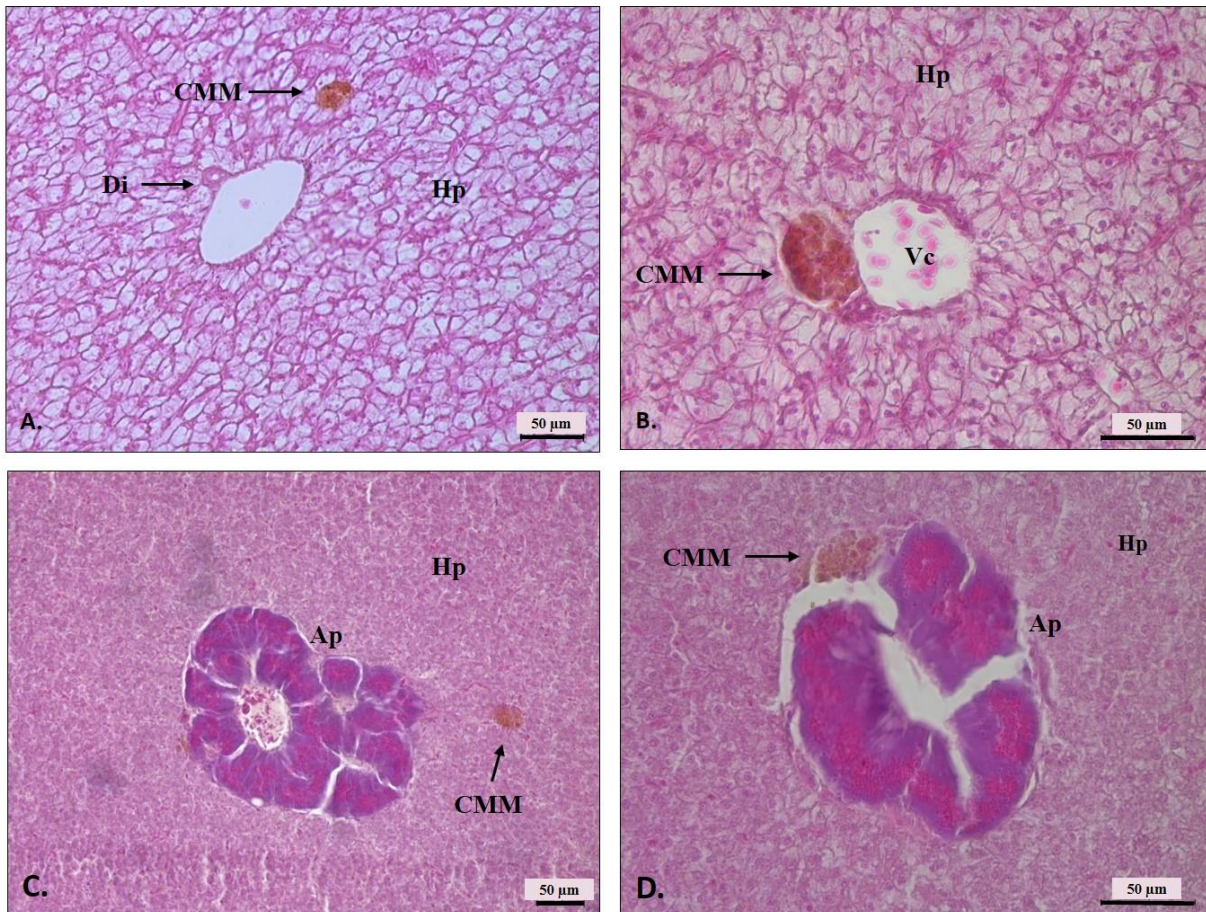
**Figura 4.** Microfotografía del tejido hepatopancreático de turco (*P. brasiliensis*) control, muestra la apariencia esponjosa del parénquima hepático, compuesto principalmente por hepatocitos poliédricos (Hp) y sinusoides (S). También se distinguen dos acinos pancreáticos (Ap), con gránulos de zimógeno eosinofílicos (\*).



**Figura 5.** Microfotografía del tejido hepatopancreático de turco (*P. brasiliensis*) control. Se observan cordones de hepatocitos (Hp) separados por sinusoides (S). Además se puede observar un acino pancreático (Ap) con una pequeña vena aferente (Va) rodeada por células pancreáticas piramidales (cp), con gránulos de zimógeno eosinofílicos en su interior (\*).

Otras células presentes en el tejido hepático de los peces teleósteos son los melanomacrófagos (MM), que forman conjuntos llamados centros de melanomacrófagos (CMM). Éstos consisten en agregados de macrófagos que contienen diversos pigmentos como hemosiderina, lipofuscina y melanina y se cree que poseen una función de defensa (véase la descripción general de MM y CMM en el Capítulo III). Los CMM al igual que el tejido hematopoyético presente en el hígado, se encuentran en

cantidades variables alrededor de los vasos más grandes del hígado aunque también se los puede encontrar dispersos por el parénquima hepático (Robert, 2012; Genten, 2009) (Figura 6).



**Figura 6.** Cortes histológicos de hígados de individuos de (A-B) escrófalo (*S. oculatus*) y hepatopáncreas de (C-D) turco (*P. brasiliensis*). (A) Se destacan hepatocitos (Hp) vacuolizados, centro de melanomacrófagos (CMM) y díada compuesta por una vena y un conducto biliar. (B) Pueden observarse cordoneces de hepatocitos (Hp) vacuolizados, con núcleos desplazados. Centro de melanomacrófagos (CMM) en relación a una vena central (Vc). (C) Se destacan hepatocitos (Hp), acinos pancreáticos (Ap) y centro de melanomacrófagos (CMM). (D) Pueden observarse hepatocitos (Hp) y sinusoides. Se indica un acino pancreático (Ap) y un centro de melanomacrófagos (CMM) en relación al mismo.

En ciertas especies, como los turcos (*Pinguipes brasiliensis*), el hígado se presenta como un órgano compuesto junto al tejido pancreático y se denomina hepatopáncreas (Ferguson, 2006). En estos casos, el páncreas rodea las ramas más grandes de la vena porta hepática como una glándula externa y también suele estar distribuido dentro del parénquima hepático formando islas (Robert, 2012). El páncreas exocrino consiste en agrupaciones de células piramidales, organizadas principalmente en acinos, al igual que en los mamíferos. Las células presentan un citoplasma basófilo oscuro, núcleos basales bien definidos, y numerosos gránulos de zimógeno eosinofílicos de gran tamaño, que

contienen enzimas responsables de la digestión de proteínas, carbohidratos, grasas y nucleótidos (Fig. 4 y 5). Los componentes endócrinos del páncreas, los islotes de Langerhans, consisten en una serie de estructuras ligeramente encapsuladas y de tinción débil, compuestas por pequeñas células fusiformes. El tamaño de las células de los islotes puede variar según la estación y, en algunas especies, existe un islote principal conocido como cuerpo de Brockman (Robert, 2012). El páncreas se comunica con el intestino a través de conductillos pancreáticos, los cuales se fusionan para formar el conducto pancreático principal. Este último desemboca, de forma directa o tras unirse al conducto biliar común, en la parte proximal del intestino. Los conductillos pancreáticos y el conducto pancreático principal están revestidos respectivamente por epitelio cúbico a columnar (Ferguson, 2006) (Figura 3).

#### 4.2.3. El hígado como órgano indicador de contaminación

El hígado de los teleósteos es el órgano más importante en la desintoxicación de diferentes contaminantes ambientales ya que es el principal encargado de la biotransformación y excreción de xenobióticos (Robert, 2012; Ferguson, 2006; Bernet et al., 1999). Sin embargo, ante situaciones prolongadas de exposición o cuando las concentraciones de tóxicos superan la capacidad biotransformadora y excretora hepática, los compuestos tóxicos tienden a acumularse en el hígado haciendo que la concentración de los mismos sea mayor que en la de otros órganos e incluso que en la del entorno que lo rodea (Health, 1995). Además, dado que el hígado posee un flujo sanguíneo relativamente lento en comparación con el gasto cardíaco (Gingerich, 1982) y una asociación cercana de los hepatocitos con el sistema biliar (Hinton & Lauren, 1990), la eliminación de las sustancias tóxicas y sus metabolitos suele ser lenta. Estos aspectos de su funcionamiento e histología, contribuyen a que el hígado tenga una alta susceptibilidad al daño químico, siendo un órgano blanco en contextos de contaminación ambiental. De hecho, el estudio de las alteraciones histológicas del hígado es ampliamente utilizado para determinar el estado de salud de los ambientes así como de sus poblaciones (Health, 1995; Hinton et al., 2001). En este sentido, existen numerosos registros de cambios histopatológicos en hígados de diversas especies de peces expuestos a una amplia gama de contaminantes, bajo distintas condiciones y ambientes. Por ejemplo, Agbohessi et al. (2015) encontraron severos daños en el tejido hepático de peces silvestres (*Tilapia guineensis* y *Clarias gariepinus*) que habitaban una cuenca algodonera impactada por pesticidas. Del mismo modo, Santos et al. (2022), encontraron que ciprínidos endémicos de un río de Portugal expuestos a mezclas

de contaminantes presentaban lesiones hepáticas, respecto de los individuos controles. En condiciones controladas Hasan et al. (2022) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de hidrocarburos sobre hígados de tilapia del Nilo *O. niloticus*, registrando que los individuos expuestos presentaban alteraciones evidentes, respecto de los individuos control. Del mismo modo, Kumar et al. (2018) observaron que individuos de panga *Pangasius hypophthalmus* mostraron alteraciones histopatológicas en hígados cuando fueron expuestos a selenio. Observaciones similares en el lenguado senegalés *Solea senegalensis* fueron reportadas en condiciones controladas de exposición a sedimentos conteniendo metales pesados y compuestos orgánicos (Costa et al., 2009). Para Sudamérica también existen diversos estudios donde la histología hepática ha sido utilizada como un indicador de estado de salud de los individuos así como de estado de contaminación ambiental. En condiciones naturales, Weber et al. (2020) reportaron lesiones histológicas en hígados de dos especies de peces nativos (*Hoplias intermedius* e *Hypostomus affinis*) expuestas a residuos mineros. También, la exposición a contaminación de mercurio y productos derivados de la industria azucarera, fue asociada a lesiones histopatológicas en especies de peces de diferentes niveles tróficos (Sobral dos Santos et al., 2023). Por su parte, Liebel et al. (2013), evaluaron el impacto antrópico en dos lagos a través de la evaluación histológica en hígados de dos especies de peces (*Astyanax aff. fasciatus* y *Oreochromis niloticus*) encontrando índices histopatológicos mayores en individuos provenientes de los sitios impactados respecto de los individuos controles. Por otro lado, en condiciones controladas (test *in situ*), Camargo & Martinez (2007) en Brasil, encontraron alteraciones en el tejido hepático en un pez neotropical (*Prochilodus lineatus*) que habita un arroyo contaminado con compuestos químicos inorgánicos. En Argentina, también se han realizado numerosos estudios relacionando los cambios histopatológicos hepáticos en peces con la presencia de contaminantes. La mayoría de los mismos han sido sobre especies de agua dulce, por ejemplo, para madrecitas *Jenynsia multidentata* que habitan la cuenca de un río expuesto a mezclas de contaminantes se reportaron elevados índices histopatológicos (Maggioni et al., 2012). Del mismo modo, Ballesteros et al. (2017b) registraron alteraciones en hígados de pejerrey *Odontesthes bonariensis* provenientes de una laguna expuesta a compuestos orgánicos persistentes (COP), y encontraron índices histopatológicos superiores en individuos expuestos. En condiciones controladas, Ossana et al. (2019) expusieron a madrecitas (*Cnesterodon decemmaculatus*) a aguas receptoras de un río altamente contaminado, encontrando alteraciones histológicas en los hígados de individuos expuestos respecto de los controles. Del mismo modo, Da Cuña et al. (2011), reportaron

lesiones evidentes en el tejido hepático en individuos de chanchita *Cichlasoma dimerus* expuestos experimentalmente a un pesticida organoclorado.

#### 4.2.4. Síntesis y objetivos de este capítulo

Al igual que en el caso de las branquias, los registros de lesiones histológicas en hígados de peces expuestos a contaminantes son numerosos. La variedad de especies, condiciones ambientales, tipo, tiempo y concentración de contaminantes donde se han encontrado alteraciones hepáticas, resalta la noción de que el hígado es un órgano blanco de los contaminantes y que su estudio aporta información sobre el estado de salud de los individuos y su ambiente. En este contexto, dentro del primer objetivo de esta tesis se incluyó la evaluación de los cambios histopatológicos en hígados de dos especies de peces Norpatagónicos, el escrófalo *Sebastes oculatus* y el turco, *Pinguipes brasilianus*. Para ello, se estudió y comparó la histología de los hígados de individuos provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica y de sitios de referencia. Con los resultados obtenidos, se aporta información que permita establecer el estado de salud de los organismos, lo que a su vez podría reflejar las condiciones ambientales del sistema acuático bajo estudio.

### 4.3. Metodología

Se procesaron histológicamente un total de 56 hígados. Los preparados histológicos se observaron en microscopio óptico LEICA DM2500 con cámara de fotos incorporada (DFC 450C) con aumentos de 10x, 20x y 40x de magnificación. Los mismos fueron evaluados en una primera instancia para realizar descartes por fallas que pudiesen haber sucedido durante la toma de muestra y/o el procesamiento histológico (conservación; tinción, corte, montaje, etc.) (total descartes=3; quedando un n final de *Pinguipes brasilianus*=19 y *Sebastes oculatus*=34). Luego, se procedió a realizar el análisis histológico y recuento de patologías. Los datos obtenidos se analizaron como se detalla a continuación.

#### 4.3.1. Análisis histopatológico

Para cada especie y por sitio, se determinó la distribución de las lesiones halladas mediante el cálculo de la frecuencia con la que se presentó cada tipo de lesión sobre el total de tipo de lesiones registradas. Por otro lado, para cada alteración histopatológica se calcularon las tasas de prevalencia como el número de individuos que presenta la alteración sobre el total de individuos observados.

La condición histopatológica de los hígados fue establecida para ambas especies siguiendo el método semicuantitativo propuesto por Bernet et al. (1999) (ver detalles en Metodología general). Los detalles fueron descriptos en el Capítulo I, Sección 3.3.1. Análisis histopatológico. Brevemente, las patologías fueron clasificadas en cinco patrones de reacción (PR): circulatorios, progresivos, regresivos, inflamatorios y neoplásicos, que engloban distintas alteraciones patológicas. Luego, a cada alteración encontrada se le asignó un **factor de importancia** y **valor de puntuación** (Tabla I). Con estos valores establecidos se calcularon los siguientes índices (para mayores detalles ver Capítulo I; 3.3.1. Análisis histopatológico).

1) **Índice del hígado ( $I_{hig}$ )**. Este índice representa el grado de daño total en cada hígado.

$$I_{hig} = \sum_{pr} \cdot \sum_{alt} (a_{hig.pr.alt} \times W_{hig.pr.alt})$$

Donde, hig: hígados (constante), pr: patrón de reacción, alt: alteración, a: valor de puntuación, W: factor de importancia.

2) **Índice de Reacción de los hígados ( $I_{\text{hig rp}}$ )**. La calidad de las lesiones en un hígado se expresa mediante este índice de reacción

$$I_{\text{hig rp}} = \sum_{\text{alt}} (a_{\text{hig,rp,alt}} \times W_{\text{hig,pr,alt}})$$

Donde, hig: hígado (constante), pr: patrón de reacción, alt: alteración, a: valor de puntuación, W: factor de importancia.

En el caso de los turcos, que presentan hepatopáncreas, se describieron las patologías registradas sobre el parénquima pancreático o en relación estrecha con el mismo, pero no fueron tenidas en cuenta para los cálculos de los índices histopatológicos ni estuvieron incluidas en los análisis estadísticos, para evitar sobreestimar los resultados de esta especie. Es decir, sólo se consideraron las lesiones relacionadas a la porción hepática del órgano.

#### 4.3.2. Recuento de centros de melanomacrófagos

Para ambas especies y sitios se realizó el recuento total de CMM presentes en cada preparado, utilizando un contador mecánico para tal fin.

#### 4.3.3. Tasa de prevalencia y abundancia de parásitos metazoos

Para cada individuo se registró el número total de parásitos metazoos o quistes parasitarios presentes sobre la superficie total de cada preparado histológico.

Para los parásitos helmintos las prevalencias fueron definidas como el número de individuos infectados sobre el total de individuos examinados. Estas tasas fueron calculadas por sitio y por especie de hospedador. Los valores fueron expresados en porcentaje. La abundancia media se calculó como el número total de parásitos dividido el número total de individuos examinados (incluyendo a los no infectados).

#### 4.3.4. Análisis estadísticos

Las posibles diferencias de los índices calculados, y los recuentos de CMM entre individuos provenientes de sitios expuestos y control se evaluaron mediante test de ANCOVA de un factor, donde se estableció como factor fijo el sitio (con dos niveles: EXP, expuesto; REF, referencia) y como covariable el largo total (LT), debido a que la talla puede influir en los parámetros estudiados. Los análisis se hicieron para cada especie por separado. La normalidad y homocedacea de las variables fueron examinadas mediante los test de Kolmogorov y de Levene respectivamente. Los índices de reacción circulatorios ( $I_{\text{hig circ}}$ ) y regresivos ( $I_{\text{hig reg}}$ ) y los índices hígado ( $I_{\text{hig}}$ ) cumplieron los supuestos para los test paramétricos en ambas especies, así como los índices de reacción progresivo ( $I_{\text{hig prog}}$ ) e inflamatorio ( $I_{\text{hig inf}}$ ) para los turcos. En el caso de los índices de reacción progresivo ( $I_{\text{hig prog}}$ ) e inflamatorio ( $I_{\text{hig inf}}$ ) para escrófalos y los recuentos de centros de melanomacrófagos para ambas especies, se les aplicó la transformación  $\text{Log}_{10}(\text{variable}+1)$ . Ninguno de los dos índices ( $I_{\text{hig prog}}$ ;  $I_{\text{hig inf}}$ ) se ajustaron a los supuestos incluso después de la transformación (variables muy asimétricas) y, por lo tanto, se analizaron mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney.

La prevalencia de parásitos metazoos se analizó mediante pruebas de Chi cuadrado y la abundancia parasitaria mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney.

En todos los casos los resultados fueron considerados como significativos a un  $p < 0,05$ . Todos los análisis fueron desarrollados utilizando el programa SPSS 15.0.

**Tabla I.** Herramientas de evaluación histopatológica para hígados en relación a los patrones de reacción, a la unidad funcional del tejido analizada y a categorías generales de alteraciones, con sus factores de importancia correspondientes según Bernet et al. (1999).

Patrón de reacción	Unidad funcional de tejido	Alteración	Factor de importancia
Disturbios Circulatorios		Hemorragia	I
		Hiperemia/congestión	I
		Dilatación sinusoides	I
Cambios Regresivos	Tejido hepático	Alteraciones de arquitectura y estructura	I
		Alteraciones plasmáticas	I
		Depósitos	I
		Alteraciones nucleares	II
		Atrofia	II
		Necrosis	III
	Tejido intersticial	Alteraciones de arquitectura y estructura	I
		Alteraciones plasmáticas	I
		Depósitos	I
		Alteraciones nucleares	II
		Atrofia	II
		Necrosis	III
	Ducto biliar	Alteraciones de arquitectura y estructura	I
		Alteraciones plasmáticas	I
		Depósitos	I
		Alteraciones nucleares	II
		Atrofia	II
		Necrosis	III
Cambios progresivos	Tejido hepático	Hipertrofia	I
		Hiperplasia	II
	Tejido intersticial	Hipertrofia	I
		Hiperplasia	II
	Ducto biliar	Hipertrofia	I
		Hiperplasia	II
Disturbios inflamatorios		Exudado	I
		Infiltrado	II
Tumores		Tumores benignos	II
		Tumores malignos	III

## 4.4. Resultados

Para ambas especies, la estadística descriptiva de los parámetros determinados se encuentra en la Tabla AI en el Anexo Tabla adicional y abreviaturas. En la misma se detallan los números de muestras utilizados, promedios, medianas, desvío estándar, mínimos y máximos de la extensión de cada alteración histológica y de los índices de Bernet et al. (1999) calculados.

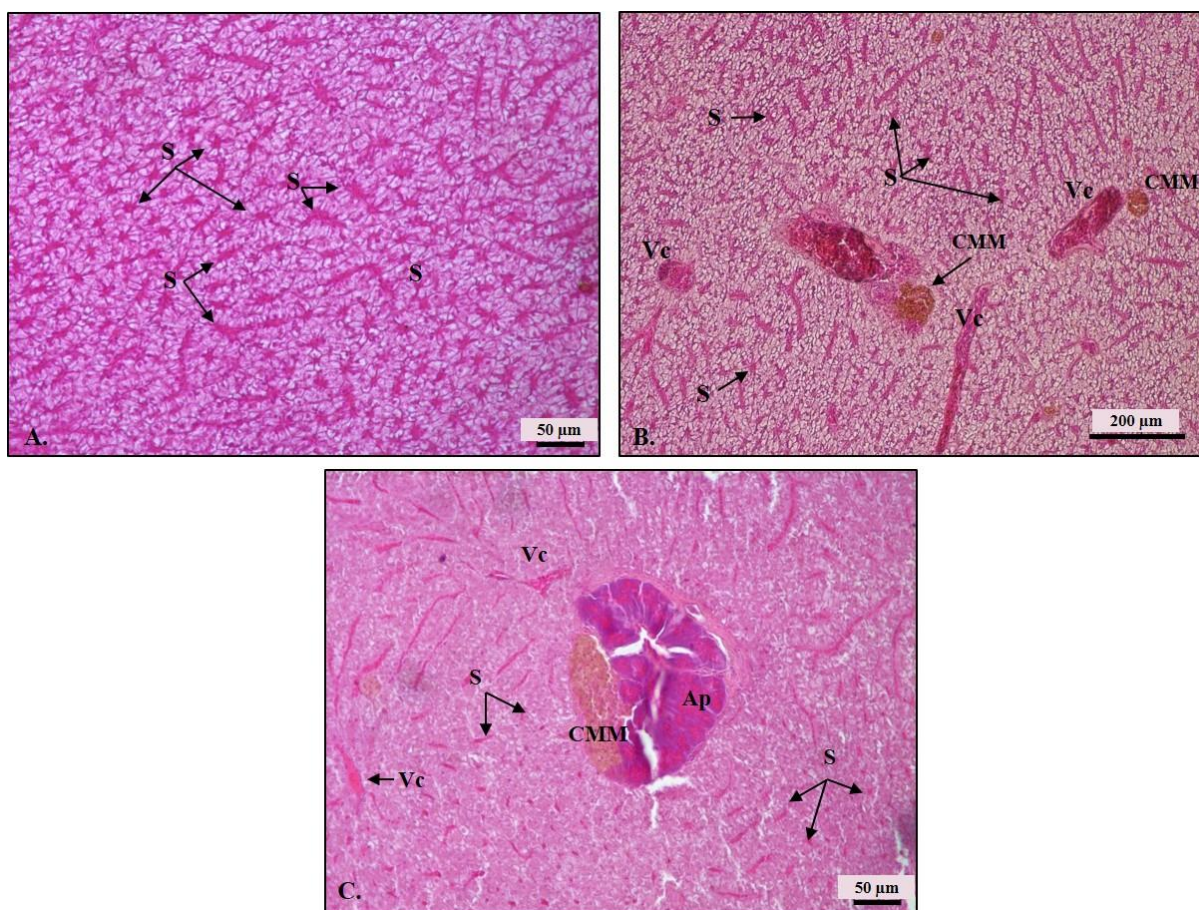
### 4.4.1. Análisis histopatológico

Para los escrófalos, se registraron un total de nueve lesiones en los individuos de sitios de referencia, y 10 en los individuos expuestos. En los hepatopáncreas de los turcos se registraron un total de 12 lesiones en ambos sitios. Las alteraciones encontradas se correspondieron con los patrones de reacción circulatorio, progresivo, regresivo e inflamatorio, no habiéndose registrado lesiones incluidas en el patrón neoplásico. Las mismas se describen a continuación según el patrón de reacción en el que se incluyen:

#### Patrón de reacción circulatorio:

**Congestión vascular:** se observó dilatación de los vasos sanguíneos, con células sanguíneas estancadas en su interior. Se observó con mayor frecuencia en la vena central. Esta lesión posee un factor de importancia grado I, es decir, con importancia patológica mínima y la lesión puede revertirse cuando finaliza la exposición a irritantes (Fig. 7).

**Dilatación de sinusoides:** se observaron sinusoides dilatados por excesivo contenido de células sanguíneas en su interior. Esta lesión posee un factor de importancia grado I (Fig. 7).

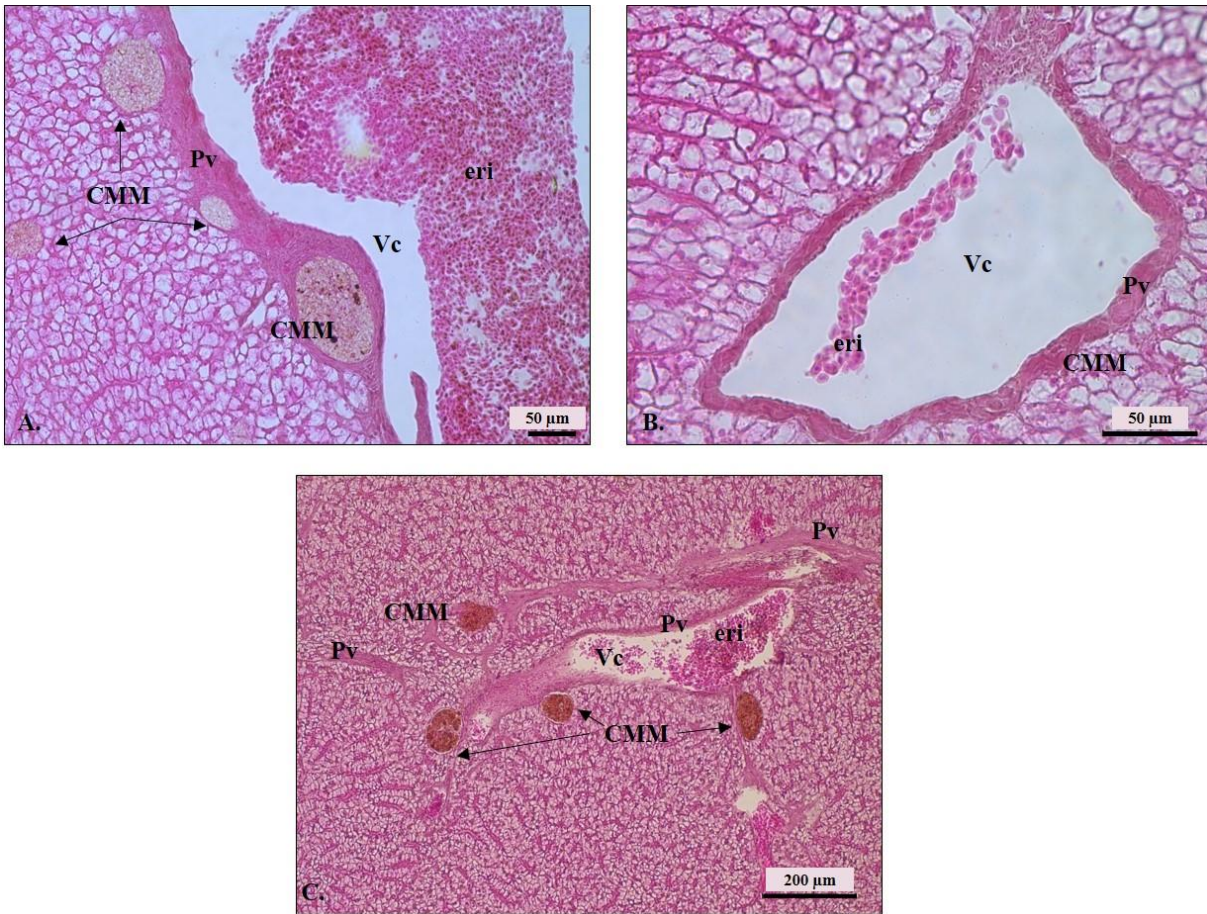


**Figura 7.** Cortes histológicas de hígado y hepatopáncreas de individuos expuestos de (A-B) escrófalo (*S. oculatus*) y (C) turco (*P. brasilianus*). (A) Sinusoides (S) congestivos y dilatados con sangre en su interior. La congestión se distribuye uniformemente en el preparado. (B) Sinusoides (S) congestivos y dilatados, venas ventrales (Vc) congestivas y centros de melanomacrófagos (CMM). (C) Se destacan sinusoides (S) congestivos y dilatados, venas centrales (Vc) congestivas, un acino pancreático (Ap) y un centro de melanomacrófagos (CMM) en relación al mismo.

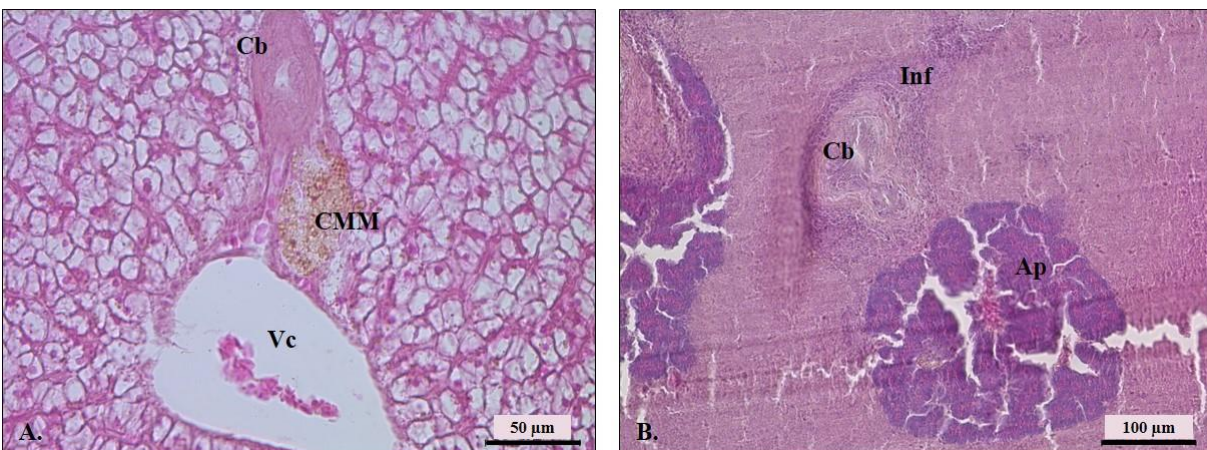
Patrón de reacción progresivo:

**Vasculitis:** se observó como incremento en el grosor de la pared de los vasos sanguíneos por proliferación (hiperplasia) de su tejido conjuntivo. Esta lesión posee un factor de importancia grado II, es decir, con importancia patológica moderada y la lesión podría revertirse en algunos casos si se neutraliza el factor estresante (Fig. 8).

**Hiperplasia del conducto biliar:** se observó como una proliferación de tejido epitelial y/o conjuntivo de los conductos biliares. Debido al aumento en el número de capas de células epiteliales y/o al aumento de la cantidad de fibroblastos y fibras colágenas que se disponen en forma concéntrica en torno a los conductos. En reiteradas ocasiones se presentó asociada a infiltración inflamatoria y melanomacrófagos. Esta lesión posee un factor de importancia grado II (Fig. 9).



**Figura 8.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*). (A) Vasculitis (incremento de grosor de la pared vascular (Pv)) por proliferación de tejido conectivo. En el interior de la vena central (Vc) se observan eritrocitos (Eri). El área presenta una alta densidad de centros de melanomacrófagos (CMM). (B) Vasculitis (Pv). Vena central (Vc) con eritrocitos (Eri). (C) Vasculitis (Pv), eritrocitos (Eri) en vena central (Vc) y alta densidad de centros de melanomacrófagos (CMM).



**Figura 9.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*) y (B) turco (*P. brasiliensis*). (A) Diada hepática compuesta por una vena central (Vc) y conducto biliar (Cb) que presenta hiperplasia conjuntiva. Centro de melanomacrófagos (CMM). (B) Conducto biliar (Cb) con hiperplasia conjuntiva e infiltración leucocitaria (Inf). Se observa además acino pancreático (Ap).

### Patrón de reacción regresivo:

Vacuolización de hepatocitos: en pocos casos se observaron pequeñas vacuolas en el citoplasma celular. Pero la mayoría de las veces se observó una vacuola grande que desplaza al citoplasma y al núcleo hacia la periferia de la célula. Se encontraron dos tipos de vacuolización, difusa que afectó a todo el parénquima hepático o la mayoría del mismo y, focal, que ocurrió con menor frecuencia, y se caracterizó por células vacuolizadas que formaban focos en áreas de diversos tamaños. Pudo evidenciarse además, que en algunos casos el núcleo también sufrió cambios como elongación o “forma de medialuna”, condensación de cromatina y densidad óptica nuclear aumentada. La vacuolización de los hepatocitos también es, a su vez, una hipertrofia celular debido a que cursa, en algunos casos, con un agrandamiento en el tamaño celular. De hecho, en los casos en los que el agrandamiento fue extremo, se pudo observar la ruptura celular y núcleos picnóticos. Si bien la hipertrofia correspondería al patrón de reacción progresivo, este tipo de lesión se ubicó en los cambios regresivos debido a que está dada por una vacuolización que puede ser degenerativa e incluso llevar a la ruptura y/o muerte celular. Esta lesión posee un factor de importancia grado II (Fig. 10).

Degeneración grasa: se observó como una gota lipídica grande en el citoplasma de los hepatocitos, que desplazaba el núcleo hacia la periferia. En algunos casos, el núcleo celular no estaba presente observándose como vacuolas lipídicas aisladas. En otros casos, las vacuolas provocaron la ruptura de la membrana celular y alteraciones nucleares. Esta lesión posee un factor de importancia grado II (Fig. 10,11).

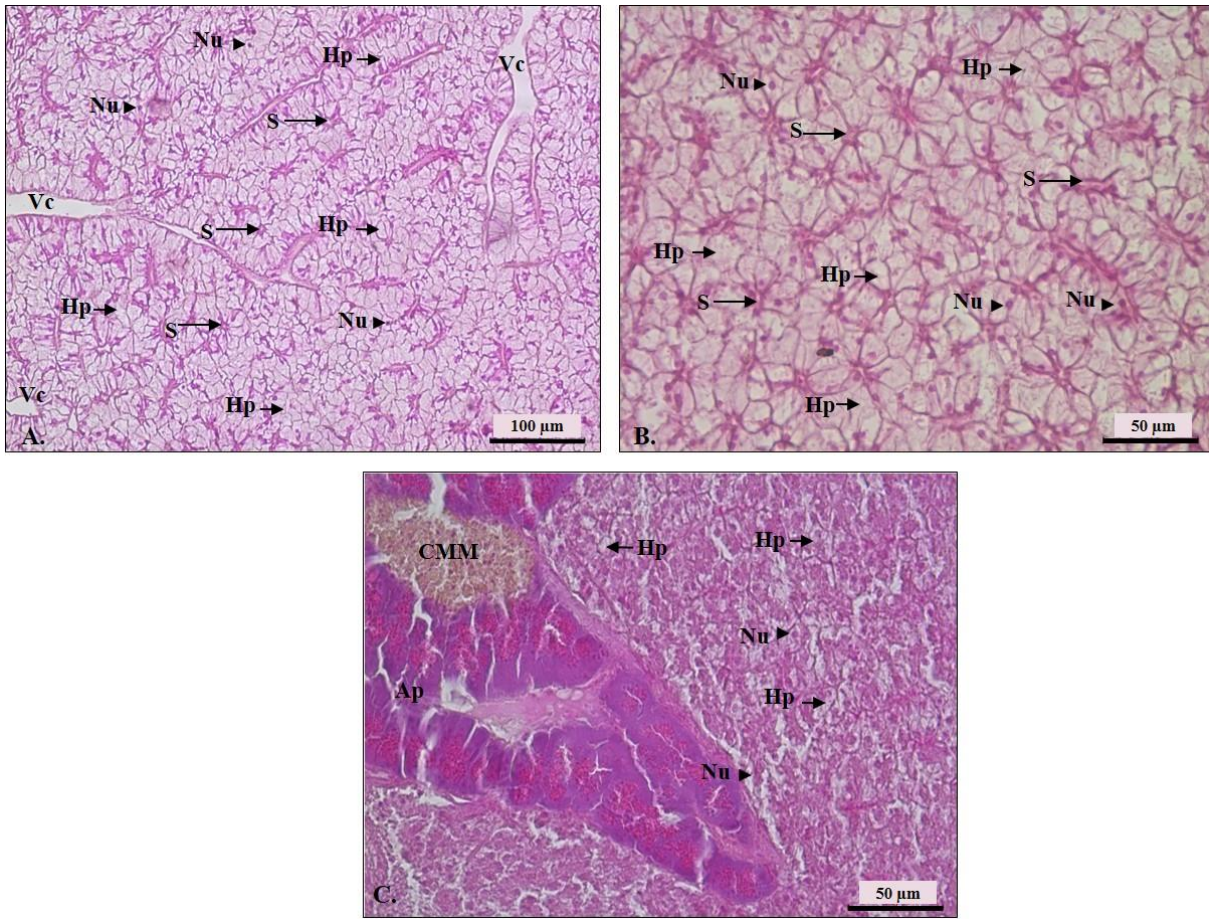
Degeneración eosinofílica: los hepatocitos alterados presentaron un citoplasma más eosinofílico (acidófilo), es decir, retenían mayor cantidad de eosina. En ocasiones, esta coloración estuvo acompañada de una alteración en la forma y tamaño celular, perdiendo su contorno poliédrico habitual y presentando hipertrofia. Estos focos se encontraron ocasionalmente asociados con hiperplasia de los vasos sanguíneos. Esta lesión posee un factor de importancia grado II (Fig. 12).

Edema: se registró principalmente en espacios periportales y se caracterizó por una separación entre el parénquima hepático y los vasos presentes en dicho espacio. Se observó como líquido tisular claro (que se ha filtrado de los capilares al tejido), frecuentemente rosado. Esta lesión posee un factor de importancia grado I (Fig. 13).

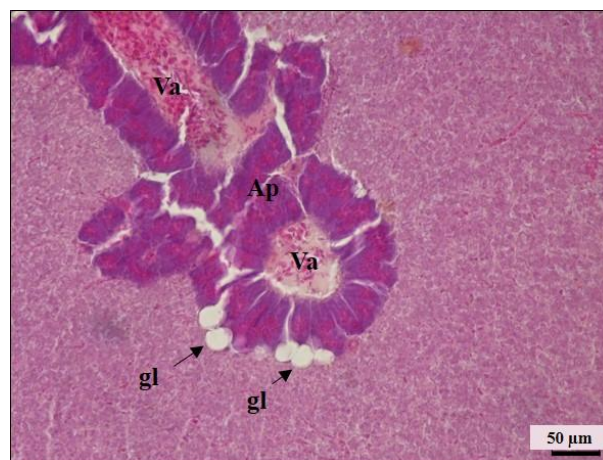
Necrosis hepatocelular: este estado patológico de una célula o tejido que aparece tras una pérdida irrevocable de la función, se evidenció en algunos casos como eosinofilia, los hepatocitos presentaron un aspecto vítreo o claro, acompañado de picnosis nuclear o incluso, ausencia del núcleo. En ciertos casos, las necrosis fueron puntuales, circunscriptas a un área, en otros aparecieron difusas por el parénquima y en reiteradas oportunidades se observaron asociadas a los vasos sanguíneos con presencia de infiltrados linfocíticos y melanomacrófagos. Esta alteración posee un factor de importancia grado III, es decir, posee marcada importancia patológica, es generalmente irreversible y conduce a la pérdida parcial o total de la función del órgano (Fig. 14).

Necrosis del conducto biliar: se observó en reiteradas oportunidades cuando estaba presente la hiperplasia del conducto descripta con anterioridad. En estos casos se pudo observar dicha hiperplasia pero asociada a necrosis circunscripta a la misma. Esta alteración posee un factor de importancia grado III (Fig. 15).

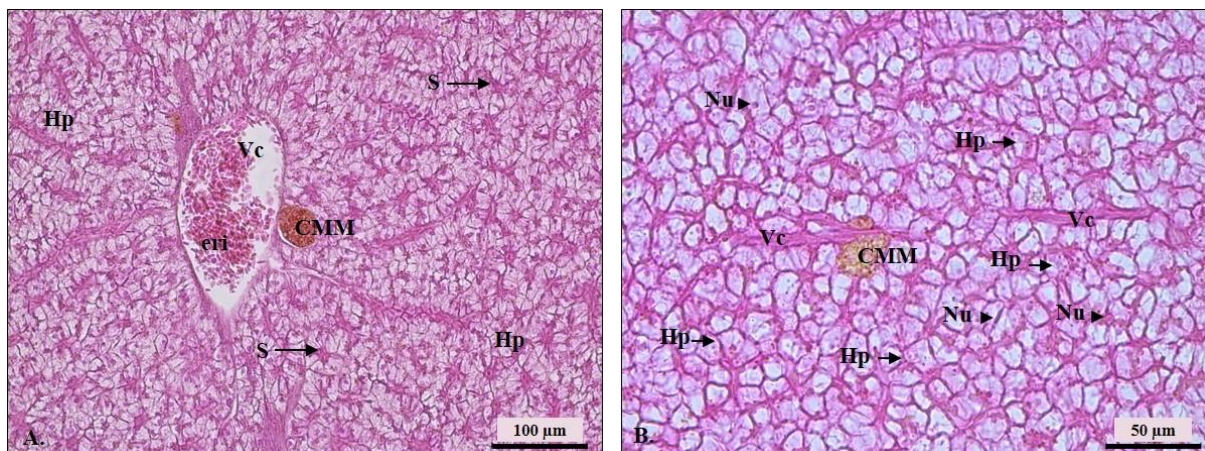
Alteraciones nucleares: se observaron asociadas a otras patologías como vacuolización en donde el núcleo se observó desplazado hacia la periferia o, en casos severos de vacuolización, se observó ruptura celular con pérdida de núcleos. También se observó en los casos de necrosis en los que el núcleo se encontró picnótico (aspecto condensado) o incluso inexistente. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 10 y 14).



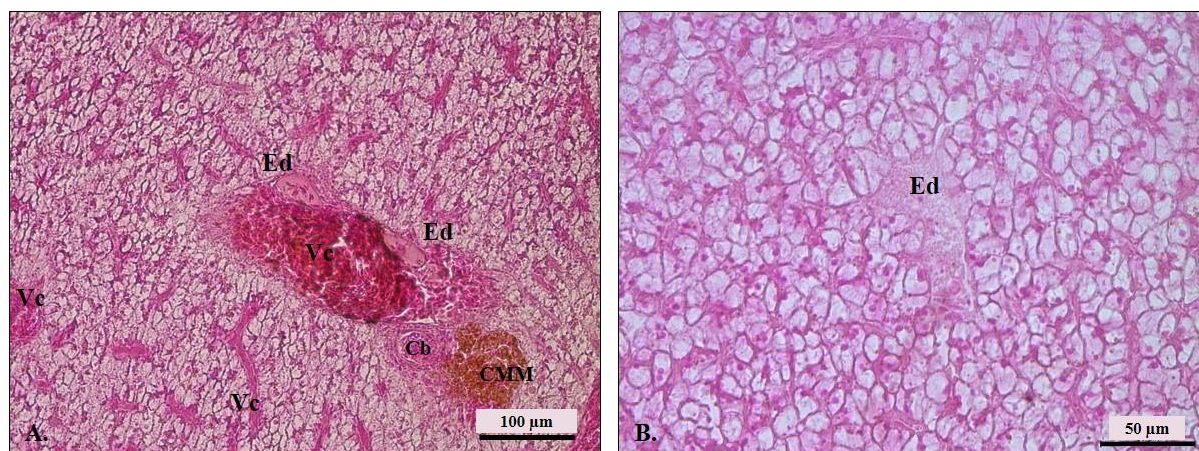
**Figura 10.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de (A-B) escrófalo (*S. oculatus*) y (C) turco (*P. brasilianus*). (A) Cordones de hepatocitos (Hp) vacuolizados con citoplasma claro y núcleos (Nu) desplazados hacia la periferia celular; dispuestos en torno a los sinusoides (S). Vena central (Vc). (B) Hepatocitos vacuolizados (Hp), núcleos (Nu) periféricos, sinusoides (S). Puede observarse además, eosinofilia citoplasmática. (C) Vacuolización focalizada de hepatocitos (Hp), se indican núcleos (Nu), acino pancreático (Ap) y centro de melanomacrófagos (CMM).



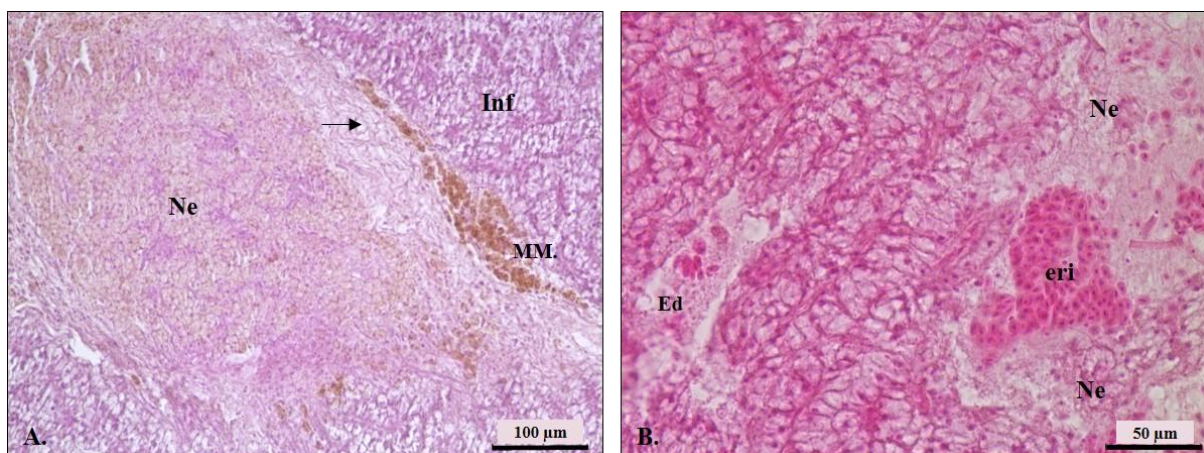
**Figura 11.** Corte histológico de hígado de individuo expuesto de turco (*P. brasilianus*). Se indica vacuolas o “gotas” lipídicas aisladas (gl) sin núcleos, entre el parénquima hepático y los acinos pancreáticos (Ap). Vena aferente pancreática (Va).



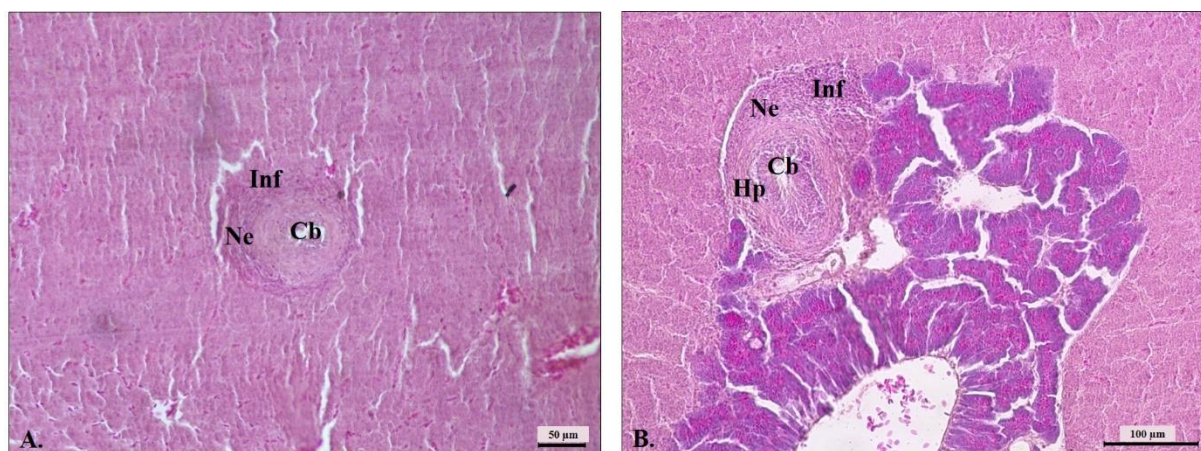
**Figura 12.** Cortes histológicas de hígado de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*). (A) Hepatocitos con eosinofilia citoplasmática, vena central (Vc) con eritrocitos (eri), sinusoides (S) congestivos y centros de melanomacrófagos (CMM). (B) Área de hepatocitos con citoplasma eosinofílico (Hp) y núcleos (Nu) de los mismos, venas centrales (Vc) congestivas y centro de melanomacrófagos (CMM).



**Figura 13.** Cortes histológicas de hígado de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*). (A) Cordones de hepatocitos con eosinofilia citoplasmática y vacuolización, en torno a sinusoides congestivos. Venas centrales (Vc) congestivas. Se indica edema (Ed) perivascular con infiltrado inflamatorio asociado. Conducto biliar (Cb), centro de melanomacrófagos (CMM). (B) Cordones de hepatocitos vacuolizados con leve eosinofilia citoplasmática. Edema (Ed) entre hepatocitos que separa los mismos.



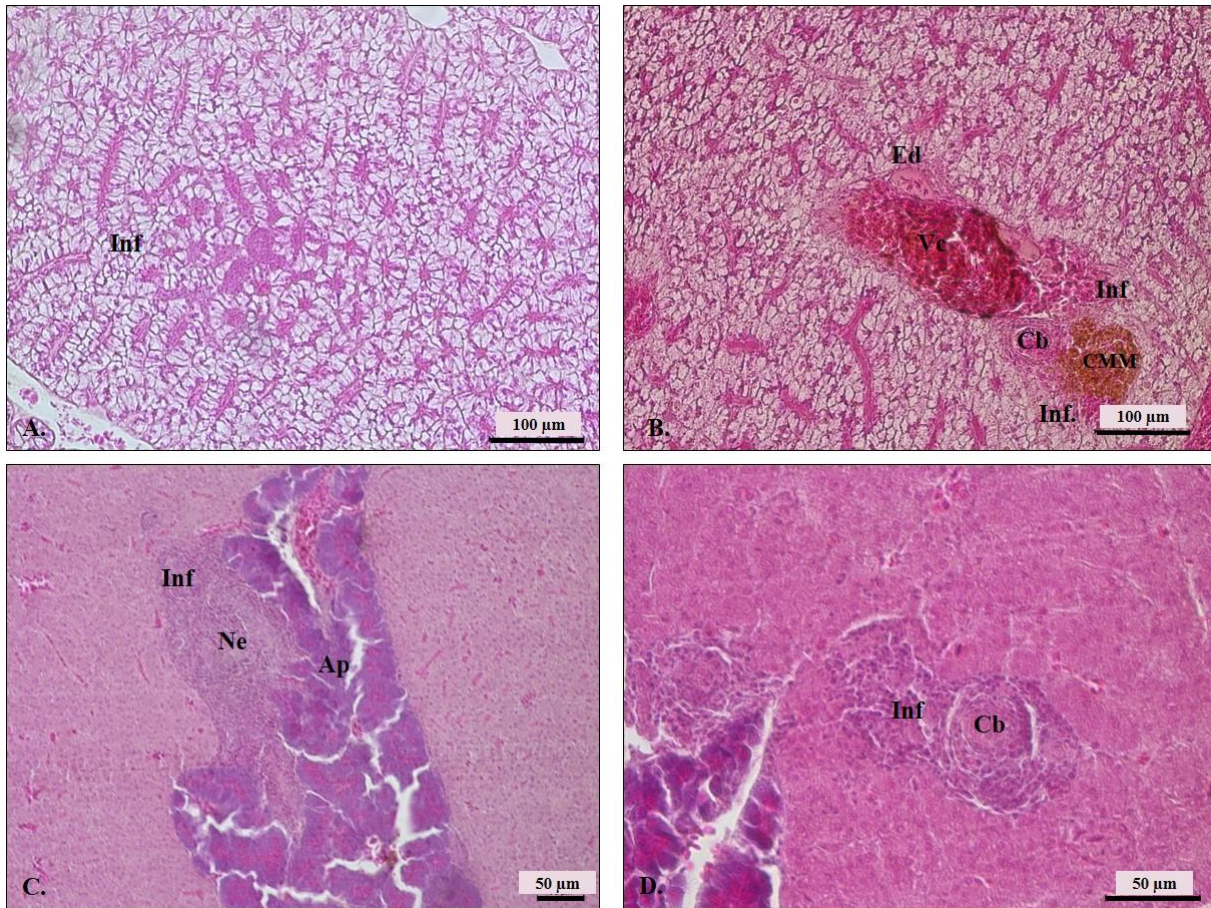
**Figura 14.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de escarabajo (*S. oculatus*). (A) Área de necrosis (Ne) con infiltrados inflamatorios (Inf) y melanomacrófagos (MM). Se indica (flecha) zonas de marcada pérdida de estructura celular y núcleos. (B) Zona de necrosis (Ne), con pérdida de estructuras celulares, presencia de edema (Ed) y eritrocitos (eri). Hepatocitos con eosinofilia citoplasmática.



**Figura 15.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de turco (*P. brasiliensis*). (A) Conducto biliar (Cb) con hiperplasia (Hp) conjuntiva, rodeado por necrosis (Ne) e infiltrado inflamatorio (Inf) circunscriptos a la hiperplasia. (B) Necrosis (Ne) e infiltrado inflamatorio (Inf) en torno y circunscriptos a un conducto biliar (Cb) con hiperplasia conjuntiva (Hp). Las lesiones están en proximidad a acinos pancreáticos.

#### Patrón de reacción inflamatorio:

Infiltrado: se observaron principalmente como agrupaciones de linfocitos que frecuentemente estuvieron asociados con melanomacrófagos y en torno a las venas centrales. Además, se notaron infiltrados difusos compuestos predominantemente por linfocitos dispersos dentro del parénquima hepático. Esta alteración posee un factor de importancia grado II (Fig. 9; 14; 15 y 16).



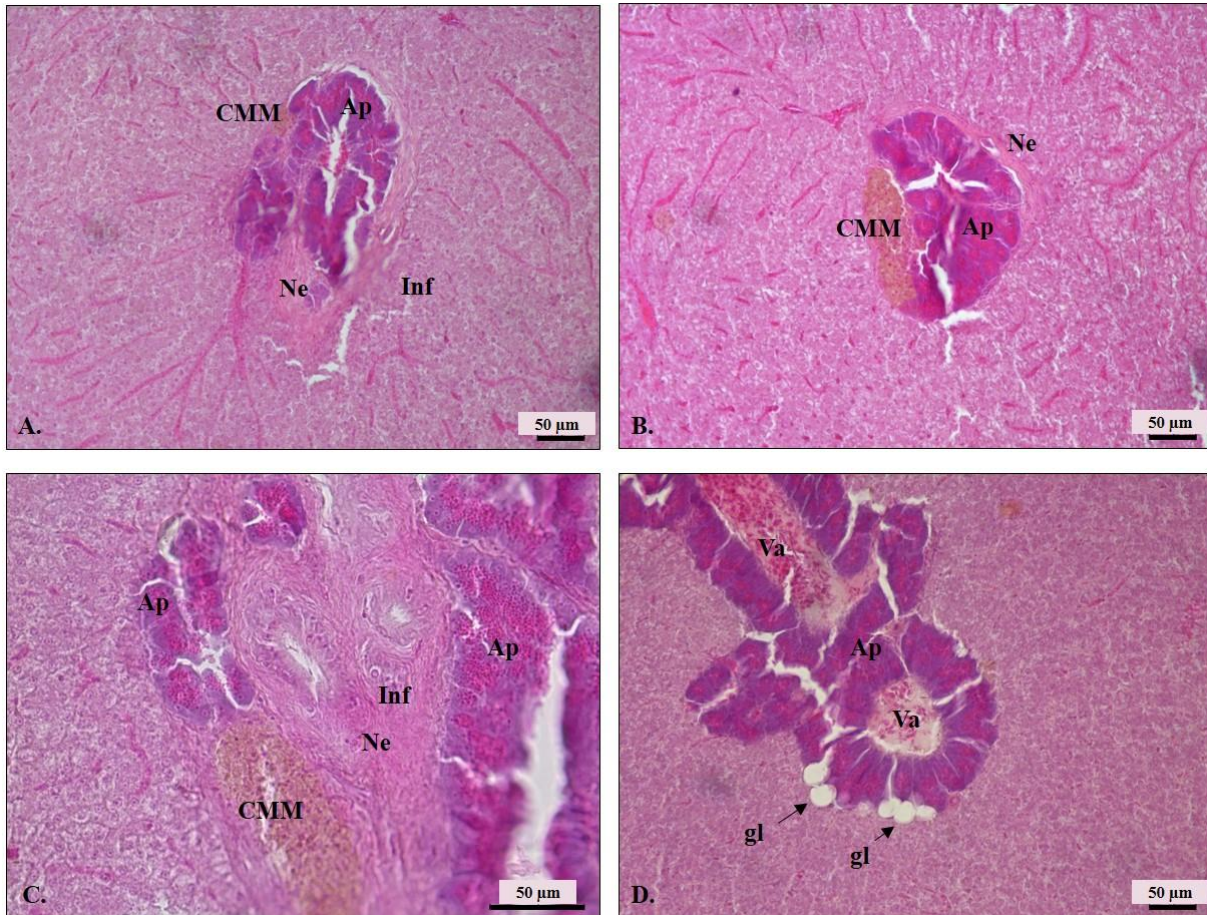
**Figura 16.** Cortes histológicos de hígado de individuos expuestos de (A-B) escrófalo (*S. oculatus*) y (C-D) turco (*P. brasilianus*). (A) Infiltrado inflamatorio (Inf) difuso entre los hepatocitos. (B) Venas centrales (Vc) congestivas, edema perivascular (Ed) asociado a infiltrado inflamatorio (Inf). Centros de melanomacrófagos (CMM). (C) Área de necrosis (Ne) e infiltrado inflamatorio (Inf) en relación a acinos pancreáticos (Ap). (D) Conducto biliar (Cb) con hiperplasia conjuntiva, infiltrado inflamatorio (Inf) circunscripto al mismo.

Se describen a continuación las lesiones registradas en relación a la porción pancreática del hepatopáncreas de los turcos:

**Vacuolización hepatopancreática:** se observaron vacuolas con contenido graso aisladas, como gotas lipídicas, en su mayoría en torno al tejido pancreático, aunque también se observaron inmersas en el parénquima pancreático (Fig. 17D).

**Necrosis pancreática:** se presentó principalmente en torno a los acinos pancreáticos o entre los mismos y el parénquima hepático, extendiéndose además sobre el parénquima pancreático. En reiteradas ocasiones esta lesión se presentó asociada a proliferación de tejido conjuntivo y también a infiltrados inflamatorios (Fig. 17 A-B-C) y de melanomacrófagos, como una inflamación crónica de la zona.

Infiltrado inflamatorio: se presentaron asociados o no a necrosis. Compuestos principalmente por linfocitos y melanomacrófagos (Fig. 17 A-C).



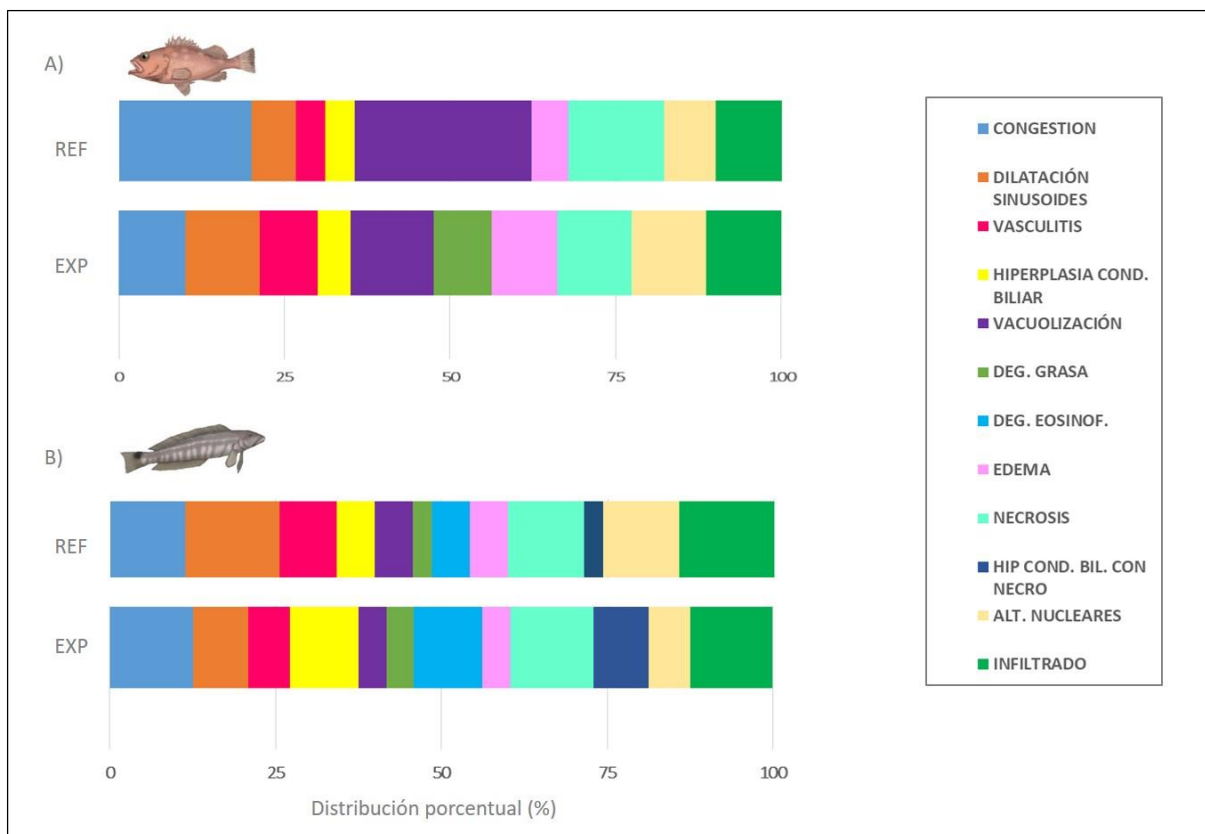
**Figura 17.** Cortes histológicos de hepatopáncreas de individuos expuestos de turco (*P. brasiliensis*). (A) Acino pancreático (Ap), área necrótica (Ne), infiltrado inflamatorio (Inf) y centros de melanomacrófagos (CMM) en torno al mismo. (B) Acino pancreático (Ap) con necrosis (Ne) e infiltrado por centros de melanomacrófagos (CMM). (C) Área de necrosis (Ne) con pérdida total de la arquitectura celular, presencia de infiltrado inflamatorio (Inf) y centros de melanomacrófagos (CMM). Se observa congestión e infiltrado en los hepatocitos circundantes. (D) Se indica vacuolas o “gotas” lipídicas aisladas (gl), acinos pancreáticos (Ap). Vena aferente pancreática (Va).

#### 4.4.2. Distribución de lesiones histológicas

La distribución de las lesiones presentes para cada especie y sitio puede observarse en la Fig. 18. En ambas especies, pero de forma más acentuada en los escrófalos, los individuos provenientes de sitios control presentaron una tendencia a una distribución de frecuencia de lesiones heterogénea, mientras que los individuos de sitio expuestos parecerían sugerir una distribución uniforme. Para ambas especies y sitios, las lesiones predominantemente registradas estuvieron incluidas en los patrones de reacción circulatorio, regresivo e inflamatorio, y sólo en el caso de los turcos expuestos también se

registraron entre las más frecuentes, lesiones pertenecientes al patrón de reacción progresivo. Respecto de los escrófalos de sitios control, las dos lesiones más frecuentes representaron casi el 50% de la totalidad de las mismas y fueron vacuolización (26,67%) y congestión (20%). Estas estuvieron seguidas por necrosis (14,44%) e infiltrado inflamatorio (10%). Mientras que el resto de las lesiones encontradas representaron menos del 10% del total cada una, entre ellas, las menos frecuentes fueron la vasculitis e hiperplasia del conducto biliar (4,44% para ambas lesiones) y la degeneración eosinofílica, que no fue encontrada en escrófalos controles. En el caso de los escrófalos de sitios expuestos, la mayoría de las lesiones registradas mostraron frecuencias cercanas al 10%, siendo las predominantes vacuolización (12,5%), dilatación de sinusoides, necrosis, alteraciones nucleares e infiltrado inflamatorio (11,25% cada una) y congestión y edema (10% cada una). Mientras que las tres lesiones restantes reportadas representaron cada una menos del 10% de la totalidad de las lesiones, siendo la hiperplasia del conducto biliar la que se presentó con menor frecuencia (5%).

Con respecto a los turcos controles, las dos lesiones que fueron registradas con mayor frecuencia representaron el 30% de la totalidad de las mismas y fueron dilatación de sinusoides e infiltrado (14,29% cada una). Estas fueron seguidas por congestión, necrosis y alteraciones nucleares (11,43% cada una). Mientras que el resto de las lesiones encontradas representaron cada una menos del 10%, entre ellas, las menos frecuentes fueron degeneración grasa y necrosis del conducto biliar (2,86% cada una). En el caso de los turcos provenientes de sitios expuestos las lesiones más representativas mostraron frecuencias cercanas al 10% del total y fueron congestión, necrosis e infiltrado (12,5% cada una) e hiperplasia del conducto biliar y degeneración eosinofílica (10,42% cada una). Mientras que, las siete lesiones restantes registradas representaron menos del 10% de la totalidad de las lesiones, siendo las menos frecuentes la vacuolización, degeneración grasa y edema (4,17%).

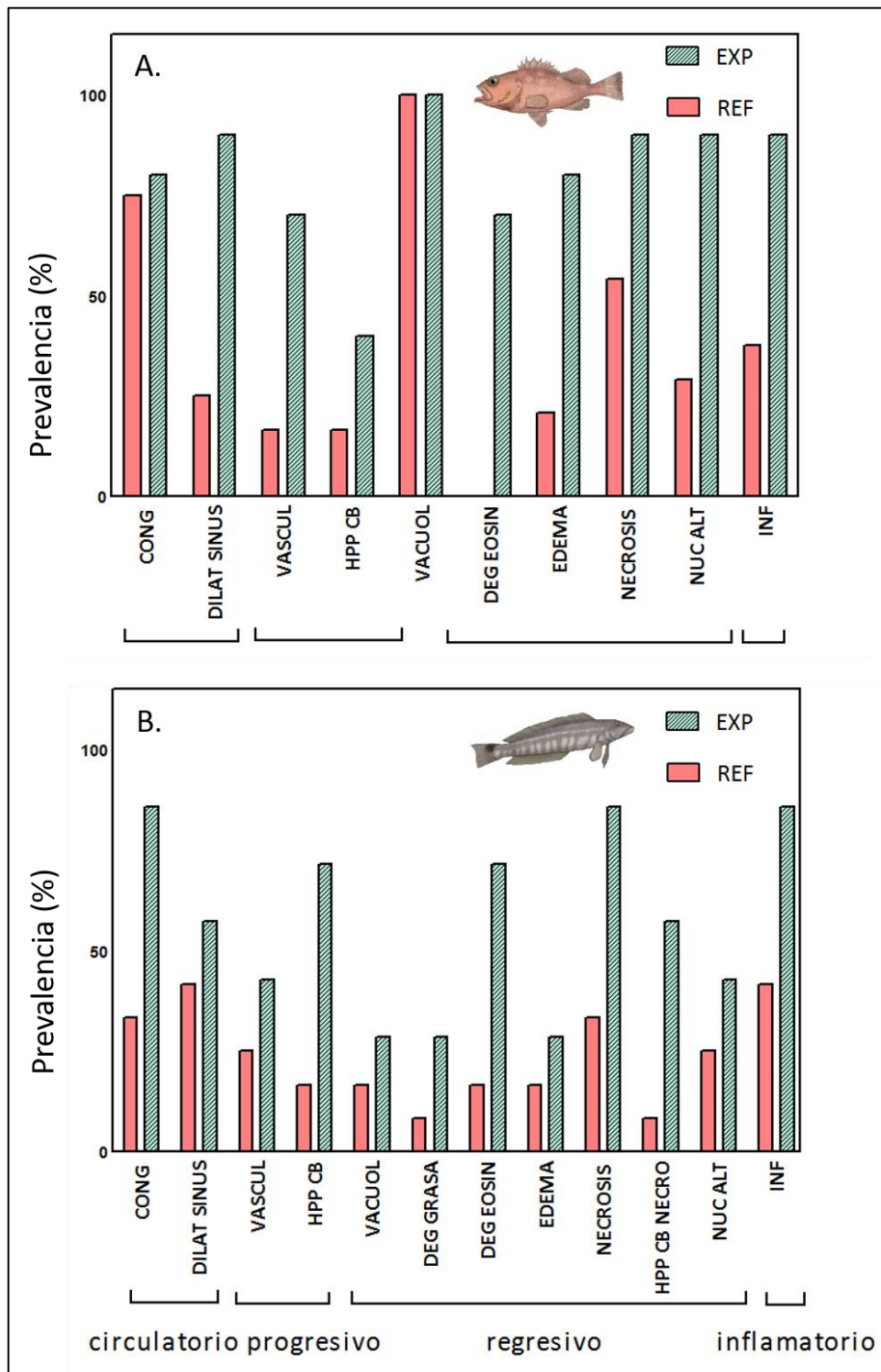


#### 4.4.3. Prevalencias de lesiones histológicas

Las prevalencias de las alteraciones histológicas registradas en los hígados de esgrófalos y turcos de sitios de referencia y expuestos se encuentran detalladas en la Figura 19. Las patologías con mayor prevalencia en esgrófalos de sitios control correspondieron a los patrones circulatorio y regresivo. Las lesiones con prevalencias mayores al 50% fueron vacuolización, que estuvo presente en todos los individuos (100%), congestión (75%) y necrosis (54,16%). El resto de las lesiones presentaron prevalencias menores al 40%, siendo las menos prevalentes la vasculitis y la hiperplasia del conducto biliar (16,67% cada una), ambas incluidas en el patrón de reacción progresivo. Ningún individuo presentó degeneración eosinofílica. En el caso de los esgrófalos expuestos, nueve de las 10 lesiones reportadas tuvieron prevalencias mayores al 50%, siendo la más prevalente la vacuolización, que estuvo presente en todos los individuos (100%), seguida por dilatación de sinusoides, necrosis, alteraciones nucleares e infiltrado inflamatorio con prevalencias del 90% cada una. Congestión,

edema, vasculitis y degeneración eosinofílica se observaron con prevalencias de entre 70 y 80%. La patología con menor prevalencia fue la hiperplasia del conducto biliar (40%) incluida en el patrón progresivo.

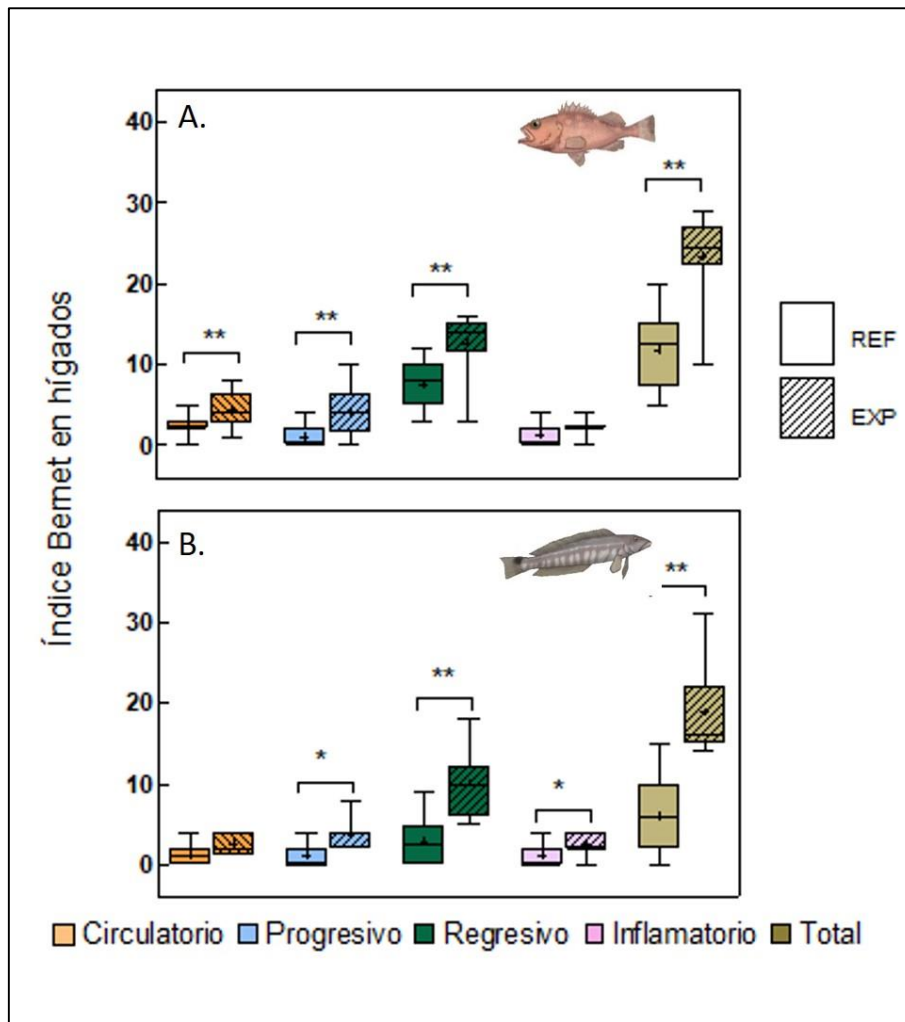
Con respecto a los turcos, para los individuos provenientes de sitios control, ninguna lesión presentó prevalencias mayores al 50%. Las lesiones más prevalentes fueron dilatación de sinusoides e infiltrado inflamatorio (41,67% cada una), seguidas por congestión y necrosis (33,33%), incluidas en los patrones de reacción circulatorio, regresivo e inflamatorio. El resto de las lesiones presentaron prevalencias menores al 25%, siendo las menos prevalentes necrosis del conducto biliar y degeneración grasa (8,33%) incluidas en el patrón regresivo. Con respecto a los turcos de sitios expuestos a contaminación, siete de las 12 lesiones registradas tuvieron una prevalencia mayor al 50% y estuvieron incluidas en los cuatro patrones de reacción encontrados. La congestión, la necrosis y el infiltrado fueron las más prevalentes (85,71%), seguidas por hiperplasia del conducto biliar y degeneración eosinofílica (71,42%) y por último dilatación de sinusoides y necrosis del conducto biliar con una prevalencia del 57,14% cada una. Las restantes lesiones presentaron prevalencias menores al 50%, de las cuales las menos prevalentes fueron la vacuolización, degeneración grasa y edema (28,57%), incluidas en el patrón de reacción regresivo.



**Figura 19.** Prevalencias de las lesiones histopatológicas hepáticas registradas en (A) esrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasiliensis*) provenientes de sitios expuestos a contaminación antrópica (EXP) y de sitios de referencia (REF). Para las abreviaturas de las lesiones ver Anexo Tabla adicional y Abreviaturas.

#### 4.4.4. Índices histopatológicos

Para los escrófalos se encontró que los índices de reacción circulatorio, progresivo, regresivo y el índice hígado (total) fueron mayores en los individuos provenientes de sitios expuestos que en los individuos control (Tabla II). Mientras que el índice inflamatorio no mostró diferencias entre sitios (Tabla II; Fig. 20). En el caso de los turcos, los índices de reacción progresivo, regresivo, inflamatorio y el índice hígado fueron mayores en los individuos provenientes de sitios expuestos respecto de los controles (Tabla III; Fig. 20). Respecto del patrón de reacción circulatorio, no se encontraron diferencias entre sitios (Tabla III; Fig. 20). La influencia de la talla sobre las alteraciones registradas resultó no significativa ( $p > 0,05$ ) para todos los índices calculados.



**Figura 20.** Diagrama de cajas de índices de reacción e índice hígado obtenidos para (A) esdrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasiliensis*) mostrando los efectos del sitio (REF: referencia, EXP: expuesto) según los análisis de la Tabla II y III. Los efectos significativos de los análisis se indican con asteriscos (\*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). Los diagramas de caja representan medianas (líneas horizontales dentro de cajas), percentiles 25 y 75 (bordes de cajas) y mínimos y máximos (bigotes).

**Tabla II.** Análisis estadísticos sobre los índices de reacción e índice total de las alteraciones histopatológicas hepáticas de escrófalos *S. oculatus* de sitios expuestos a contaminación y de referencia.

Índice	Análisis	Estadístico	n	P
I <sub>Hig Prog</sub>	Mann-Whitney U-test	U = 43,500	34	<b>&lt;0,010</b>
I <sub>Hig Inf</sub>	Mann-Whitney U-test	U = 70,500	34	0,061
I <sub>Hig Circ</sub>	ANCOVA	F = 11,105	34	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	34	0,900
		LT F = 0,016		
I <sub>Hig Reg</sub>	ANCOVA	F = 29,180	34	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	34	0,591
		LT F = 0,295		
I <sub>Hig</sub>	ANCOVA	F = 48,958	34	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	34	0,942
		LT F = 0,325		

**Nota.** I<sub>Hig Prog</sub>= Índice de reacción progresivo de los hígados. I<sub>Hig Inf</sub>= Índice de reacción inflamatorio de los hígados. I<sub>Hig Circ</sub>= Índice de reacción circulatorio de los hígados. I<sub>Hig Reg</sub>= Índice de reacción regresivo de los hígados. I<sub>Hig</sub>= Índice hígado. LT= Largo total; n=número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.

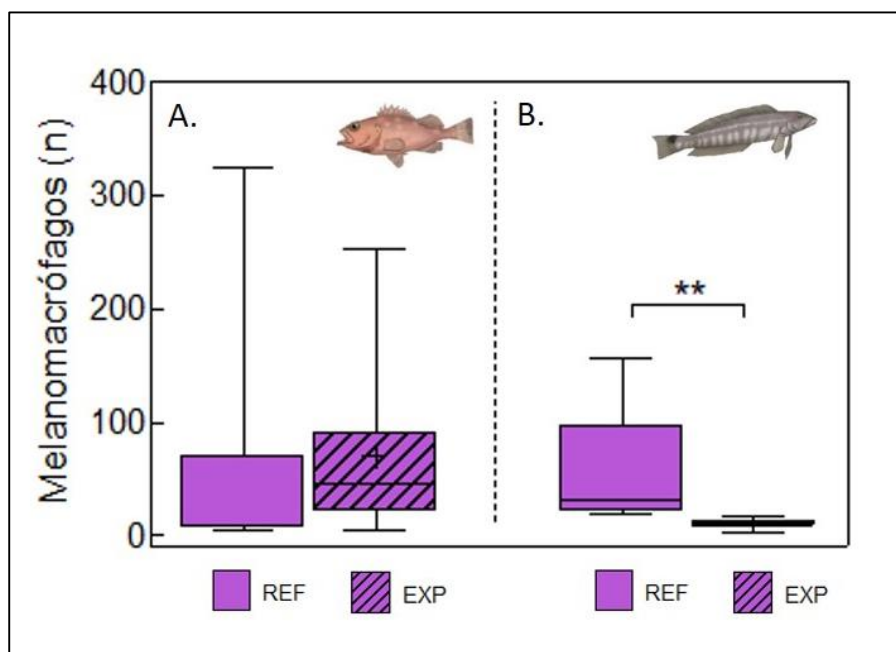
**Tabla III.** Análisis estadísticos sobre los índices de reacción e índice total de las alteraciones histopatológicas hepáticas de turcos *P. brasiliensis* de sitios expuestos a contaminación antrópica y de referencia.

Índice	Análisis	Estadístico	n	P
I <sub>Hig Circ</sub>	ANCOVA	F = 4,258	19	0,056
		Covariable	19	0,949
		LT F = 0,004		
I <sub>Hig Prog</sub>	ANCOVA	F = 7,348	19	<b>0,015</b>
		Covariable	19	0,942
		LT F = 0,005		
I <sub>Hig Reg</sub>	ANCOVA	F = 13,976	19	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	19	0,884
		LT F = 0,022		
I <sub>Hig Inf</sub>	ANCOVA	F = 5,271	19	<b>0,036</b>
		Covariable	19	0,597
		LT F = 0,291		
I <sub>Hig</sub>	ANCOVA	F = 22,252	19	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	19	0,838
		LT F = 0,043		

**Nota.** I<sub>Hig Circ</sub>= Índice de reacción circulatorio de los hígados. I<sub>Hig Prog</sub>= Índice de reacción progresivo de los hígados. I<sub>Hig Reg</sub>= Índice de reacción regresivo de los hígados. I<sub>Hig Inf</sub>= Índice de reacción inflamatorio de los hígados. I<sub>Hig</sub>= Índice hígado. LT= Largo total; n=número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.

#### 4.4.5. Centros de melanomacrófagos

Para los escrófalos, los recuentos de melanomacrófagos no difirieron entre los individuos provenientes de sitios expuestos y los individuos control, mientras que turcos provenientes del sitio control mostraron mayores recuentos que lo individuos expuestos (Tabla IV; Fig. 21).



**Figura 21.** Diagrama de cajas de recuentos de melanomacrófagos hepáticos obtenidos para (A) escrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasilianus*) mostrando los efectos del sitio (REF: referencia, EXP: expuesto) según los análisis de la Tabla V. Los efectos significativos se indican con asteriscos (\*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). Los diagramas de caja representan medianas (líneas horizontales dentro de cajas), percentiles 25 y 75 (bordes de cajas) y mínimos y máximos (bigotes).

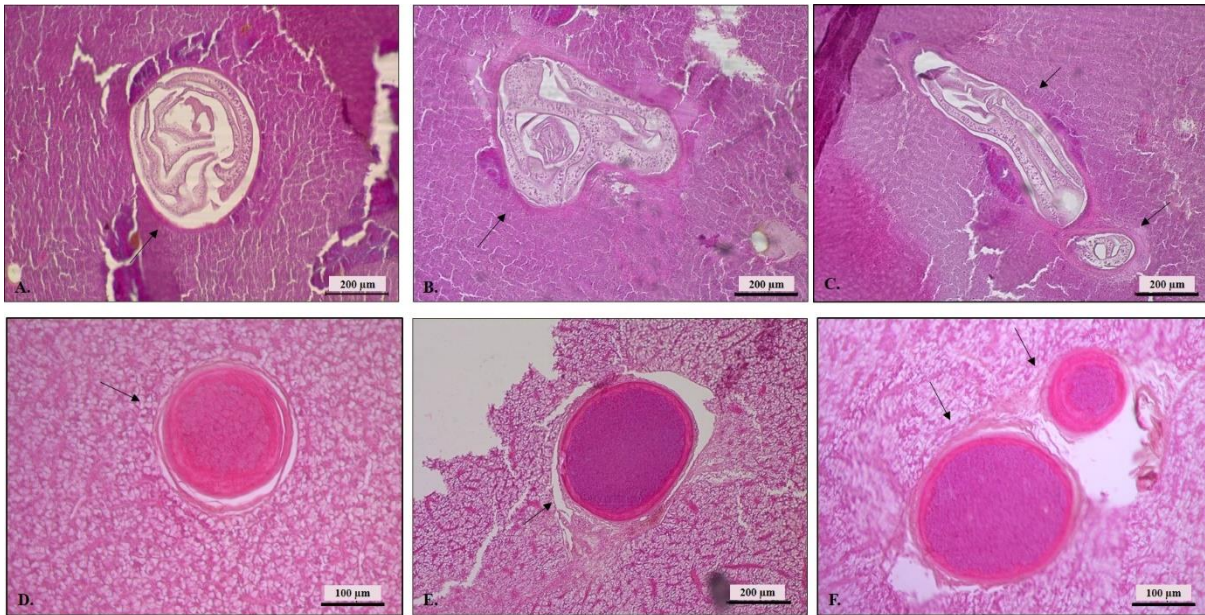
**Tabla IV.** Análisis estadísticos de ANCOVA sobre los recuentos de centros de melanomacrófagos (CMM) hepáticos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasilianus*) de sitios expuestos a contaminación antrópica y de referencia.

Especie	Parámetro	Estadístico	n	P
Escrófalo	MM	F = 2,193	34	0,149
		Covariable	34	<0,010
		LT F = 27,320		
Turco	MM	F = 9,896	19	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable	19	0,055
		LT F = 4,267		

**Nota.** LT= Largo total; n=número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.

#### 4.4.6. Tasa de prevalencia y abundancia de parásitos metazoos

Se encontraron quistes de diferentes parásitos metazoos (Fig. 22). En el caso de los escrófalos, no se observaron diferencias entre los individuos expuestos y referencia respecto de la prevalencia y abundancia de parásitos de hígados (Tabla V). Por su parte, los turcos de sitios expuestos mostraron una mayor prevalencia de parasitosis respecto de los individuos referencia, a diferencia de la abundancia sobre la que no difirieron (Tabla V).



**Figura 22.** Se indican quistes parasitarios registrados en hígados de turcos (*P. brasiliensis*) (A-B) expuestos y (C) control; y en hígados de escrófalos (*S. oculatus*) (D-E) expuestos y (F) control.

**Tabla V.** Valores de prevalencia (P), abundancia media (AM) y desvío estándar (DE) para los parásitos metazoos encontrados en el escrófalo (*Sebastes oculatus*) y en el turco (*Pinguipes brasilianus*) procedentes de sitios expuestos a contaminación (EXP) y de referencia (REF).

	Escrófalos		Turcos	
	EXP (n = 10)	REF (n = 24)	EXP (n = 7)	REF (n = 12)
<b>P (%)</b>	20	25	57,14	25*
<b>AM ± DE</b>	0,20 ± 0,42	0,79 ± 2,13	1,28±1,50	1,83±3,92

**Nota.** n: tamaño de la muestra. (\*) indican efecto significativo del sitio en la prevalencia a partir de pruebas de Chi-Cuadrado (Escrófalos:  $X^2 = 0,556$ ,  $p = 0,46$ ; Turcos:  $X^2 = 12,49$ ,  $p < 0,05$ ). No se encontró efecto significativo del sitio en la abundancia a partir de Mann-Whitney U-test (Escrófalos:  $U = 114$ ,  $p = 0,84$ ; Turcos:  $U = 34$ ,  $p = 0,54$ )

#### 4.5. Discusión

En este capítulo se evaluaron los cambios histopatológicos en hígados de escrófalos y turcos expuestos a contaminación antrópica. Los individuos expuestos presentaron mayores alteraciones en su histología hepática, respecto de los individuos que habitan la zona control. Estos resultados están alineados con la hipótesis de esta Tesis de que los contaminantes presentes en el medio acuático pueden inducir numerosas lesiones y daños en órganos diana de los individuos expuestos. Las principales lesiones histológicas hepáticas observadas en escrófalos y turcos provenientes de sitios impactados estuvieron incluidas dentro de los patrones de reacción circulatorio, progresivo, regresivo e inflamatorio. A continuación se discuten en detalle los resultados más relevantes.

Las lesiones de origen circulatorio observadas fueron congestión vascular y dilatación de sinusoides. Estas lesiones se originan principalmente como consecuencia de una respuesta inflamatoria e irritativa hepática que puede ser desencadenada por irritantes como los contaminantes (Santos et al., 2022). Durante esta inflamación ocurre un aumento del flujo de sangre y dilatación de los vasos sanguíneos (incluidos los sinusoides) con estasis de sangre en su interior. También puede presentarse aumento de la permeabilidad vascular que conduce a la acumulación de sangre en el hígado. Si bien estas alteraciones tienen una importancia patológica baja (Bernet et al., 1999), su persistencia puede predisponer al desarrollo de patologías graves. Según Kostić et al. (2017), la congestión severa en los sinusoides y pequeños vasos sanguíneos dificulta considerablemente el flujo sanguíneo desde la vena porta hepática y la arteria hepática hacia la vena central generando estasis sanguínea. Esto podría ser responsable de la degeneración celular y necrosis en los hígados (Osman, 2012; Mohamed et al., 2009), ambas patologías correspondientes al patrón regresivo que han sido registradas en individuos expuestos de este trabajo. Además, para alcanzar la vena central, la sangre necesita ser bombeada con mayor fuerza, y esto podría explicar la presencia de fibrosis en las áreas periportales y portales (Rašković et al., 2015), que también se registraron en este trabajo dentro de los patrones progresivo y regresivo. Los cambios histopatológicos circulatorios observados en escrófalos y turcos expuestos, son considerados una respuesta crónica a lesiones químicas (Kaptaner et al., 2014). De hecho numerosos estudios han descrito la congestión vascular y la dilatación de sinusoides, incluso entre las principales alteraciones encontradas, en distintas especies de peces expuestos a diversos contaminantes antrópicos (Santos et al., 2022; Ossana et al., 2019; Poleksic et al., 2010).

Dentro de los cambios progresivos o proliferativos, las principales lesiones registradas fueron vasculitis e hiperplasia del conducto biliar. Estas lesiones se caracterizan por un aumento en el

tamaño y/o actividad de los tejidos, a causa de un aumento en el tamaño o en el número de sus células (Bernet et al., 1999). En este caso, el tejido que predominó o se multiplicó es el tejido conjuntivo, probablemente como consecuencia de la inflamación crónica desencadenada en respuesta a irritantes como contaminantes (Kaptaner et al., 2014). Si bien estos mecanismos tienen una función defensiva, provocan un engrosamiento en la pared y disminución de la luz de los vasos y conductos afectados que culmina en una disminución del flujo sanguíneo y estancamiento de bilis respectivamente, en detrimento del efecto protector esperado. En contextos de aguas contaminadas, estas alteraciones proliferativas han sido reportadas para numerosas especies de peces (Savassi et al., 2020; Kaptaner et al., 2014; Agamy, 2012; Camargo & Martinez, 2007).

El patrón de reacción regresivo presentó la mayor diversidad de lesiones. Entre ellas se observaron principalmente necrosis, degeneración eosinofílica y edema. Las necrosis, alteraciones de máxima importancia patológica (Bernet et al., 1999), estuvieron entre las lesiones más prevalentes registradas en este trabajo, coincidiendo con lo reportado por Santos et al. (2022) y Weber et al. (2020) para ciprínidos y dos especies nativas de Brazil (*Hoplias intermedius* y *Hypostomus affinis*) respectivamente, expuestas a metales. Además, la incidencia de necrosis hepática ha sido registrada en numerosos trabajos sobre exposiciones a múltiples contaminantes o mezclas de los mismos (Hasan et al., 2022; Agamy, 2012; Troncoso et al., 2012; revisado por Au, 2004), sugiriendo que la presencia de esta lesión en hígado es un indicador de daño tóxico por contaminantes. En algunos casos el origen de las necrosis se ha relacionado con la inhibición enzimática, daños en la integridad de la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y las alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos que sufre el tejido hepático en presencia de agente tóxicos (Cazenave et al., 2009; Mela et al., 2007). Otro origen posible de esta lesión se ha vinculado con la disminución del flujo sanguíneo o estasis por vasculitis o congestión (Osman, 2012; Mohamed et al., 2009), de hecho, en los turcos se observaron necrosis en conductos biliares sobre todo en los casos en que se presentó hiperplasia del conducto. Finalmente, también se ha propuesto que las necrosis podrían originarse a partir de diversas causas que resultan en muerte celular programada o alteración de la homeostasis celular, como el estrés oxidativo (AnvariFar et al., 2018; Li et al., 2000; Avci et al., 2005). Se ha observado que contaminantes como hidrocarburos, metales pesados y pesticidas están asociados con un aumento en las concentraciones de radicales libres dentro del citosol celular, desencadenando daño oxidativo en el tejido (Ibuki & Goto, 2002; Azzalis et al., 1995; Stohs y Bagghi, 1995). En el área alrededor de los muelles de la ciudad de Puerto Madryn, considerada como sitio expuesto a

contaminantes en este trabajo de Tesis, los hidrocarburos y metales pesados han sido los principales contaminantes registrados, lo que podría sugerir a este tipo de químicos como los principales inductores de las necrosis encontradas tanto en turcos como en escrófalos. Sin embargo, para poder determinar el origen de estas necrosis serían precisos estudios experimentales que involucren medidas dirigidas a estudiar los mecanismos de acción de los tóxicos de interés.

Otro hallazgo regresivo fue la degeneración hepatocelular eosinofílica. Esta alteración ha sido vinculada a la exposición a xenobióticos (Abdel-Moneim et al., 2012; Costa et al., 2009) y aunque su origen biológico no está claro, es posible que los cuerpos eosinofílicos retengan material peptídico absorbido del citoplasma de células en degeneración (Camargo y Martínez, 2007; Van Dyk et al., 2007). Se cree que en los hepatocitos afectados su actividad metabólica está aumentada y esto podría relacionarse con el inicio de lesiones neoplásicas, es decir, estadios pre neoplásicos (Abdel-Moneim et al., 2012; Costa et al., 2009; Koehler et al., 2004). Otra lesión incluida entre las principales del tipo regresivo y descripta previamente en relación a la contaminación ambiental (Santos et al., 2022; Kumar et al., 2018; Bernet et al., 1999) fue el edema, que para turcos y escrófalos en la mayoría de las ocasiones estuvo acompañado de infiltrados de células y proteínas. Esta alteración es el resultado de un proceso inflamatorio que se inicia a través de la dilatación y congestión de vasos sanguíneos, y luego continúa con la extravasación de componentes sanguíneos al tejido circundante y/o ruptura endotelial. Finalmente, otra alteración de tipo regresivo que en los escrófalos se encontró en una alta prevalencia y extensión, tanto para individuos expuestos a contaminación como individuos referencia fue la vacuolización. Esta alteración puede tener origen fisiológico o patológico, si bien ha sido asociada a exposición a contaminantes (Ferguson, 1989; Bernet et al., 1999), se sabe que los hepatocitos de los peces suelen estar vacuolizados fisiológicamente por su alto contenido de glucógeno y/o lípidos (Gingerich, 1982; Ferguson, 1989). Esta vacuolización fisiológica, que tiende a distribuirse uniformemente en el parénquima hepático, puede variar estacionalmente dependiendo de la maduración sexual y la etapa del ciclo reproductivo de los peces (revisado por Wolf & Wolfe, 2005; Timashova, 1981). Esto se debe a la alta demanda metabólica que requiere la fase reproductiva y como consecuencia de la transferencia de lípidos que se produce desde el hígado hacia las gónadas para el desarrollo de las mismas (Encina & Granado-Lorencio, 1997; Timashova, 1981). En este sentido, teniendo en cuenta que los escrófalos muestreados en este estudio se encontraban en período no reproductivo (estadio gonadal de recrudescimiento; ver Sueiro et al., 2022) y que la vacuolización hepática observada en los mismos se distribuyó homogéneamente y en ambos tipos de sitios, es

posible considerar que el origen de la misma esté relacionado a un factor fisiológico reproductivo. En línea con nuestros resultados, otros autores han relacionado la presencia de vacuolización con el estadio reproductivo de los peces, independientemente de la exposición a contaminantes (Sun et al., 2020; Dutta et al., 2016;). La vacuolización hepática fisiológica también ha sido relacionada con la abundancia de alimento (Kandemir & Polat, 2007) y con la temperatura (Camargo & Martínez, 2007). Respecto de los turcos muestreados en sitios expuestos, se observó escasa vacuolización celular (con hipertrofia asociada), distribuida en forma de focos de diversos tamaños en el parénquima. Teniendo en cuenta que los turcos al momento del muestreo se encontraban en período reproductivo (estadio gonadal en desarrollo o maduro, ver Sueiro et al., 2022; Villanueva-Gomila et al., 2015), por lo que no se esperaría encontrar vacuolización debido a la migración de las reservas hepáticas hacia las gónadas (Sun et al., 2020; Dutta et al., 2016) y las características histológicas observadas, la vacuolización en esta especie podría considerarse patológica como la reportada por otros autores en contextos de contaminación (Weber et al., 2020; Cengiz et al., 2011; Camargo & Martinez, 2007)

Con respecto a las lesiones de tipo inflamatorio predominaron los infiltrados celulares que se observaron cómo infiltraciones de leucocitos. Los leucocitos o glóbulos blancos forman parte de la defensa celular inespecífica y por lo tanto, la presencia de los mismos podría indicar una reacción inflamatoria, reflejando una respuesta inmunológica frente a contaminantes ambientales (Kostic et al., 2019). En reiteradas ocasiones la infiltración leucocitaria se observó asociada con centros de melanomacrófagos, edema y necrosis como también ha sido reportado por otros autores (Hasan et al., 2022; Santos et al., 2022; Kaptaner et al., 2014; Agamy, 2012; Cengiz et al., 2011). Considerados en la línea de defensa, también se registraron melanomacrófagos y centros de los mismos, principalmente asociados a vasos sanguíneos, en zonas de necrosis o fibrosis y junto a infiltrados celulares, hallazgos similares fueron reportados previamente (Agamy, 2012; Da Cuña et al., 2011). En este trabajo, se encontró un mayor número de melanomacrófagos en los turcos provenientes del sitio control respecto de los individuos expuestos. Si bien existen registros de aumento de melanomacrófagos en relación a contaminantes (Agamy, 2012; Da Cuña et al., 2011), también se ha registrado su disminución en contextos de contaminación, sugiriendo que su alteración podría ser el resultado de distintos factores, incluyendo estrés oxidativo, daño hepático y/o alteración del sistema inmunológico (Revisado por Stosik et al., 2019; revisado por Angius & Roberts, 2003).

En general y considerando todas las lesiones registradas, tanto para escrófalos como para turcos, el daño total de los hígados en individuos expuestos a contaminación fue mayor que para individuos referencia. Dicho daño histológico fue cuantificado a través de los mismos índices utilizados en branquias que contemplan tanto la prevalencia, como la extensión o porcentaje de afectación y la importancia patológica de cada lesión (Bernet et al., 1999). En particular, los índices de reacción progresivos, que incluyen las lesiones con proliferación de tejidos, regresivos, que incluyen las lesiones degenerativas, y el índice hígado, que indica la afección total del órgano, mostraron valores más altos en los individuos de sitios expuestos en ambas especies. Esto coincide con lo reportado para otras especies y sistemas, en presencia de una gran variedad de contaminantes, tanto en condiciones naturales (Sobral dos Santos et al., 2023; Santos et al., 2022; Abdel-Khalek et al., 2018; Ballesteros et al., 2017; Kaptaner et al., 2014; Liebel et al., 2013; Troncoso et al., 2012), como controladas (Jackson et al., 2019; Agamy, 2012; Costa et al., 2009; Nero et al., 2006). Por ejemplo, Abdel-Khalek (2015) encontró mayores índices en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) que habitan zonas contaminadas con metales. Del mismo modo, se registraron mayores índices histopatológicos en cinco especies de peces (de diferentes niveles tróficos) provenientes de estuarios afectados por la contaminación por mercurio y la industria azucarera (Sobral dos Santos et al., 2023). En situaciones controladas, Agamy (2012) observó en peces conejo (*Siganus canaliculatus*) expuestos a hidrocarburos, índices de reacción y totales más altos respecto de los controles. En conjunto, estos hallazgos podrían sugerir que estos índices poseen una alta sensibilidad como marcadores de impacto antrópico. Además, para escrófalos expuestos se registraron mayores valores del índice circulatorio, que incluye lesiones originadas por una condición patológica del flujo sanguíneo (Bernet et al., 1999). Mientras que en los turcos expuestos se registraron mayores valores del índice inflamatorio. Esto podría sugerir que turcos y escrófalos presentan una respuesta histopatológica especie-específica frente a un mismo disturbio.

Al igual que en las branquias, los cambios histopatológicos hepáticos también se consideran biomarcadores inespecíficos, ya que diversos tóxicos pueden producir las mismas alteraciones (revisado por Au 2004). Así mismo, cabe recordar que el hígado es el órgano más importante en el metabolismo de fármacos y en la desintoxicación de diversos contaminantes ambientales por lo que se encuentra en estrecha relación con los mismos. Concentraciones elevadas de estos compuestos pueden sobrepasar la desintoxicación hepática y provocar daños funcionales y/o estructurales sobre el hígado (Hinton et al., 2001). Las principales alteraciones hepáticas registradas en este trabajo

sugieren que los hígados de animales provenientes de sitios expuestos, estarían cursando una inflamación crónica generalizada. Esto puede evidenciarse por la presencia de gran cantidad de componentes inflamatorios como congestión, hiperemia, dilatación de sinusoides, edema, vasculitis e hiperplasia así como la presencia de infiltrados leucocitarios y de melanomacrófagos, ambos tipos celulares involucrados en la defensa inmunológica inespecífica y la respuesta inflamatoria. Finalmente, los procesos de degeneración hepatocelular y necrosis registrados, coinciden con estadios avanzados e irreversibles de inflamación. En este sentido, la persistencia y agravamiento de la inflamación, puede conducir a necrosis del tejido. Dichas necrosis están fuertemente asociada con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres, lo cual causa inhibición enzimática, daño en la membrana celular e inhibición de la síntesis proteica, resultando en más muerte celular (Santos et al., 2022). De esta manera, se ha sugerido que cambios histopatológicos en hígado frecuentemente observados en estudios de campo (Kostic et al., 2017; Hinton et al., 2001; Guill et al., 1990), son el resultado de un mecanismo inmunológico defensivo que pone en marcha una respuesta inflamatoria frente a contaminantes ambientales (Kaptaner et al., 2014), con potenciales efectos deletéreos sobre las funciones hepáticas.

Además de las lesiones hepáticas, durante la evaluación microscópica, se cuantificaron parásitos metazoos. Los mismos fueron encontrados en el parénquima hepático, libres o enquistados. Excepto para los turcos expuestos que mostraron una mayor prevalencia de los mismos respecto de los turcos referencia, el resto de las variables (abundancia para ambas especies y prevalencia para escrófalos) no mostraron diferir entre los individuos expuestos y de referencia. Los contaminantes pueden alterar las relaciones huésped-parásito, ya sea reduciendo las capacidades inmunológicas de los huéspedes, haciéndolos más susceptibles a infecciones (Sures 2008; Khan 2012) y/o impactando en las etapas de vida libre de los parásitos o poblaciones de huéspedes intermediarios (Blonar et al., 2009). La mayor prevalencia de parásitos metazoos en turcos, podría sugerir que los individuos expuestos, con sus parámetros histológicos alterados, serían más susceptible a infecciones parasitarias (Sures 2008; Khan 2012).

En suma, en este Capítulo se evidencia que turcos y escrófalos presentan daños en el tejido hepático asociados con la exposición a contaminantes. La mayor parte de las lesiones pueden ser clasificadas de moderadas a severas según su importancia patológica (Bernet et al., 1999) y estos daños pueden afectar la estructura y función hepática pudiendo tener consecuencias negativas sobre la fisiología de los organismos, aunque las áreas de afectación del órgano son bajas. Sin embargo, estos resultados

en conjunto con los obtenidos para branquias y los reportados en estudios previos sobre las mismas especies respecto de su estado inmunológico, hematológicos y reproductivo (Sueiro et al., 2022; 2020; 2017; Sueiro & Palacios, 2016), indican que los peces expuestos a contaminación presentan alteraciones a nivel celular y tisular, pudiendo tener consecuencia negativas en el funcionamiento de sus sistemas impactando en su estado general de salud.

**CAPÍTULO III:**  
**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE BAZOS DE**  
**PECES MARINOS EXPUESTOS A**  
**CONTAMINACIÓN**

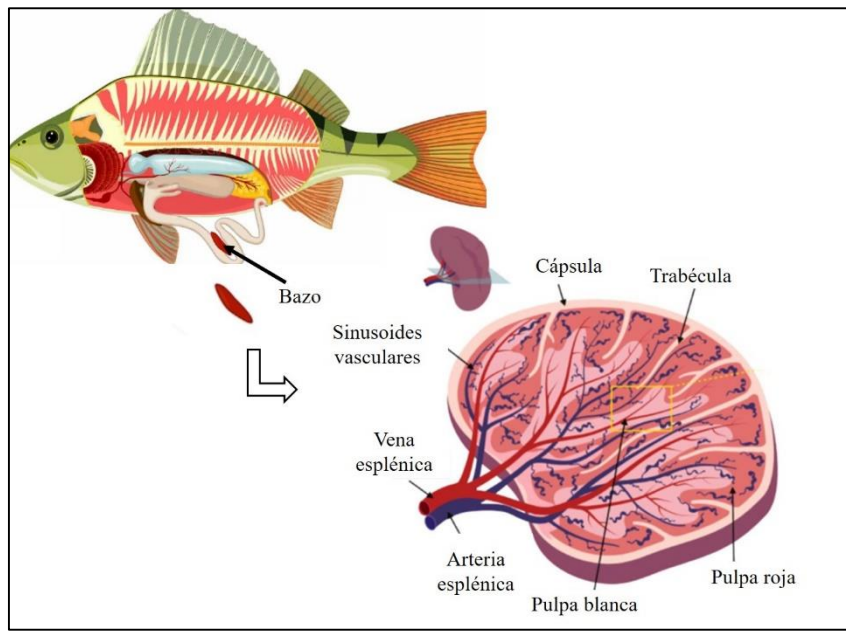
## 5.1. Resumen

El bazo en los peces es uno de los principales órganos linfoides encargado de filtrar la sangre y eliminar agentes extraños y células sanguíneas envejecidas. En su constitución histológica posee células inmunológicas características denominadas melanomacrófagos (MM), que se agrupan en focos denominados centros de melanomacrófagos (CMM) y cumplen un rol importante en las reacciones de defensas inmunológicas. En contextos de contaminación el bazo puede sufrir alteraciones en el número y tamaño de CMM, por lo que su cuantificación es utilizada como biomarcador de la calidad del agua y el estado de salud de los peces. En este capítulo se evaluó el número total de CMM presentes en bazos de individuos de esgrófalo *Sebastes oculatus* y turco *Pinguipes brasilians*, provenientes de sitios expuestos a contaminación y de sitios de referencia. Los individuos expuestos de ambas especies mostraron alteraciones en el recuento de CMM respecto de los individuos controles. Estos resultados evidencian que tanto los esgrófalos como los turcos presentan alteraciones en células inmunitarias, con posibles consecuencias fisiológicas que podrían reflejar un estado de salud alterado. El uso de la histopatología resultó adecuada para diagnosticar estos efectos, destacando la importancia de su aplicación en el monitoreo ambiental de ecosistemas marinos afectados.

## 5.2. Introducción

### 5.2.1. Anatomía y función del bazo

El bazo es un órgano linfoide primario de color rojo oscuro, ubicado en la cavidad peritoneal adyacente a la pared intestinal, aunque en algunos teleósteos también pueden estar presentes bazos accesorios más pequeños. Por lo general, los bazos de los peces están formados por los mismos elementos básicos que en los vertebrados superiores: vasos sanguíneos, pulpa roja, pulpa blanca y elipsoides (Genten et al., 2009; Ferguson, 2006) (Fig. 1). Pero difieren del de los mamíferos en que la estructura del tejido conectivo no es prominente y principalmente en que las áreas de la pulpa roja y blanca son difusas y poco discretas, es decir, no existe una zona marginal que establezca límites nítidos entre los folículos linfoides y la pulpa roja (Zapata, 2024; Genten et al., 2009). Cuando el área de la pulpa roja está llena de glóbulos rojos, los nódulos de la pulpa blanca, principalmente tejido linfático, se pueden observar más fácilmente (Morrison, 2007). El bazo participa en todas las inflamaciones sistémicas y procesos inmunológicos, trastornos hematopoyéticos generalizados y alteraciones metabólicas. Los teleósteos carecen de ganglios linfáticos por lo que el bazo es uno de los principales órganos linfoides filtrantes del sistema vascular (junto con el riñón y el timo), encargado de filtrar la sangre y eliminar agentes extraños y células sanguíneas envejecidas. Este órgano linfoide es inmunológicamente reactivo frente a antígenos o patógenos circulantes en la sangre y puede participar en la producción de anticuerpos. Además, el bazo funciona como órgano hematopoyético accesorio o principal, según la especie, y es un sitio para el almacenamiento de eritrocitos (Zapata, 2024; Ferguson, 2006). La importancia del bazo en estas diferentes funciones varía considerablemente según la edad y especie y se refleja, en parte, en las proporciones relativas de pulpa roja y blanca en el parénquima (Genten et al., 2009; Ferguson, 2006). Según lo revisado por Zapata (2024), el momento de aparición y el crecimiento del tejido linfoide en el bazo varían considerablemente, al igual que su grado de desarrollo. Además dicho autor remarca que los estudios al respecto son principalmente morfológicos y demuestran que los linfocitos aparecen tardíamente y que, durante las primeras etapas del desarrollo, el órgano es predominantemente eritropoyético, con poca o nula relevancia inmunológica.

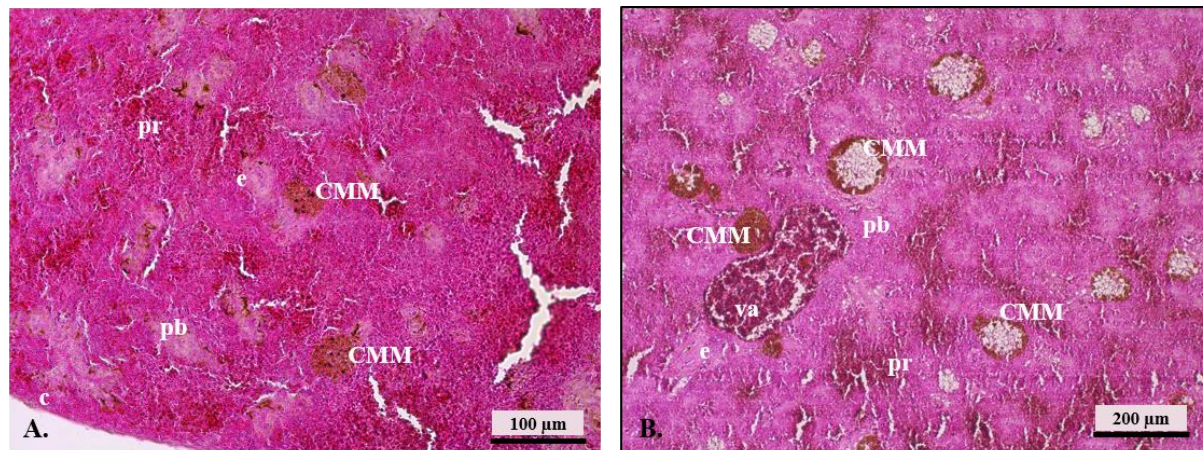


**Figura 1.** Ubicación y estructura macroscópica aproximada del bazo. Imagen modificada, obtenida de He et al., 2023 y <https://www.dreamstime.com>.

### 5.2.2. Histología del bazo

Histológicamente, el bazo está cubierto por una cápsula fibrosa delgada, con poca capacidad contráctil. En algunos teleósteos, puede haber tejido pancreático en la región subcapsular, aunque no es el caso de las especies de estudio en este trabajo. Desde la cápsula se extienden finas trabéculas hacia el parénquima y separan la pulpa roja de la pulpa blanca. La pulpa roja, es un sistema extenso e interconectado de cordones esplénicos y sinusoides, compuesto principalmente por células eritroides y trombocitos, y suele representar la mayor parte del parénquima esplénico. Los cordones esplénicos son una red de células reticulares similares a los fibroblastos con focos de diversas células sanguíneas. La pulpa blanca, compuesta principalmente por células linfoides (agrupaciones de linfocitos, macrófagos y células dendríticas capaces de generar respuestas inmunes), suele rodear los vasos arteriales, los centros de melanomacrófagos y los elipsoides, o formar pequeños grupos en el parénquima esplénico (Zapata, 2024; Ferguson, 2006). Los elipsoides son vainas periarteriales compuestas por macrófagos y sostenidas por fibras de reticulina (Genten et al., 2009). Estas vainas tienen la capacidad de atrapar antígenos particulados y solubles que luego migran hacia los CMM (Zapata, 2024; Ferguson, 2006) (Fig. 2). No se sabe con exactitud la diversidad de células presentes en el tejido esplénico de peces aunque se han realizado estudios genéticos a distintas especies que revelaron la presencia de gran cantidad de tipos celulares como neutrófilos, células NK (natural

killer), macrófagos/células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, células madre hematopoyéticas/progenitoras, mastocitos, restos de células endoteliales, eritrocitos y sus células progenitoras, etc. (Jiang et al., 2022; Takizawa et al., 2016; Moore et al., 2005).

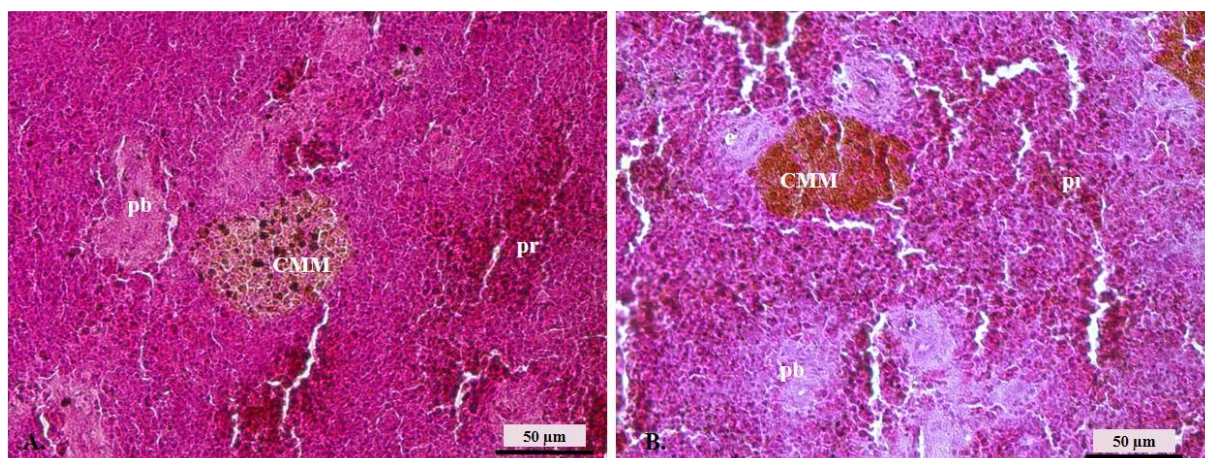


**Figura 2.** Sección histológica de bazo de individuos control de (A) turco (*P. brasiliensis*) y (B) escrófalo (*S. oculatus*). Centros de melanomacrófagos (CMM), pulpa roja (pr), pulpa blanca (pb), elipsoide (e), vaso arteriolar (va), cápsula (c).

### 5.2.3. Centros de melanomacrófagos del bazo

Los melanomacrófagos (MM) son un tipo de célula inmunitaria característica de los teleósteos, presentes con mayor prevalencia en el bazo, aunque también se encuentran en el riñón e hígado, y en menor medida en otros órganos incluidos las gónadas, la glándula tiroides e incluso el timo (Ferguson, 2006). Como consecuencia de su actividad fagocítica degradativa, los MM contienen una colección heterogénea de pigmentos degradados, siendo los más frecuentes la hemosiderina, la lipofuscina y la melanina. Estas células suelen formar focos discretos, rodeados total o parcialmente por cápsulas reticulares conocidos como centros de melanomacrófagos (CMM), que frecuentemente se encuentran asociadas con vasos sanguíneos, elipsoides y células linfoides. El número, tamaño y contenido de pigmentos de los CMM dependen de la especie de pez, el órgano, la edad, el sexo, el estado nutricional y el estado de salud de cada individuo (revisado por Zapata, 2024 y Agius & Roberts, 2003b). Las funciones atribuidas a los MM y CMM son diversas, muchos estudios sugieren que la función general de estos centros es focalizar la destrucción, desintoxicación o reciclaje de materiales endógenos y exógenos. Por lo tanto, actúan como estructuras de eliminación o “depuración” que reflejan la actividad metabólica de los tejidos de los peces; y/o como depósitos metabólicos de productos finales de la degradación de células senescentes o dañadas, incluyendo el

almacenamiento de fosfolípidos derivados de células y hierro tras la eritrofagocitosis (revisado por Agius & Roberts, 2003). Además los CMM cumplen un rol importante en las reacciones de defensa, relacionadas tanto con los mecanismos inmunes innatos como adaptativos. De hecho, existen evidencias que indican que los CMM son estructural y funcionalmente similares a los centros germinales de los mamíferos y se cree que actúan como centros germinales primitivos, precursores de aquellos que eventualmente aparecen en los vertebrados endotérmicos (revisado por Stosik et al., 2019; revisado por Agius & Roberts, 2003). Se sabe que los peces sometidos a estrés crónico, incluidos aquellos enfermos, que viven en ambientes contaminados o que se encuentran en estado catabólico (por ejemplo, ayuno prolongado), tienden a presentar CMM más grandes y numerosos. El tamaño y número de los CMM también aumentan con la edad del pez, y el pigmento de los CMM tiende a oscurecerse (melanina) en peces envejecidos o enfermos (Genten et al., 2009; Ferguson, 2006) (Fig.3).



**Figura 3.** Sección histológica de bazo de individuos control de (A) turco (*P. brasiliensis*) y (B) escurfalo (*S. oculatus*). Centros de melanomacrófagos (CMM), pulpa roja (pr), pulpa blanca (pb), elipsoide (e).

#### 5.2.4. Centros de melanomacrófagos como indicadores de contaminación

El bazo está sujeto a sufrir cambios histológicos en contextos de contaminación ambiental (Grinwis et al., 2000; revisado por Agius & Roberts, 2003), que pueden presentarse como alteraciones en el estado y recuento de glóbulos blancos (leucocitos), en factores de defensa no específicos, en el peso y morfología de los órganos productores de leucocitos, incluyendo el bazo mismo, así como alteraciones en el número y tamaño de CMM (revisiones de Weeks et al., 1992; Wester et al., 1994). En particular, los CMM se utilizan como biomarcadores de la calidad del agua y el estado de salud

de los peces (Zapata, 2024; revisado por Agius y Roberts, 2003, Suresh, 2009), y pueden presentar alteraciones durante la contaminación ambiental (Fournie et al., 2001), los procesos de desintoxicación (Zapata, 2024; Herraéz y Zapata, 1991) y las respuestas inmunológicas (Wolke, 1992, Agius y Roberts, 2003). De hecho, numerosos trabajos han documentado cambios en el número y/o tamaño de los CMM en relación a la presencia de contaminantes en el ambiente acuático. Por ejemplo Ali y colaboradores (2014), encontraron mayor número de CMM en killifish y truchas de mar, *Salmo trutta*, expuestas a hidrocarburos, respecto de las controles. Del mismo modo, Altinok & Capkin (2007) también registraron aumento de CMM en bazos de truchas arcoíris *Oncorhynchus mykiss* expuestas experimentalmente a pesticidas. Por otro lado, Shaalan (2024), registró disminución de CMM en tilapias *Oreochromis niloticus* procedentes de un río contaminado con metales pesados. Además, dado que su determinación es relativamente sencilla y fácilmente comparable, su análisis histológico constituye una herramienta bioindicadora valiosa ya que permite no solo inferir el estado de salud de los organismos expuestos, sino también caracterizar la calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos (revisado por Agius & Roberts, 2003).

#### 5.2.5. Síntesis y objetivos de este capítulo

En este contexto, y considerando la importancia de determinar parámetros adecuados como indicadores del estado de salud de los organismos y del estado de contaminación ambiental, en este capítulo se presenta los resultados obtenidos de los análisis histológicos realizados en bazos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasiliensis*) expuestos a contaminación antrópica e individuos procedentes de sitio control. Estos resultados, junto con los obtenidos para branquias e hígados, permitirán discutir si existen diferencias en cuanto al grado de afección entre órganos (ver Conclusiones generales). Así mismo, teniendo en cuenta que todas las mediciones fueron hechas en dos especies, podremos tener una aproximación sobre la posible existencia de respuestas histológicas especie-específicas (ver Discusión y conclusiones generales).

### 5.3. Metodología

Se procesaron histológicamente un total de 59 bazos. Los preparados histológicos se observaron en microscopio óptico LEICA DM500 con cámara de fotos incorporada (ICC50W) con aumentos de 10x, 20x y 40x de magnificación. Los mismos fueron evaluados en una primera instancia para realizar descartes por fallas que pudiesen haber sucedido durante la toma de muestra y/o el procesamiento histológico (conservación; tinción, corte, montaje, etc.) (total descartes=3; quedando un n final de *Pinguipes brasilianus*=20 y *Sebastes oculatus*=36). Luego, se procedió a realizar el recuento de centros de melanomacrófagos.

#### 5.3.1. Análisis histopatológico: Recuento de centros de melanomacrófagos (CMM)

Se realizó el recuento del total de CMM contabilizados para cada individuo en tres campos diferentes elegidos al azar, utilizando un contador mecánico. Luego se procedió a calcular el recuento de CMM total por sitio y especie

#### 5.3.2. Índice bazosomático

El índice bazosomático es utilizado ampliamente como un parámetro inmunológico con un papel potencial en la respuesta inmune (Rohlenova et al. 2011). Se calculó el índice bazosomático para cada individuo de ambas especies como peso del bazo (g)/peso corporal (g) × 100.

#### 5.3.3. Análisis estadísticos

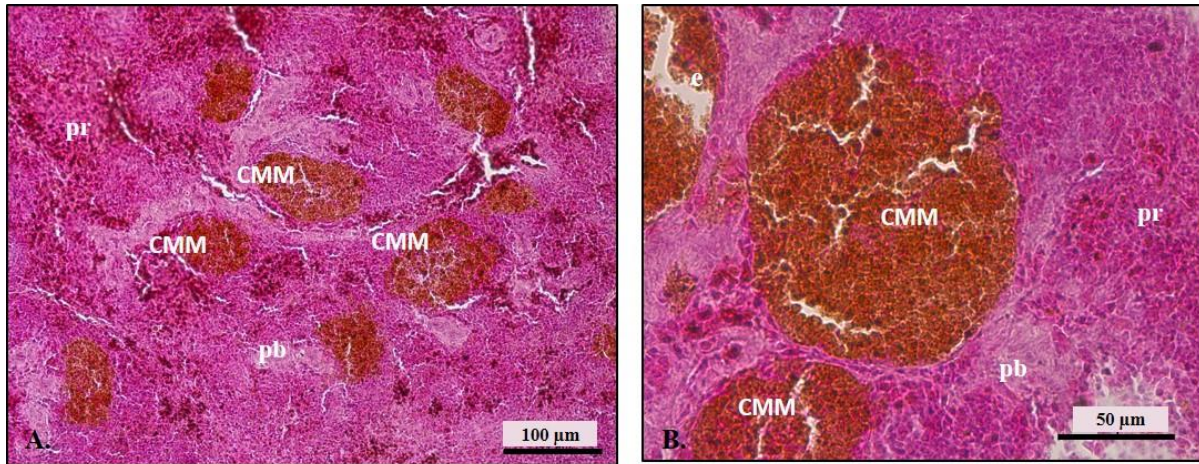
Las posibles diferencias de los recuentos de CMM e índices bazosomáticos entre individuos provenientes de sitios expuestos y control se evaluaron mediante test de ANCOVA de un factor, donde se estableció como factor fijo el sitio (con dos niveles: EXP, expuesto; REF, referencia) y como covariable el largo total (LT). Los análisis se hicieron para cada especie por separado. La normalidad y homocedacea de las variables fueron examinadas mediante los test de Kolmogorov y de Levene respectivamente. Los recuentos de CMM en turcos no cumplieron los supuestos para los test paramétricos por lo que se les aplicó la transformación  $\text{Log}_{10}(\text{variable}+1)$ .

En todos los casos los resultados fueron considerados como significativos a un  $p < 0,05$ . Todos los análisis fueron desarrollados utilizando el programa SPSS 15.0.

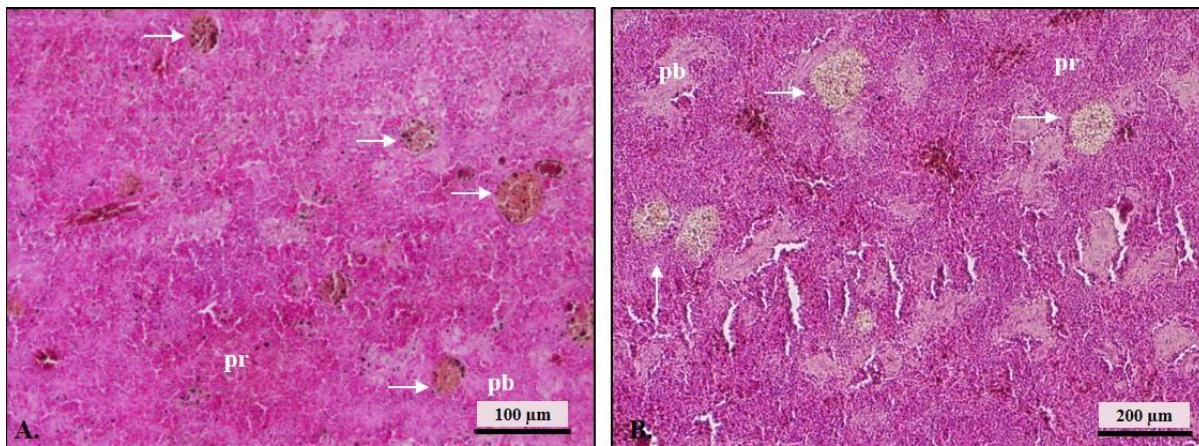
## 5.4. Resultados

### 5.4.1. Evaluación histológica

En ambas especies se observaron CMM de diversos tamaños y tonalidades desde marrones/rojizos intensos hasta prácticamente incoloros (Fig. 4; 5). El recuento total promedio de CMM y los desvíos estándar por especie y sitio se detallan en la Tabla I.



**Figura 4.** Secciones histológicas de bazos de individuos expuestos de escrófalo (*S. oculatus*). Las flechas indican centros de melanomacrófagos (CMM), pulpa roja (pr), pulpa blanca (pb).



**Figura 5.** Secciones histológicas de bazos de individuos expuestos de turco (*P. brasiliensis*). Las flechas indican centros de melanomacrófagos (CMM), pulpa roja (pr), pulpa blanca (pb).

**Tabla I.** Media (X)  $\pm$  desvío estándar (DS), mediana (M), mínimo (min) y máximo (max) de los centros de melanomacrófagos (CMM) totales contabilizados en bazos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasiliensis*) muestreados en sitios expuestos y de referencia.

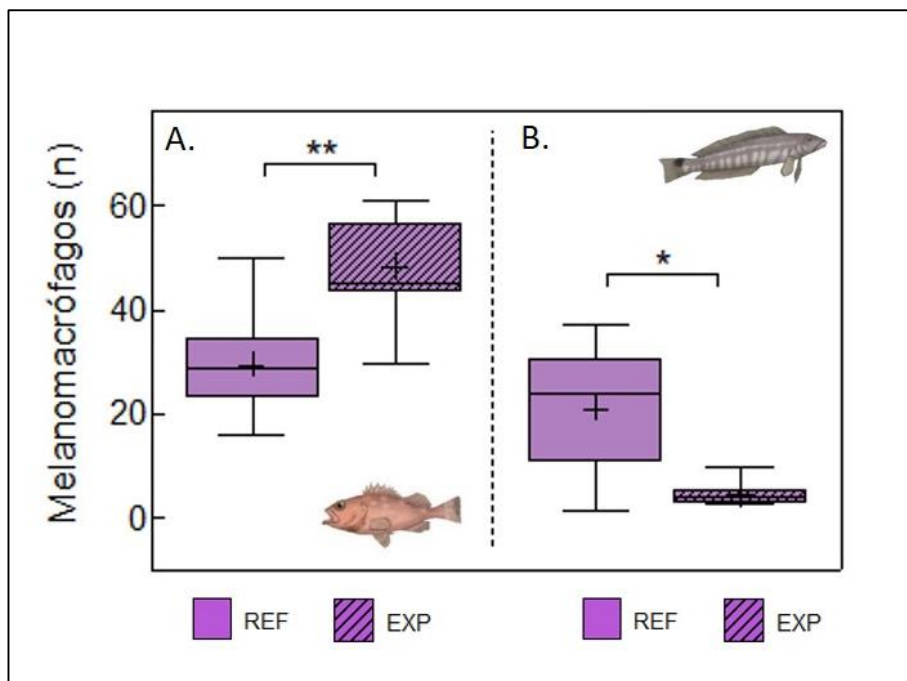
Parámetro	Escrófalo		Turco	
	EXP (9)	REF (27)	EXP (7)	REF (13)
	X $\pm$ DS	X $\pm$ DS	X $\pm$ DS	X $\pm$ DS
	M (min-max)	M (min-max)	M (min-max)	M (min-max)
CMM	144 $\pm$ 29	88 $\pm$ 24	14 $\pm$ 8	63 $\pm$ 34
	135 (89-183)	86 (48-150)	12 (8-30)	72 (5-111)

Los escrófalos provenientes de sitios expuestos a contaminación presentaron mayor recuento de CMM respecto de los provenientes de sitios control (Tabla II; Fig. 6). En el caso de los turcos expuestos, el recuento de CMM tendió a ser menor que en los de referencia ( $p=0,049$ ) (Tabla II, Fig. 6). La influencia de la talla sobre las alteraciones registradas resultó no significativa para los escrófalos pero sí para los turcos (Tabla II).

**Tabla II.** Análisis estadísticos de ANCOVA sobre los recuentos de centros de melanomacrófagos (CMM) esplénicos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasiliensis*) de sitios expuestos a contaminación antrópica y de referencia.

Especie	Parámetro	Test	n	P
Escrófalo	CMM	F = 33,689	36	<b>&lt;0,010</b>
		Covariable LT F = 1,519		0,226
Turco	CMM	F = 4,516	20	<b>0,049</b>
		Covariable LT F = 6,801		<b>0,018</b>

**Nota.** LT= Largo total; n=número de muestras. Se resaltan en negrita los valores que resultaron significativos.



**Figura 6.** Diagrama de cajas de recuento de CMM en bazos obtenidos para (A) escrófalos (*S. oculatus*) y (B) turcos (*P. brasilianus*) mostrando los efectos del sitio (REF: referencia, EXP: expuesto) según los análisis de la Tabla II. Los efectos significativos se indican con asteriscos (\*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ). Los diagramas de caja representan medianas (líneas horizontales dentro de cajas), percentiles 25 y 75 (bordes de cajas) y mínimos y máximos (bigotes).

#### 5.4.2. Índice bazosomático

Los índices bazosomáticos calculados para escrófalos y para turcos (Tabla III) no presentaron diferencias respecto de los sitios donde fueron colectados, y la influencia de la talla sobre estos índices resultó significativa para los escrófalos pero no para los turcos. (Tabla IV).

**Tabla III.** Media ( $X$ )  $\pm$  desvío estándar (DS), mediana (M), mínimo (min) y máximo (max) de los índices bazosomáticos (IBS) totales de bazos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasilianus*) muestreados en sitios expuestos y de referencia.

Parámetro	Escrófalo		Turco	
	EXP (9)	REF (27)	EXP (7)	REF (13)
	$X \pm DS$	$X \pm DS$	$X \pm DS$	$X \pm DS$
	M (min-max)	M (min-max)	M (min-max)	M (min-max)
IBS	0,09 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,03
	0,09 (0,04-0,16)	0,12 (0,06-0,24)	0,07 (0,06-0,09)	0,08 (0,04-0,13)

**Tabla IV.** Análisis estadísticos de ANCOVA sobre índices bazosomáticos (IBS) esplénicos de escrófalos (*S. oculatus*) y turcos (*P. brasilianus*) de sitios expuestos a contaminación antrópica y de referencia.

Especie	Parámetro	Test	n	P	
Escrófalo	IBS	F = 3,894	36	0,057	
		Covariable			0,018
		LT F = 6,162			
Turco	IBS	F = 0,558	20	0,465	
		Covariable			0,874
		LT F = 0,026			

**Nota.** LT= Largo total; n=número de muestras.

## 5.5. Discusión

En el presente Capítulo se determinó la cantidad de centros de melanomacrófagos (CMM) presentes en bazos de escrófalos y turcos expuestos y no expuestos a contaminación. En línea con la hipótesis de esta Tesis, la exposición crónica a contaminantes puede inducir alteraciones en la histología normal de órganos diana, encontramos diferencias en los recuentos de CMM asociados con el sitio de procedencia de los individuos. En el caso de los escrófalos, los individuos expuestos mostraron mayor número de CMM, por el contrario en turcos expuestos se observó una tendencia a un menor número de CMM en relación a los individuos de sitios referencia. A continuación, se discuten con mayor detalle los principales hallazgos de este Capítulo.

El aumento en la cantidad de CMM en bazos de escrófalos expuestos, coincide con lo reportado para un gran número de especies de peces expuestos a diversos contaminantes (ej. truchas de mar (*Salmo trutta*) expuestas a hidrocarburos en Ali et al., (2014); doradas (*Sparus aurata*) expuestas a mezclas de contaminantes en Gaber et al. (2014)). Se ha propuesto que estos aumentos pueden ser el resultado de una combinación de mecanismos fisiopatológicos interrelacionados. Entre ellos, el estrés oxidativo inducido por ciertos contaminantes genera daño celular que podría favorecer la acumulación de pigmentos residuales como lipofuscina y hemosiderina dentro de los CMM, aumentando su número. Esto se ha observado, por ejemplo, para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) expuestas experimentalmente al herbicida atricina (Oliveira et al., 2018). Paralelamente, muchos contaminantes desencadenan respuestas inflamatorias crónicas que estimulan la fagocitosis no específica, función central de los CMM, promoviendo así su proliferación y expansión (Aigus & Roberts, 2003). A ello se suma la acción de ciertos tóxicos, que incrementan la fragilidad eritrocitaria, resultando en la hemólisis y la consecuente liberación de hemoglobina, posteriormente transformada en hemosiderina y almacenada en estos centros (Steinel & Bolnick 2017). Finalmente, la exposición a agentes tóxicos también puede inducir alteraciones histopatológicas directas en el bazo, incluyendo congestión, infiltración leucocitaria y necrosis, procesos que actúan como señales de activación inmunológica local y contribuyen a la intensificación de la respuesta de los CMM como mecanismos de defensa frente al daño tisular (Sayed et al., 2016; Altinok & Capkin, 2007).

Por otra parte, los turcos expuestos mostraron una tendencia hacia un menor número de CMM respecto de los individuos control. Si bien, la mayoría de los estudios reportan un aumento en los CMM como respuesta a la contaminación, se ha observado que su disminución también puede ocurrir bajo ciertas condiciones (Aigus & Roberts, 2003). Por ejemplo, lenguados

(*Pseudopleuronectes americanus*) expuestos a hidrocarburos aromáticos mostraron una reducción en el número de CMM en relación a peces control (Payne & Fancet 1989). Lo mismo se reportó en anguilas (*Anguilla anguilla*) expuestas a un derrame con mezclas de químicos (Spazier et al., 1992). Esta disminución en los centros fagocíticos podría estar relacionada con los efectos inmunodepresores de algunos contaminantes que podrían inhibir la actividad fagocítica y la proliferación de CMM (Zapata, 2024). Así como con el estrés oxidativo y daño esplénico inducidos por xenobióticos (Revisado por Stosik et al., 2019; revisado por Angius & Roberts, 2003). Asimismo, exposiciones severas o prolongadas pueden provocar necrosis o atrofia del tejido esplénico, llevando a la pérdida estructural de estos centros (Steinel & Bolnick 2017; Aigus & Roberts, 2003). En otros casos, la disminución podría deberse a una redistribución funcional de melanomacrófagos hacia órganos como el hígado o riñón anterior (Steinel & Bolnick 2017; Aigus & Roberts, 2003).

La alteración en los recuentos de CMM, observadas en individuos expuestos, junto con las alteraciones en los conteos leucocitarios, la capacidad de aglutinación bacteriana, y en valores de hematocrito, previamente reportados para individuos de la misma especie (Sueiro et al., 2020), sugieren un compromiso en su sistema inmunológico, lo que podría aumentar su susceptibilidad a contraer enfermedades. De hecho, en este trabajo de Tesis se reportaron mayores prevalencias de epitelocistis en branquias de ambas especies (Capítulo I; Novacovsky et al., 2021), así como de ectoparásitos en branquias y parásitos metazoos en hígados de turcos (Capítulo I; Capítulo II respectivamente). Por otro lado, la diferencia entre turcos y escrófalos en relación a la disminución y aumento respectivo de CMM en individuos expuestos, evidencia que ante un mismo disturbio estas especies presentan una respuesta inmunológica especie-específica. Esto coincide con lo reportado cuando se consideraron otros aspectos de la función inmune (Sueiro et al., 2020) y resalta la importancia de incorporar más de una especie en estudios ecotoxicológicos.

En síntesis, en este Capítulo se evidencia que turcos y escrófalos presentan alteración del número de centros de melanomacrófagos esplénicos asociados con la exposición a contaminantes. Dicha alteración de células inmunes podría tener consecuencias negativas sobre la fisiología de los organismos. Estos resultados, junto con los obtenidos para branquias e hígados indican que los peces expuestos a contaminación presentan alteraciones en su histología normal, pudiendo tener consecuencia negativas en el funcionamiento de sus sistemas, impactando en su estado general de salud.

# **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

## 6. Discusión general y conclusiones

### 6.1. Discusión general

En el escenario global de contaminación ambiental, las respuestas tisulares observadas en los individuos pueden ser indicativas de su estado de salud, lo cual a su vez, permite inferir posibles efectos a nivel de población y comunidad. En este sentido, la histopatología se consolida como una herramienta clave para evaluar el impacto de los contaminantes sobre los peces, siendo ampliamente utilizada como un indicador sensible y específico de la salud individual y ecosistémica. En este trabajo de Tesis se reportaron alteraciones histológicas en branquias, hígados y bazos de dos de las especies más conspicuas y abundantes de los ensambles de peces de arrecifes Norpatagónicos: el escrófalo (*S. oculatus*) y el turco (*P. brasilianus*). Dichas alteraciones estuvieron asociadas con la exposición a contaminantes provenientes de múltiples fuentes de origen antrópico -tráfico marítimo, producción de aluminio, efluentes domésticos, industria pesquera- que son vertidos, depositados o acumulados en el entorno marino del área industrial y portuaria del golfo Nuevo. Estos tres órganos son particularmente relevantes debido a su intervención crítica en funciones vitales como el intercambio de gases, la osmorregulación, la biotransformación y desintoxicación de xenobióticos, la excreción de desechos, la hematopoyesis y la defensa inmunológica. En los resultados obtenidos en este estudio la alteración del tejido branquial fue de leve a moderada. Las lesiones branquiales registradas estuvieron asociadas a daños por contacto directo con contaminantes y/o a la activación de mecanismos defensivos propios del tejido. Por su parte, el tejido hepático mostró alteraciones de moderadas a severas, y las lesiones estuvieron principalmente asociadas a procesos inflamatorios. Estas diferencias son esperables dadas las características fisiológicas, funcionales y anatómicas propias de cada órgano. Sin embargo, las diferencias encontradas entre individuos expuestos y de referencia respecto de las prevalencias de las lesiones y de los índices histopatológicos totales de cada órgano fueron más evidentes en el caso de los hígados (ver branquias: Fig.19 y 20 – Capítulo I; hígados: Fig. 19 y 20,- Capítulo II). Esto sugiere una sensibilidad diferencial de los órganos evaluados para responder o afectarse ante la exposición a contaminantes. Observaciones similares se han reportado para otras especies en contextos de contaminación (Abdel-Moneim et al., 2012; Costa et al., 2009; Camargo & Martinez, 2007). De modo similar, para el bazo y el hígado, la diferencia de recuentos de CMM entre individuos expuestos y de referencia estuvo más acentuada en los bazos (ver hígados: Fig. 21, Capítulo II; bazos: Fig.6, Capítulo III). Los CMM esplénicos podrían estar más afectados por su mayor implicancia inmunológica, debido a su rol clave en la

detección de patógenos y toxinas circulantes. Además el bazo como principal órgano filtrador de la sangre está expuesto de forma más directa a los efectos de los contaminantes (Agius & Roberts, 2003). Estos resultados destacan la importancia de considerar las diferencias en la susceptibilidad de los parámetros histológicos entre órganos al momento de la elaboración de estudios de monitoreo. Lo mismo se ha sugerido cuando se utilizan otras variables fisiológicas como aspectos de la función inmune y del estado general de salud (Sueiro et al., 2020). Estas diferencias probablemente constituyan una de las razones por las que aún no se ha establecido un conjunto universal y validado de parámetros fisiológicos para evaluar el potencial toxicológico de los contaminantes químicos en peces.

Si bien escrófalos y turcos expuestos exhibieron alteraciones en los tres órganos estudiados, la respuesta histológica de cada especie a la misma mezcla de contaminantes fue diferente, a pesar de compartir el mismo hábitat y ecología trófica. Estas diferencias especie-específicas se observaron por ejemplo en las prevalencias de algunas lesiones como hipertrofia e hiperplasia epitelial en branquias, o congestión, dilatación de sinusoides y necrosis en hígados (ver branquias: Fig.19 y 20 - Capítulo I; hígados: Fig. 19- Capítulo II). Esto también fue observado en el índice de reacción circulatorio de branquias, índices de reacción circulatorio e inflamatorio de hígados, y recuento de CMM en hígados y bazos (Fig. 1). Las diferencias interespecíficas en las respuestas histológicas frente a los mismos contaminantes han sido documentadas en peces (e.j. en Sobral dos Santos et al., 2023; Barišić et al., 2015; Santos et al., 2014; Nero et al., 2006). Se han propuesto diferentes factores como potenciales responsables a estas diferencias, incluyendo bioacumulación diferencial de contaminantes (Papagiannis et al., 2004; Shekh et al., 2019), resistencia fisiológica y/o tolerancia (Wirgin y Waldman, 2004). Así como también, diferentes comportamientos como por ejemplo los patrones de movimiento y, por ende, el tiempo de exposición (Ali et al., 2014). En el sistema de estudio de esta Tesis, las diferencias observadas entre turcos y escrófalos en sus respuestas histológicas podrían reflejar diferencias interespecíficas en la inversión energética durante procesos fisiológicos claves. Estas dos especies comparten rasgos importantes relacionados con la ecología trófica y el uso del hábitat, pero difieren en su historia filogenética y estrategia de vida, incluyendo su modo de reproducción. Mientras los turcos son una especie ovípara que está en fase reproductiva durante el verano (Villanueva-Gomila et al., 2015), los escrófalos son vivíparos y reproducen en invierno (Marcinkevicius, 2009; Sueiro et al., 2022). Cada estrategia reproductiva influye en el modo de asignación de recursos a otros procesos fisiológicos lo que podría resultar en una sensibilidad

diferencial a los estresores externos, como los contaminantes ambientales. Tales diferencias entre especies podrían, a su vez, tener consecuencias sobre su supervivencia relativa. Estos hallazgos destacan la necesidad de realizar estudios que incorporen comparaciones interespecíficas para evaluar posibles variaciones en su susceptibilidad en un contexto ecotoxicológico. Considerar estas diferencias es importante en la implementación de políticas eficaces de manejo, dado que una única estrategia puede no ser adecuada para todas las especies.

### **6.3. Conclusiones**

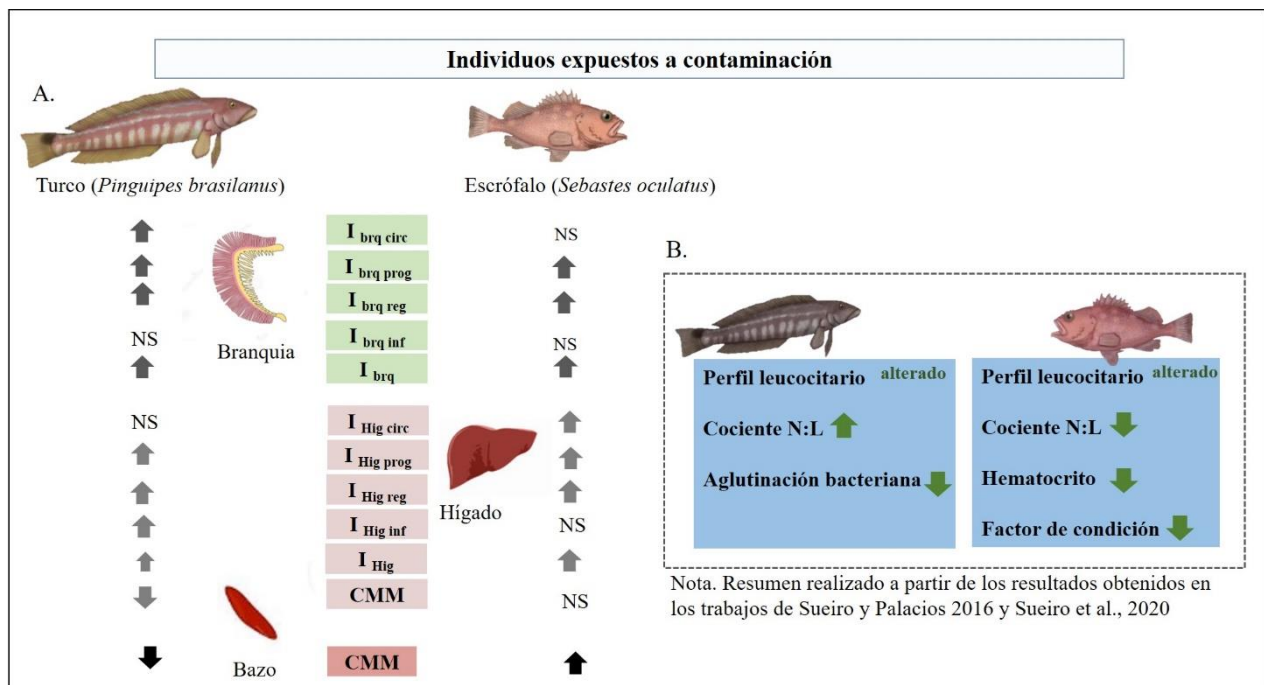
En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral reafirman la relevancia de la histopatología como una herramienta diagnóstica clave para comprender y cuantificar los efectos patológicos de la contaminación ambiental en peces. En un contexto global en el que la presión antrópica constituye una amenaza creciente para la biodiversidad, disponer de métodos sensibles, confiables y sitio-específicos para el monitoreo ambiental resulta esencial para detectar impactos locales y anticipar sus posibles consecuencias ecológicas. El hallazgo de alteraciones histológicas en órganos vitales como branquias, hígado y bazo, en individuos expuestos a ambientes contaminados, se suma a evidencias previas de alteraciones inmunológicas y de condición física en estas mismas poblaciones, conformando un conjunto consistente de indicadores de deterioro fisiológico. En el marco de la ecotoxicología y la biología de la conservación, este tipo de respuestas son consideradas señales tempranas de efectos subletales que, aunque no letales de forma inmediata, pueden tener consecuencias biológicamente significativas sobre funciones clave como la reproducción, la supervivencia y la resistencia a enfermedades. Además, la observación de alteraciones diferenciales entre órganos resalta la importancia de implementar estudios multiórganicos para una evaluación integral del estado de salud de los peces y del ambiente que habitan. Del mismo modo, las diferencias interespecíficas en la respuesta a la exposición a contaminantes subrayan la necesidad de incorporar comparaciones entre especies, dada la variabilidad en su sensibilidad y capacidad de respuesta fisiológica.

De manera complementaria, se destaca la necesidad de expandir los enfoques diagnósticos hacia otras especies y órganos aún no evaluados (como el bazo completo y el riñón), así como de incluir variables que permitan detectar impactos a nivel poblacional. Entre estas, se proponen: estructura de tallas y edades, proporción de sexos, éxito reproductivo, densidad poblacional, índice de condición

y cambios en la distribución o abundancia de las especies, todos ellos potenciales indicadores de presiones ambientales crónicas.

Si bien este estudio no aborda directamente consecuencias poblacionales o ecosistémicas, los resultados permiten afirmar que la situación observada merece atención urgente desde la perspectiva de la gestión ambiental. En este sentido, se recomienda: (1) la incorporación de los indicadores histológicos, inmunológicos y de condición física en programas de monitoreo ambiental continuo, (2) la implementación de medidas de prevención o mitigación en las fuentes locales de contaminación, (3) la realización de estudios experimentales y a largo plazo que permitan establecer vínculos causales entre contaminantes y efectos biológicos, así como evaluar la dinámica poblacional de las especies afectadas.

Este trabajo contribuye así a mejorar el conocimiento sobre los impactos de la contaminación en peces marinos y proporciona herramientas aplicables al diseño de estrategias de conservación más específicas, efectivas y adaptadas a los desafíos locales.



**Figura 1.** Resumen de las alteraciones (A) histológicas de los escrófalos y turcos registradas en este trabajo de Tesis y (B) fisiológicas obtenidas en trabajos previos sobre estas mismas especies, expuestos a contaminación en comparación con los individuos de sitios de referencia. Los efectos y su dirección se indican con flechas. I<sub>brq</sub>: Índice branquia, I<sub>Hig</sub>: Índice hígado, circ: circulatorio, prog: progresivo, reg: regresivo, inf: inflamatorio. CMM: centros de melanomacrófagos. NS= no significativo; N:L= neutrófilos: linfocitos.

# **TABLA ANEXA Y ABREVIATURAS**

**Tabla AI.** Media (X) ± desvío estándar (DS), mediana (M), mínimo (min) y máximo (max) de los parámetros largo total (LT), peso total (PT), porcentaje de área afectada de las lesiones (extensión) e índices histológicos medidos en branquias, hígados y bazos de escrófalos y turcos de sitios expuestos (EXP) y referencia (REF)

		Escrófalo (39)		Turco (23)	
		REF (29) X ± DS M (min-max)	EXP (10) X ± DS M (min-max)	REF (14) X ± DS M (min-max)	EXP (9) X ± DS M (min-max)
GENERAL	LT	25,6 ± 3,6 25,3 (16,0-32,3)	26,3 ± 2,7 26,5 (20,5-29,1)	33,4 ± 4,2 34,8 (25,5-38,2)	29,4 ± 1,9 29,2 (26,5-32,4)
	PT	292,3 ± 131,5 262,5 (50,0-600,0)	300,5 ± 85,4 287,5 (175,0-425,0)	471,4 ± 64,3 537,5 (150,0-650,0)	258,9 ± 58,1 250,0 (175,0-350,0)
		REF (26)	EXP (10)	REF (12)	EXP (9)
BRANQUIAS	CONG	9,0 ± 9,1 6,0 (0,0-31,0)	11,1 ± 10,1 11,25 (0,0-27,0)	11,3 ± 13,9 5,75 (0,0-44,0)	16,3 ± 10,6 16,5 (1,0-34,5)
	TELANG	0,4 ± 1,0 0,0 (0,0-3,0)	4,2 ± 5,1 1,0 (0,0-12,0)	0,7 ± 1,1 0,0 (0,0-3,0)	4,8 ± 4,8 3,0 (0,0-12,0)
	I <sub>Brq Circ</sub>	0,8 ± 0,7 0,5 (0,0-2,0)	1,3 ± 1,1 1,5 (0,0-2,9)	1,1 ± 1,1 0,8 (0,0-3,3)	1,8 ± 0,8 1,6 (0,8-3,5)
	HPCM	11,1 ± 6,9 11,0 (0,0-31,5)	18,2 ± 15,9 16,3 (0,0-40,0)	12,1 ± 7,3 9,3 (3,5-24,0)	14,0 ± 16,5 6,0 (2,0-54,0)
	HTFE	3,6 ± 4,8 1,0 (0,0-15,5)	16,3 ± 11,5 15,8 (0,0-33,5)	0,9 ± ,03 0,0 (0,0-10,5)	6,3 ± 5,9 6,0 (0,0-18,0)
	HPE	3,5 ± 5,5 2,0 (0,0-27,5)	11,6 ± 8,2 11,8 (0,0-23,0)	0,5 ± 1,6 0,0 (0,0-5,5)	6,9 ± 7,5 6,0 (0,0-21,0)
	HPPTA	1,0 ± 1,7 0,0 (0,0-5,0)	6,4 ± 6,7 6,5 (0,0-20,0)	0,8 ± 2,1 0,0 (0,0-6,5)	6,2 ± 7,6 4,5 (0,0-19,0)
	FUSION	1,4±3,2	6,0 ± 4,8	1,2 ± 1,3	6,4 ± 6,4

		0,0 (0,0-16,0)	8,0 (0,0-12,0)	0,8 (0,0-3,5)	5,5 (0,0-17,0)
	METAP	0,7 ± 1,6 0,0 (0,0-5,5)	4,2 ± 4,5 3,8 (0,0-11,5)	0,1 ± 0,3 0,0 (0,0-1,0)	2,2 ± 3,0 1,5 (0,0-9,0)
	HPCCL	-	9,8 ± 14,1 0,0 (0,0-36,0)	-	1,06 ± 3,17 0,0 (0,0-9,5)
	I <sub>Brq Prog</sub>	4,0 ± 2,0 3,7 (0,4-9,4)	10,5 ± 5,2 10,6 (3,3-19,3)	3,6 ± 3,0 3,0 (0,6-11,8)	6,8 ± 4,3 5,4 (1,2-13,3)
	LEV	3,3 ± 4,3 1,0 (0,0-13,5)	16,4 ± 16,7 12,3 (0,0-49,5)	1,7 ± 3,2 0,0 (0,0-10,0)	5,2 ± 4,7 6,5 (0,0-10,5)
	ACORT	0,6 ± 1,7 0,0 (0,0-6,0)	8,6 ± 7,7 11,0 (0,0-18,)	1,3 ± 2,4 0,0 (0,0-6,5)	5,3 ± 5,6 4,0 (0,0-13,5)
	NECRO	0,2 ± 0,5 0,0 (0,0-2,0)	4,1 ± 5,2 0,8 (0,0-12,0)	0,2 ± 0,6 0,0 (0,0-2,)	1,7 ± 3,1 0,0 (0,0-8,0)
	I <sub>Brq Reg</sub>	0,5 ± 0,5 0,3(0,0-1,8)	3,9 ± 2,3 4,5 (0,-6,5)	0,6 ± 0,8 0,2 (0,0-2,5)	4,5 ± 7,2 2,5(0,0-23,0)
	INF	0,7 ± 2,0 0,0 (0,0-7,0)	2,7 ± 5,0 0,0 (0,0-14,5)	0,3 ± 0,9 0,0 (0,0-3,0)	0,9 ± 2,7 0,0 (0,0-8,0)
	EDEMA	0,7 ± 1,7 0,0 (0,0-7,0)	15,2 ± 16,7 9,3 (0,0-36,0)	0,8 ± 1,9 0,0 (0,0-5,5)	3,6 ± 5,4 0,0 (0,0-12,0)
	I <sub>Brq Inf</sub>	0,2 ± 0,3 0,0 (0,0-1,0)	1,6 ± 1,7 1,8 (0,0-4,9)	0,2 ± 0,4 0,0 (0,0-1,2)	0,5 ± 0,8 0,0 (0,0-2,1)
	I <sub>Brq Tot</sub>	5,5 ± 2,4 5,3 (1,8-10,8)	17,3 ± 6,3 18,1 (6,3-27,5)	5,4 ± 3,7 4,2 (1,0-13,0)	13,5 ± 8,7 9,6 (4,7-32,6)
		<b>REF (24)</b>	<b>EXP (10)</b>	<b>REF (12)</b>	<b>EXP (7)</b>
	CONG VASC	24,2 ± 19,5 25,0 (0,0-80,0)	34,0 ± 27,1 35,0 (0,0-75,0)	7,5 ± 13,6 0,0 (0,0-40,0)	22,1 ± 13,5 25,0 (0,0-40,0)
	DILAT	4,6 ± 8,8	25,0 ± 15,8	5,0 ± 6,7	10,0 ± 11,6
	SINUS	0,0 (0,0-30,0)	20,0 (0,0-50,0)	0,0 (0,0-20,0)	10,0 (0,0-30,0)
	I <sub>Hig Circ</sub>	2,3 ± 1,3 2,0 (0,0-5,0)	4,3 ± 2,2 4,0 (1,0-8,0)	1,1 ± 1,2 1,0 (0,0-4,0)	2,6 ± 1,4 2,0 (1,0-4,0)
<b>HÍGADOS</b>					

VASCUL	2,5 ± 6,1 0,0 (0,0-20,0)	18,5 ± 15,3 20,0 (0,0-40,0)	2,9 ± 5,4 0,0 (0,0-15,0)	5,7 ± 7,9 0,0 (0,0-20,0)
HIPERP	1,9 ± 4,4	6,0 ± 6,7	1,7 ± 3,9	14,3 ± 11,3
C. BIL	0,0 (0,0-15,0)	0,0 (0,0-30,0)	0,0 (0,0-10,0)	20,0 (0,0-30,0)
I <sub>Hig Prog</sub>	0,9 ± 1,4 0,0 (0,0-4,0)	4,2 ± 3,2 4,0 (0,0-10,0)	1,0 ± 1,6 0,0 (0,0-4,0)	3,7 ± 2,1 4,0 (2,0-8,0)
VACUOL.	75,0 ± 15,5 77,5 (30,0-95,0)	73,0 ± 14,9 75,0 (40,0-90,0)	1,7 ± 3,9 0,0 (0,0-10,0)	2,9 ± 4,9 0,0 (0,0-10,0)
DEG. GRASA	-	-	0,8 ± 2,9 0,0 (0,0-10,0)	2,9 ± 4,9 0,0 (0,0-10,0)
NECRO.	6,3 ± 6,3 10,0 (0,0-20,0)	17,5 ± 8,6 20,0 (0,0-30,0)	4,2 ± 6,7 0,0 (0,0-20,0)	15,7 ± 9,8 20,0 (0,0-30,0)
NECRO C BIL	-	-	0,8 ± 2,9 0,0 (0,0-10,0)	7,1 ± 7,6 10,0 (0,0-20,0)
DEG. EOSINO.	-	13,5 ± 6,7 12,5 (0,0-20,0)	2,5 ± 4,5 0,0 (0,0-10,0)	15,0 ± 9,6 15,0 (0,0-30,0)
EDEMA	2,1 ± 4,2 0,0 (0,0-10,0)	11,0 ± 7,0 10,0 (0,0-20,0)	1,7 ± 3,9 0,0 (0,0-10,0)	2,9 ± 4,9 0,0 (0,0-10,0)
ALT. NUC.	2,9 ± 4,6 0,0 (0,0-10,0)	10,0 ± 4,1 10,0 (0,0-15,0)	3,3 ± 4,9 0,0 (0,0-10,0)	5,0 ± 6,5 0,0 (0,0-15,0)
I <sub>Hig Reg</sub>	7,4 ± 2,9 8,0 (3,0-12,0)	14,0 ± 3,8 15,0 (4,0-17,0)	2,9 ± 2,8 2,5 (0,0-9,0)	10,0 ± 4,5 10,0 (5,0-18,0)
INFILT.	5,2 ± 7,3 0,0 (0,0-20,0)	10,0 ± 4,1 10,0 (0,0-15,0)	5,0 ± 6,7 0,0 (0,0-20,0)	12,9 ± 8,1 10,0 (0,0-25,0)
I <sub>Hig Inf</sub>	1,2 ± 1,7 0,0 (0,0-4,0)	2,2 ± 1,1 2,0 (0,0-4,0)	1,0 ± 1,4 0,0 (0,0-4,0)	2,6 ± 1,5 2,0 (0,0-4,0)
I <sub>Hig Tot</sub>	11,8 ± 4,5 12,5 (5,0-20,0)	24,7 ± 5,6 26,0 (11,0-30,0)	6,0 ± 4,6 6,0 (0,0-15,0)	18,9 ± 6,0 16,0 (14,0-31,0)
CMM	1,1 ± 6,9 11,0 (0,0-31,5)	69,9 ± 77,8 45,0 (5,0-253,0)	56,9 ± 51,5 31,0 (19,0-157,0)	9,7 ± 4,3 9,0 (3,0-17,0)

		<b>REF (27)</b>	<b>EXP (9)</b>	<b>REF (13)</b>	<b>EXP (7)</b>
BAZOS	CMM	144,0 ± 29,0 135,0 (89,0-183,0)	88,0 ± 24,0 86,0 (48,0-150,0)	14,0 ± 8,0 12,0 (8,0-30,0)	63,0 ± 34,0 72,0 (5,0-111,0)

---

Abreviaturas:

REF: referencia

EXP: expuesto

LT: largo total

PT: peso total

PR: patrón de reacción

I Brq: índice branquia

I Brq Circ: índice branquia circulatorio

I Brq Prog: índice branquia progresivo

I Brq Reg: índice branquia regresivo

I Brq Inf: índice branquia inflamatorio

I Brq Tot: índice branquia total

I Hig: índice hígado

I Hig Circ: índice hígado circulatorio

I Hig Prog: índice hígado progresivo

I Hig Reg: índice hígado regresivo

I Hig Inf: índice hígado inflamatorio

I Hig Tot: índice hígado total

CONG: congestión

TELANG: telangiectasia

HPCM: hIperplasia de células mucosas

HTFE: hipertrofia epitelial

HPE: hiperplasia epitelial

HPPTA: hiperplasia de puntas laminillares

FUSION: fusión

METAP: metaplasia

HPCCL: hiperplasia de células de cloro

LEV: levantamiento

ACORT: acortamiento

NECRO: necrosis  
INF: infiltrado  
CONG VASC: congestión vascular  
DILAT SINUS: dilatación de sinusoides  
VASCUL: vasculitis  
HIPERP C. BIL: hiperplasia del conducto biliar  
VACUOL: vacuolización  
DEG. GRASA: degeneración grasa  
NECRO C BIL: necrosis del conducto biliar  
DEG. EOSINO.: degeneración eosinofílica  
ALT. NUC.: alteraciones nucleares  
CMM: centros melanomacrófagos  
MM: melanomacrófagos  
IBS: índice bazosomático

# **CITAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdel Moneim, A. M., Al Kahtani, M. A., & Elmenshawy, O. M. (2012). Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88(8), 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.001>

Abdel-Khalek, A., El-Gamal, H. A., Saad, A., & Abdel-Wahab, W. M. (2018). The chronic exposure to discharges of Sabal drain induces oxidative stress and histopathological alterations in *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(1), 92–98. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2366-9>

Abdelmonem, A. A., Metwally, M. M., Hussein, H. S., & Elsheikha, H. M. (2010). Gross and microscopic pathological changes associated with parasitic infection in European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758). *Parasitology Research*, 106(2), 463–469. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1688-2>

Adger W, TP Hughes, C Folke, SR Carpenter, et al., (2005) Social-ecological resilience to coastal disasters, *Science* 309, 1036-1039.

Agamy, E. (2012). Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotoxicology and environmental safety*, 75, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.010>

Agamy, E. (2013). Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.027>

Agamy, E. (2013b). Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. *Marine Environmental Research*, 86, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.010>

Agbohessi, P. T., Imorou Toko, I., Ouédraogo, A., Jauniaux, T., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2015). Assessment of the health status of wild fish inhabiting a cotton basin heavily impacted by

pesticides in Benin (West Africa). *Science of the Total Environment*, 506–507, 567–584. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.047>

Agius, C. & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499–509.

Agius, C. & Roberts, R. J. (2003b). Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 563–570. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

Ahmed, M. K., Habibullah Al Mamun, M., Parvin, E., Akter, M. S., & Khan, M. S. (2013). Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 903–909. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2013.01.003>

Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A. S., Galdopórpóra, J. M., Desimone, M. F., de la Torre, F. R., et al. (2018). Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 976–984. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.072>

Ali, A. O., Hohn, C., Allen, P. J., Ford, L., et al. (2014). The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine Pollution Bulletin*, 79, 87–93.

Altinok, I., & Capkin, E. (2007). Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicologic Pathology*, 35(3), 405–410. <https://doi.org/10.1080/01926230701230353>

AnvariFar, H., Amirkolaie, A. K., Jalali, A. M., Miandare, H. K., et al. (2018). Environmental pollution and toxic substances: Cellular apoptosis as a key parameter in a sensible model like fish. *Aquatic Toxicology*, 204, 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.010>

Assis, J., Tyberghein, L., Bosch, S., Verbruggen, H., et al. (2017). Bio-ORACLE v2.0: Extending marine data layers for bioclimatic modelling. *Global Ecology and Biogeography*, 27(3), 277–284. <https://doi.org/10.1111/geb.12693>

Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), 817–834.

Austin, B. (1998). The effects of pollution on fish health. *Journal of applied microbiology*, 85(S1), 234S-242S.

Avcı, A., Kaçmaz, M., & Durak, I. (2005). Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.003>

Azzalis, L. A., Junqueira, V. B. C., & Simon, K. (1995). Prooxidant and antioxidant hepatic factors in rats chronically fed an ethanol regimen and treated with an acute dose of lindane. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 147–159. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00235-C](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00235-C)

Ballesteros, M. L., Rivetti, N. G., Morillo, D. O., Bertrand, L., et al. (2017). Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of the Total Environment*, 595, 711–722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.203>

Ballesteros, M. L., Hued, A. C., González, M., Miglioranza, K. S. B., et al. (2017b). Evaluation of the health status of the silverside (*Odontesthes bonariensis*) at a RAMSAR site in South America. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(1), 62–68. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2055-0>

Banerjee, T. K. (2007). Histopathology of respiratory organs of certain air breathing fishes of India. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4), 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9170-5>

Banerjee, T. K., & Parashar, R. S. (2007). Histopathology of respiratory organs of certain air-breathing fishes of India. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9170-5>

Barišić, J., Dragun, Z., Ramani, S., Filipović Marijić, V., et al. (2015). Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an

indicator of river pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.027>

Beiras, R. (2018). *Marine pollution: sources, fate and effects of pollutants in coastal ecosystems*. Elsevier.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., et al. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Bigatti G, Primost MG, Cledón M, Averbuj A, et al., (2009) Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Mar Poll Bull* 58:695-701.

Blanar, C.A., Munkittrick, K.R., Houlahan, J., MacLatchy, D.L., Marcogliese, D.J., 2009. Pollution and parasitism in aquatic animals: a meta-analysis of effect size. *Aquat. Toxicol.* 93, 18–28.

Blandford, M. I., Taylor-Brown, A., Schlacher, T. A., Nowak, B., et al. (2018). Epitheliocystis in fish: An emerging aquaculture disease with a global impact. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1436–1446. <https://doi.org/10.1111/tbed.12908>

Bökenhans, V., Bigatti, G., Asorey, M. G., & Averbuj, A. (2017). Age and growth differences in two populations of the edible marine gastropod *Buccinanops globulosus*. *Marine Biology Research*, 14, 354–365. <https://doi.org/10.1080/17451000.2017.1406667>

Bonga, S. W., & Lock, R. A. (2008). *The osmoregulatory system* (pp. 401–416). CRC Press.

Butnariu, M. (2022). *Aquatic pollution and marine ecosystems*. En G. A. Noga (Ed.), *Bacterial Fish Diseases* (Cap. 1, pp. 1–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85624-9.00009-9>

Camargo, M. M. P., & Martínez, C. B. R. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327–336. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000300013>

Canadian Council on Animal Care. (2005). Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa, Ontario. Also available at: [www.ccac.ca](http://www.ccac.ca)

Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., et al. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157(11), 3025–3033. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.055>

Cengiz, E. İ., Ünlü, E., & Balcı, K. (2011). The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 36(1), 75–85.

Cengiz, E. I. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.03.006>

Commendatore, M. G., & Esteves, J. L. (2007). An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina. *Environmental Management*, 40, 814–821.

Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., et al. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*, 92(3), 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.009>

Couillard, C. M., Williams, P. J., Courtenay, S. C., & Rawn, G. P. (1999). Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 44(4), 263-278.

Crespo, S., Soriano, E., Sampera, C., & Balasch, J. (1981). Zinc and copper distribution in excretory organs of the dogfish *Scyliorhinus canicula* and chloride cell response following treatment with zinc sulphate. *Marine Biology*, 65, 117–123.

Da Cuña, R. H., Rey Vázquez, G., Piol, M. N., Guerrero, N. V., et al. (2011). Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei,

Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 1065–1073.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.002>

Dang, Z. C., & Brauner, C. J. (2021). Effects of waterborne pollutants on the immune system of fish: Implications for public health. *Science of the Total Environment*, 758, 143911.

Dar, G. H., Bhat, R. A., Kamili, A. N., Chishti, M. Z., Qadri, H., Dar, R., & Mehmood, M. A. (2020). Correlation between pollution trends of freshwater bodies and bacterial disease of fish fauna. *Fresh water pollution dynamics and remediation*, 51-67.

Del Brío, F. E., Commendatore, M. G., Castro, I. B., Costa, P. G., et al. (2016). Distribution and bioaccumulation of butyltins in the edible gastropod *Odontocymbiola magellanica*. *Marine Biology Research*, 12(6), 608–620. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1169296>

Don Pedro, K. N. (1990). A note on the definition of water pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, 14, 227–231.

Dutta, D., & Banerjee, S. (2016). Studies on length weight relationship, condition factor and hepatosomatic index of one stripe spiny eel *Macrogathus aral* (Bloch and Schneider, 1801) in West Bengal. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(8).  
<http://www.ijsrp.org/research-paper-0816.php?rp=P565671>

Encina, L., & Granado-Lorencio, C. (1997). Seasonal changes in condition, nutrition, gonad maturation and energy content in barbel, *Barbus sclateri*, inhabiting a fluctuating river. *Environmental Biology of Fishes*, 50(1), 75–84. <https://doi.org/10.1023/A:1007381414397>

Feist, S. W., Stentiford, G. D., Kent, M. L., Ribeiro Santos, A., et al. (2015). Histopathological assessment of liver and gonad pathology in continental slope fish from the northeast Atlantic Ocean. *Marine Environmental Research*, 106, 42–50.

Ferguson, H. W. (1989). *Systemic pathology of fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts* (1st ed.). Iowa State University Press.

Ferguson, H. W. (2006). *Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in Teleosts and their responses in disease* (2nd ed.). Scotian Press.

Fernandes, M. N., & Mazon, A. F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. En A. L. Val & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish adaptation* (pp. 203–231). Science Publishers.

Ferrando, A. & Sturla Lompré, J. (2020). Caracterización físico-química y biológica de sedimentos marino costeros, sujetos o no a actividades antropogénicas (Golfo Nuevo, Patagonia Argentina), *Revista del Museo de La Plata*, 5(2), pp. 510-518. <https://doi.org/10.24215/25456377e123>

Fonseca, A. R., Sanches Fernandes, L. F., Fontainhas Fernandes, A., Monteiro, S. M., & Pacheco, F. A. L. (2016). From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. *Science of The Total Environment*, 550, 972–986. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.199>

Fournie, J. W., Summers, J. K., Courtney, L. A., Engle, V. D., & Blazer, V. S. (2001). Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(2), 105–116. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013<0105:UOSMAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013<0105:UOSMAA>2.0.CO;2)

Fu, D., Hu, Y., Chu, P., Wang, T., Chu, M., Shi, Y., & Guo, Z. (2021). Histopathological and calreticulin changes in the liver and gill of Takifugu fasciatus demonstrate the effects of copper nanoparticle and copper sulphate exposure. *Aquaculture Reports*, 20, 100662.

Gaber, H. S., Abbas, W. T., Authman, M. M. N., & Gaber, S. A. (2014). Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in Bardawil Lagoon, North Sinai, Egypt. *Global Veterinaria*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.01.76199>

Galvan, D. E., Venerus, L. A., & Irigoyen, A. J. (2009). The reef-fish fauna of the northern Patagonian Gulfs, Argentina, Southwestern Atlantic. *The Open Fish Science Journal*, 2, 90–98. <http://dx.doi.org/10.2174/18744401X00902010090>

Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. CRC Press. Science Publishers. <https://doi.org/10.1201/b10183>

Geraudie, P., et al. (2017). Endocrine disruption effects in male and intersex roach (*Rutilus rutilus*, L.) from French rivers: An integrative approach based on subcellular to individual responses. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 211 (2017) 29–36

Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G. (2013) Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.02.007>.

Gil, M. N., & Esteves, J. L. (2000). Nutrient budgets in Bahía Nueva, golfo Nuevo (Patagonia, Argentina). En *Proceedings of the Estuarine Systems of the South American Region: Carbon, Nitrogen and Phosphorus Fluxes* (Loicz Reports and Studies No. 15).

Gil, M. N., Harvey, M. A., & Esteves, J. L. (1999). Heavy metals in intertidal surface sediments from the Patagonian coast, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(1), 52–58.

Gingerich , W.H. ( 1982 ) Hepatic toxicology of fi shes . In *Aquatic Toxicology* , ed. L.F. Weber , pp. 55 – 105 . New York :Plenum Press .

Gola, D., Tyagi, P. K., Arya, A., Chauhan, N., Agarwal, M., Singh, S. K., & Gola, S. (2021). The impact of microplastics on marine environment: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100552.

Grinwis, G. C. M., Vethaak, A. D., Wester, P. W., & Vos, J. G. (2000). Toxicology of environmental chemicals in the flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on the immune system: field, semi-field (mesocosm) and laboratory studies. *Toxicology Letters*, 112–113, 289–301

Guill, T. J., Pande, J., & Tewari, H. (1990). Hepatopathotoxicity of three pesticides in a freshwater fish (*Puntius conchoni* Ham.). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 25, 653–663.

Häder, D.-P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A. C., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total Environment*, 713, 136586. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>

Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel CV, et al., (2008) A global map of human impact on marine ecosystems, *Science* 319, 948-952.

Hasan, J., Ferdous, S. R., Rabiya, S. B. A., Hossain, M. F., Hasan, A. M., & Shahjahan, M. (2022). Histopathological responses and recovery in gills and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diesel oil. *Toxicology Reports*, 9, 1863–1868. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.10.005>

Heath, A. G. (1995). *Water pollution and fish physiology* (2.<sup>a</sup> ed.). CRC Lewis Publishers. <https://doi.org/10.1201/9780203718896>

Herraez M.P. & Zapata A.G. (1991) Structural characterization of the melano-macrophage centres of goldfish, *Carassius auratus*. *European Journal of Morphology* 29, 89–102.

Hinton, D. E., Segner, H., & Braunbeck, T. (2001). Toxic responses of the liver. En D. Schlek & W. H. Benson (Eds.), *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts* (pp. 224–268). Taylor & Francis.

Hinton , D.E. & Lauren , D.J. ( 1990 ) Integrative histopathological approaches to the detection of environmental stressors on fishes . *Am. Fish. Soc. Symp.* 8 , 51 – 65 .

Holmstrup M, Bindesbøl AM, Oostingh GJ, Duschl A, et al., (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review, *Sci. Total Environ.* 408, 3746-3762.

Hughes, G. M., & Morgan, M. (1973). The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biological Reviews*, 48, 419–475. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1973.tb01009.x>

Ibuki, Y., & Goto, R. (2002). Phototoxicity of benzo[a]pyrene by ultraviolet A irradiation: Induction of apoptosis in Jurkat cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(01\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00110-7)

Irigoyen A, Trobbiani G, Casalnuovo M & Alonso M (2018) *Peces y Pesca deportiva argentina*. Trelew: Remitente patagonia. ISBN 9789873918971. 263 pag.

Irigoyen, A. J., Galván, D. E., Venerus, L. A., & Parma, A. M. (2013). Variability in abundance of temperate reef fishes estimated by visual census. *PLoS ONE*, 8(4), e61072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061072>

Islam, M. S., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48(7–8), 624–649. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>

Iwama, G. K. (2007). The welfare of fish. *Dis Aquat Org*, 75: 155–158.

Jackson, L. M., Felgenhauer, B. E., & Klerks, P. L. (2019). Feminization, altered gonadal development, and liver damage in least killifish (*Heterandria formosa*) exposed to sublethal concentrations of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.094>

Jaureguiberry, P., Titeux, N., Wiemers, M., Bowler, D. E., Coscieme, L., Golden, A. S., & Purvis, A. (2022). The direct drivers of recent global anthropogenic biodiversity loss. *Science Advances*, 8(45), eabm9982.

Jiang, X., Xing, J., Tang, X., Sheng, X., Chi, H., & Zhan, W. (2022). CD4-1 and CD8 $\alpha$  T lymphocytes subsets in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and comparison on antigenicity of T lymphocytes subsets in other three marine fish species. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 487–497.

Khan, R. A. (2012). The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.009>

Kandemir, Ş., & Polat, N. (2007). Seasonal variation of total lipid and total fatty acid in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) reared in Derbent Dam Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7(1), 27–31.

Kaptaner, B., Kankaya, E., Doğan, A., & Çelik, İ. (2014). Histopathology and oxidative stress in the liver of *Chalcalburnus tarichi* living in Lake Van, Turkey. *Life Science Journal*, 11(8), 66–77.

Karnaky, K. J. Jr. (1980). Ion-secreting epithelia: Chloride cells in the head region of *Fundulus heteroclitus*. *American Journal of Physiology*, 238(2), R185–R190.

Koehler, A., 2004. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquat. Toxicol.* 70, 257–276.

Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341(6147), 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>

Kostić-Vuković, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Višnjić-Jeftić, Ž., et al. (2021). Temporal variation of biomarkers in common bream *Abramis brama* (L., 1758) exposed to untreated municipal wastewater in the Danube River in Belgrade, Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8), 465. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09232-6>

Kostić, J., Kolarević, S., Kračun Kolarević, M., Aborgiba, M., et al. (2017). The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>

Kumar, N., Krishnani, K. K., & Singh, N. P. (2018). Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 8914–8927. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1165-x>

Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Mallavarapu, M., & Kadiyala, V. (Eds.). (2020). *Total petroleum hydrocarbons: Environmental fate, toxicity, and remediation*. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24035-6>

Laborde, J. M. (2021). Peces como animales de experimentación en: Ciencia y Bienestar de los Animales de Laboratorio. Cecilia Carbone, Miguel Ángel Ayala y María del Pilar Cagliada (coordinadores), Universidad Nacional de La Plata; EDULP.

Lawrence, A. J., & Hemingway, K. L. (Eds.). (2003). *Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses*. Blackwell Science. <https://doi.org/10.1002/9780470999691>

Leone, O. L., Valdecantos, M. S., & Martínez, V. H. (2018). Marcadores histopatológicos de estrés ambiental en el pez *Odontheistes bonariensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae) en dos embalses de Argentina. *Cuadernos de Investigación UNED*, 10(2), 273–282. <https://doi.org/10.22458/urj.v10i2.1909>

Li, H., Dong, Z., Weng, Q., Chang, C. C., & Liu, B. (2015). Emerging pollutants–Part I: occurrence, fate and transport. *Water Environment Research*, 87(10), 1849-1872.

Liebel, S., Tomotake, M. E. M., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2013). Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2), 9–15. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.02.002>

Maggioni, T., Hued, A. C., Monferrán, M. V., Bonansea, R. I., Galanti, L. N., & Amé, M. V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(3), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9785-0>

Magnoni, D. M., Heck, M. C., Gigliolli, A. A. S., Buzo, M. G., Molke, A. S., de Syllos, R. S., da Motta Lima, O. C., & Vicentini, V. E. P. (2023). Nuclear and morpho-histopathological alterations in *Astyanax altiparanae* exposed to effluent from the process of anodizing aluminum. *Aquatic Toxicology*, 262, 106637. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106637>

Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630–648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>

Mansell, B. W., Powell, M. D., Ernst, I., & Nowak, B. F. (2005). Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases*, 28(5), 253–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00625.x>

Marcinkevicius, M. S. (2015). Análisis histológico del desarrollo gonadal del Mero Austral, *Sebastes oculatus*. 4° Simposio Argentino de Ictiología, Mar del Plata, Argentina.

Marcinkevicius, M. S. (2009). Ciclo reproductivo del esgrófalo, *Sebastes oculatus*. 2da Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos, Chascomús, Argentina.

Massara Paletto, V., Commendatore, M. G., & Esteves, J. L. (2008). Hydrocarbon levels in sediments and bivalve mollusks from Bahía Nueva (Patagonia, Argentina): An assessment of probable origin and bioaccumulation factors. *Marine Pollution Bulletin*, 56(11), 2082–2105.

Meador, J. P., Yeh, A., & Gallagher, E. P. (2018). Adverse metabolic effects in fish exposed to contaminants of emerging concern in the field and laboratory. *Environmental Pollution*, 236, 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.007>

Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., et al. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.013>

Miglioranza, K. S. B., González, M., Menone, M. L., Colombo, J. C., et al. (2021). Spatial and temporal distribution of persistent organic pollutants and current-use pesticides in the atmosphere of Argentinean Patagonia. *Chemosphere*, 266, 128973.

Mohamed, F. A. S. (2009). Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(1), 29–39.

Montes, C. S., Pantoja Ferreira, M. A., Giarrizzo, T., Amado, L. L., & Rocha, R. M. (2020). Evaluation of metal contamination effects in piranhas through biomonitoring and multi biomarkers approach. *Heliyon*, 6, e04666. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04666>

Moore, L. J., Somamoto, T., Lie, K. K., Dijkstra, J. M., et al. (2005). Characterisation of salmon and trout CD8alpha and CD8beta. *Molecular Immunology*, 42(10), 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.017>

Morgan, M., & Tovell, P. W. A. (1973). The structure of the gill of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 142, 147–162.

Morrison, J. (2007). Normal Histology. En S. Mumford, J. Heidel, C. Smith, J. Morrison, B. MacConnell, & V. Blazer (Eds.), *Fish Histology and Histopathology* (Cap. 2, pp. 2–1 a 2–56). U.S. Fish and Wildlife Service, National Conservation Training Center.

Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World* (4.<sup>a</sup> ed.). John Wiley & Sons.

Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World* (5.<sup>a</sup> ed.). John Wiley & Sons.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., et al. (2006). Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 365–377. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.014>

Neves, M. P., de Arruda Amorim, J. P., & Delariva, R. L. (2018). Influence of land use on the health of a detritivorous fish (*Ancistrus mullerae*) endemic to the Iguassu ecoregion: relationship between agricultural land use and severe histopathological alterations. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 11670-11682.

Nimet, J., Neves, M. P., Viana, N. P., de Arruda Amorim, J. P., & Delariva, R. L. (2020). Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: Negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8030-y>

Noga, E. J. (1996). *Fish disease diagnosis and treatment* (pp. 63–146). Mosby-Year Book Inc.

Novacovsky, G. N., Palacios, M. G., & Sueiro, M. C. (2021). Epitheliocystis in wild marine fishes and its relation with anthropogenic pollution. *Journal of Fish Biology*, 1–5. <https://doi.org/10.1111/jfb.14826>

Novacovsky, G. N., Rubilar, T., & Sueiro, M. C. (2020). Primer registro de epiteliocistis en dos especies de peces de arrecifes rocosos en golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina). *Naturalia Patagónica*, 16, 77–92.

Nowak, B. F., & LaPatra, S. E. (2006). Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases*, 29(10), 573–588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00747.x>

Oliveira, S. E., Costa, P. M., Nascimento, S. B., Castro, W. V., et al. (2018). Atrazine promotes immunomodulation by melanomacrophage centre alterations in spleen and vascular disorders in gills from *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology*, 202, 57–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.018>

Oropesa, A. L., Moreno, J. J., & Gómez, L. J. (2017). Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Revista de Toxicología*, 34(2), 99-108.

Osman, A. G. M. (2012). Biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to assess the impacts of River Nile pollution: Bioaccumulation, biochemical and tissues biomarkers. *Journal of Environmental Protection*, 3(8A), 966–977. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.328112>

Ossana, N. A., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Tripoli, L., et al. (2019). Histological, genotoxic, and biochemical effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): Early response bioassays to assess the impact of receiving waters. *Journal of Toxicology*, 2019, 4687685. <https://doi.org/10.1155/2019/4687685>

Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Castañé, P. M., et al. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista River water.

Papagiannis I., I. Kagalou, J. Leonardos, D. Petridis, V. Kalfakakou, Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environ. Int.* 30 (2004) 357-362.

Paulino, M. G., Benze, T. P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M. M., et al. (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: Bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, 497–498, 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.122>

Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 6e13.

Payne, J. F., & Fancey, L. F. (1989). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, 28, 431–435.

Peterson, C. H., & Lubchenco, J. (1997). Marine ecosystem services. In G. C. Daily (Ed.), *Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems* (pp. xx–xx). Island Press.

Playle, R. C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment*, 219(2–3), 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00232-0)

Poleksić, V., & Mitrović Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. En R. Müller & R. Lloyd (Eds.), *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish* (pp. 339–352). Fishing News Books.

Poleksić, V., Lenhardt, M., Jarić, I., Djordjević, D., et al. (2010). Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 515–521. <https://doi.org/10.1002/etc.82>

Primost, M.A., Commendatore M., Torres, P.J., Bigatti, G. (2018). PAHs contamination in edible gastropods from north Patagonian harbor areas. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 828–831. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.021>

Primost, M. A., Gil, M. N., & Bigatti, G. (2017). High bioaccumulation of cadmium and other metals in Patagonian edible gastropods. *Marine Biology Research*, 13(7), 774–781. <https://doi.org/10.1080/17451000.2017.1296163>

Proyecto Arrecife. (s. f.). El portal de los peces y la pesca en Argentina. <https://www.proyectoarrecife.com.ar/>

Pujari, M., & Kapoor, D. (2021). Heavy metals in the ecosystem: Sources and their effects. En V. Kumar, A. Sharma, & A. Cerdà (Eds.), *Heavy Metals in the Environment* (pp. 1–7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821656-9.00001-8>

Rands, M. R. W., Adams, W. M., Bennun, L., Butchart, S. H. M., et al. (2010). Biodiversity conservation: Challenges beyond 2010. *Science*, 329(5997), 1298–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1189138>

Rašković, B., Čičovački, S., Ćirić, M., Marković, Z., & Poleksić, V. (2016). Integrative approach of histopathology and histomorphometry of common carp (*Cyprinus carpio* L.) organs as a marker of general fish health state in pond culture. *Aquaculture Research*, 47(11), 3455–3463. <https://doi.org/10.1111/are.12795>

Reed, S. K., Bullard, S. A., Overstreet, R. M., & Kornell, W. J. (2009). Monogenean parasites of fishes from the northern Gulf of Mexico: A checklist and bibliography. *Zootaxa*, 1984(1), 1–62.

Roberts, R. J. (2012). *Fish pathology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.

Salamat, N., & Zarie, M. (2016). Fish histopathology as a tool for use in marine environment monitoring: A review. *Comparative Clinical Pathology*, 25(6), 1273–1278. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2037-0>

Santos, D. M. S., Melo, M. R. S., Mendes, D. C. S., Rocha, I. K. B. S., et al. (2014). Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(12), 12927–12937. <https://doi.org/10.3390/ijerph111212927>

Santos, R. M. B., Monteiro, S. M. V., Cortes, R. M. V., Pacheco, F. A. L., & Fernandes, L. F. S. (2022). Seasonal differences in water pollution and liver histopathology of Iberian barbel (*Luciobarbus bocagei*) and Douro nase (*Pseudochondrostoma duriense*) in an agricultural watershed. *Water*, 14(3), 444. <https://doi.org/10.3390/w14030444>

Saraceno, M., Martín, J., Moreira, D., Pisoni, J. P., & Tonini, M. H. (2021). Physical changes in the Patagonian shelf. En H. Helbling, M. A. Narvarte, R. A. González, & V. E. Villafañe (Eds.), *Global*

*Change in Atlantic Coastal Patagonian Ecosystems: A Journey Through Time* (pp. 43–71). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54528-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54528-6_3)

Savassi, L. A., Paschoalini, A. L., Arantes, F. P., et al. (2020). Heavy metal contamination in a highly consumed Brazilian fish: Immunohistochemical and histopathological assessments. *Environmental Monitoring and Assessment*, *192*, 542. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08515-8>

Sayed, A. H., & Younes, H. A. M. (2016). Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, *4*(3), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.07.003>

Schmidt, H., Bernet, D., Wahli, T., Meier, W., & Burkhardt-Holm, P. (1999). Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *Journal of Fish Biology*, *54*(3), 585–596. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00637.x>

Schmidt-Posthaus, H., Polkinghorne, A., Nufer, L., Schifferli, A., et al. (2012). A natural freshwater origin for two chlamydial species, *Candidatus Piscichlamydia salmonis* and *Candidatus Clavochlamydia salmonicola*, causing mixed infections in wild brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Microbiology*, *14*(8), 2048–2057. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02670.x>

Selig, E. R., et al. (2018). Mapping global human dependence on marine ecosystems. *Conservation Letters*, *12*, e12617. <https://doi.org/10.1111/conl.12617>

Shaan, W. M. (2024). Hazardous effects of heavy metal pollution on Nile tilapia in the aquatic ecosystem of the Eastern Delta in Egypt. *BMC Veterinary Research*, *20*, 585. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04367-3>

Shekh, T., Tang, S., Kodzhahinchev, V., Niyogi, S., & Hecker, M. (2019). Species and life-stages specific differences in cadmium accumulation and cadmium-induced oxidative stress, metallothionein and heat shock protein responses in white sturgeon and rainbow trout. *Science of the Total Environment*, *673*, 318–326.

Shephard, K. L. (1993). Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *11*(3), 403–417. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90018-Y](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90018-Y)

- Silva, C. A., Oliveira-Rivero, C. A., Katsumiti, A., Araújo, M. L. P., et al. (2009). Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.004>
- Simonato, J. D., Guedes, C. L. B., & Martinez, C. B. R. (2008). Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.01.012>
- Sindermann, CJ (1979) Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: a review. *Fish. Bull.* 76: 717-749.
- Sobral dos Santos, Í. G., Lira, A. S., da Silva Montes, C., Point, D., Médieu, A., do Nascimento, C. W. A., Lucena-Frédou, F., & da Rocha, R. M. (2023). Revealing the environmental pollution of two estuaries through histopathological biomarkers in five fishes from different trophic guilds of northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 192, 115095. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115095>
- Spazier, E., Storch, V., & Braunbeck, T. (1992). Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine River. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, 1–22.
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*, 8, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., et al. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55(2), 137–159. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00212-X)
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Stosik, M. P., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2019). Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Central European Journal of Immunology*, 44(2), 201–205. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.87072>

- Strzyżewska, E., Szarek, J., & Babińska, I. (2016). Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: A review. *Veterinární Medicína*, 61(3), 123–132. <https://doi.org/10.17221/8763-VETMED>
- Sueiro, M. C., Palacios, M. G., Trudeau, V. L., Somoza, G. M., & Awruch, C. A. (2022). Anthropogenic impact on the reproductive health of two wild Patagonian fish species with differing reproductive strategies. *Science of the Total Environment*, 838, Article 155862. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155862>
- Sueiro, M. C., Awruch, C., Gilardoni, C., Demetrio, M., & Palacios, M. G. (2020). Immunity and health of two wild marine fishes naturally exposed to anthropogenic pollution. *Science of the Total Environment*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138303>
- Sueiro, M. C., Bagnato, E., & Palacios, M. G. (2017). Parasite infection and immune and health-state in wild fish exposed to marine pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.029>
- Sueiro, M. C., & Palacios, M. G. (2016). Immunological and health-state parameters in the Patagonian rockfish *Sebastes oculatus*: Their relation to chemical stressors and seasonal changes. *Fish & Shellfish Immunology*, 48, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.029>
- Sun, S., Wu, J., Lv, H., Zhang, H., et al. (2020). Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 394, 122537. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122537>
- Sures, B. (2008). Environmental parasitology: Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite*, 15(3), 434–438. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153434>
- Suresh, N. (2009). Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of environmental biology*, 30(4).
- Takashima, F., & Hibiya, T. (1995). *An atlas of fish histology: Normal and pathological features* (2nd ed.). Kodansha.

Takizawa, F., Magadan, S., Parra, D., Xu, Z., et al. (2016). Surface expression of trout CD4-1 and CD4-2 defines novel populations of functionally distinct CD4+ T cells in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 88. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.131>

Tang, J.Y.M., Au, D.W.T., 2004. Osmotic distress: a probable cause of fish kills on exposure to a subbloom concentration of the toxic alga *Chattonella marina*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2727e2736.

Temmink, J. H. M., Bouwmeister, P. J., de Jong, P., & van den Berg, J. H. J. (1983). An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology*, 4, 175–179.

Timashova, L. V. (1981). Seasonal changes in the structure of the liver of plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Ichthyology*, 21(2), 145–151.

Troncoso, I. C., Cazenave, J., Bacchetta, C., & Bistoni, M. de los Á. (2012). Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 693–702. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9551-7>

Tyberghein, L., Verbruggen, H., Pauly, K., Troupin, C., Mineur, F., & De Clerck, O. (2012). Bio-ORACLE: A global environmental dataset for marine species distribution modelling. *Global Ecology and Biogeography*, 21(2), 272–281. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00656.x>

van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.

van Dyk, J. C., Pieterse, G. M., & van Vuren, J. H. J. (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.012>

Vethaak, A. D., Bucke, D., Lang, T., Wester, P. W., Jol, J., & Carr, M. (1992). Fish disease monitoring in the North Sea and approaches for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Ecology Progress Series*, 91(1–3), 173–192. <https://doi.org/10.3354/meps091173>

Vignet, C., Larcher, T., Davail, B., Joassard, L., Le Menach, K., Guionnet, T., Lyphout, L., Ledevin, M., Goubeau, M., Budzinski, H., Bégout, M. -L., & Cousin, X. (2016). Fish Reproduction Is Disrupted upon Lifelong Exposure to Environmental PAHs Fractions Revealing Different Modes of Action. *Toxics*, 4(4), 26. <https://doi.org/10.3390/toxics4040026>

Villanueva Gomila, G. L., Macchi, G. J., Ehrlich, M. D., Irigoyen, A. J., et al. (2015). The reproductive biology of *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 (Osteichthyes: Pinguipedidae) in temperate rocky reefs of Argentina. *Neotropical Ichthyology*, 13(4), 733–744. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150053>

Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., et al. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>

Ward, D., Melbourne Thomas, J., Pecl, G. T., et al. (2022). Safeguarding marine life: Conservation of biodiversity and ecosystems. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 32, 65–100. <https://doi.org/10.1007/s11160-022-09700-3>

Weber, A. A., Sales, C. F., Faria, F. de S., Melo, R. M. C., et al. (2020). Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>

Weeks, B. A., Anderson, D. P., DuFour, A. P., Fairbrother, A., et al. (1992). Immunological biomarkers to assess environmental stress. In R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle Jr., & H. L. Bergman (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress* (pp. 211–234). Lewis Publishers.

Wester, P. W., Vethaak, D., & van Muiswinkel, W. B. (1994). Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*, 86, 213–232.

Wirgin, I., & Waldman, J. R. (2004). Resistance to contaminants in North American fish populations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 552(1–2), 73–100.

Wolf, J. C., & Wolfe, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 75–85. <https://doi.org/10.1080/01926230590890187>

Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickstein C. & George C.J.(1985) Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 222–227.

Wood, C. M. (2001). Toxic responses of the gill. In D. Schlenk & W. H. Benson (Eds.), *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts* (Vol. 1, pp. 1–89). Taylor & Francis.

Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., & Georgieva, E. (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied ecology and environmental research*, 14(1), 47-75. DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401\\_047075](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1401_047075)

Zapata, A. G. (2024). The fish spleen. *Fish and Shellfish Immunology*, 144, 109280. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109280>