

4.- ASSAIG DE TOXICITAT SUBCRÒNICA; ESTUDI HISTOPATOLÒGIC EN TRUITA IRISADA (*Oncorhynchus mykiss*)

4.1. INTRODUCCIÓ

La segona part d'aquest treball s'ha centrat en els possibles efectes que produirien els suavitzants emulsionants i microemulsionats sobre la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) després d'una exposició prolongada (30 dies) a una concentració del 1/10 de la concentració CL_{50} obtinguda per aquesta espècie.

Es van escollir dos dels suavitzants en estudi: un amoni quaternari (DSDMAC) i una imidazolina quaternària (DSAEMIMS), en les dues versions: emulsió i miroemulsió. La elecció d'aquests dos suavitzants es va decidir per ser l'un d'ells (DSDMAC) el més tòxic de tots, i l'altre (DSAEMIMS) la imidazolina més tòxica.

4.1.1. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

Es necessària la determinació d'altres paràmetres que no siguin les CE_{50} per a poder tenir un millor coneixement dels possibles efectes toxicològics d'efluents industrials i de productes químics en diferents espècies del medi aquàtic (Bervoets i altres, 1993, 1996; Williams i altres, 1993; Middaugh, 1997; Hutchinson i altres, 1998; Soimasuo i altres, 1998). Es per això que l'estudi histopatològic en assaigs de toxicitat subletal és un complement als estudis de contaminació aquàtica, donant informació sobre les lesions que poden aparèixer en animals aquàtics pels efectes dels xenobiòtics presents a l'aigua (Mallat, 1985; Evans, 1987; Overstreet, 1988; Schwaiger i altres, 1992; Hinton, 1993; Neskovic i altres, 1993; Kierner i altres, 1995; Haaparanta i altres, 1997; Teh i altres, 1997; Grinwis i altres, 1998; Pawert i altres, 1998, Austin, 1999). La majoria d'aquests estudis s'han centrat en la brànquia i el fetge ja que s'ha observat que aquests òrgans semblen ser els més sensibles a les alteracions del medi (Teh i altres, 1997; Sandbacka i altres, 1999).

4.1.1.1. Brànquia

La brànquia dels teleostis és un òrgan plurifuncional que du a terme l'intercanvi de gasos i de ions, la regulació de l'equilibri àcid-base i l'excreció de productes nitrogenats (Girard i Payan, 1980; Evans, 1987; Heisler, 1984; Hoar i Randall, 1984; Payan i altres, 1984; Goss i altres,

1992; Zadunaisky, 1996; Perry, 1997, 1998; Goss i altres, 1998; Randall i Brauner, 1998). És l'òrgan més sensible a canvis del medi, i la seva resposta, ja sigui d'adaptació o patològica, determina l'abast de la regulació homeostàtica de l'ambient intern de l'organisme (Wood i Soivio, 1991; Bonga i Lock, 1992).

La superfície de la brànquia és gran en relació a la resta del cos de l'animal. Únicament una doble capa epitelial separa el medi intern del medi extern a nivell de lamel·les respiratòries. És per això que les brànquies juguen un paper important en l'entrada de contaminants i són les primeres estructures en veure's afectades per l'exposició a aquests (Mallatt, 1985; Evans, 1987; Crespo i altres, 1988; McKim i Erickson, 1991; Wood i Soivio, 1991; Nowak i altres, 1992; Hinton, 1993). Per aquesta raó, aquest òrgan ha estat utilitzat freqüentment com un indicador dels efectes letals o subletals de diferents tipus de contaminants (Abel i Skidmore, 1975; Nuwayhid i altres, 1980; Gaino i altres, 1984; Misra i altres, 1985; Crespo i Sala, 1986a, 1986b; Byrne i altres, 1989; Black i McCarthy, 1990; Richardson i Dutta, 1990; Black i altres, 1991; McDonald i altres, 1991; Partearroyo i altres, 1991; Nowak i altres, 1992; Schmieder i Weber, 1992; Hemalatha i Banerjee, 1997; Pfeiffer i altres, 1997; Pawert i altres, 1998).

S'han distingit dues classes d'alteracions branquials segons el tipus de resposta a l'agent contaminant. El primer grup inclou la necrosi i la ruptura de l'epiteli branquial, que reflecteixen els efectes danyins de l'agent irritant (Temnick i altres, 1983), són dosi dependents, i són més freqüents en tractaments letals que en els subletals.

En el segon grup estan aquelles alteracions que s'interpreten com a una resposta de defensa del peix (Morgan i Tovell, 1973; Balm i Pottiger, 1993). Entre elles es troben l'hipersecreció de muc, la proliferació de cèl·lules de clorur, hiperplàsia o fusió lamel·lar (Abel, 1974; Abel i Skidmore, 1975; Jackson i Fromm, 1977; Nuwayhid i altres, 1980; Misra i altres, 1985; Byrne i altres, 1989; Brusle, 1991; Dutta i altres, 1997; Svobodová i altres, 1993; Prasad, 1994; Oliveira i altres, 1996; Pfeiffer i altres, 1997).

Mallatt (1985) i Evans (1987) van fer una recopilació d'alteracions branquials produïdes per diferents tipus de contaminants. Van arribar a la conclusió que aquestes alteracions eren majoritàriament inespecífiques ja que, sota un gran ventall de condicions d'exposició a agents irritants, les lesions branquials que apareixien eren molt similars.

L'epiteli lamel·lar està format per dues capes epitelials separades per un espai limfòide. La capa cel·lular externa o mucosa, formada principalment per cèl·lules pavimentàries, està relacionada amb la difusió de gasos, i la capa interna o serosa, formada per cèl·lules indiferenciades. La separació d'aquesta doble capa epitelial provoca un augment de la distància de difusió dels gasos, induint una alteració en la funció respiratòria del peix (Skidmore i

Towell, 1972; Playle i Wood, 1989; Tietge i altres, 1988; Conklin i altres, 1992; Nowak, 1992; Dutta i altres, 1997, Prasad, 1994; Klontz, 1995; Greco i altres, 1996; Hemalatha i Banerjee, 1997; Pfeiffer i altres, 1997; Szakolczai, 1997).

En l'epiteli del filament, a part de les cèl·lules pavimentàries, també es troben altres tipus cel·lulars, importants per la realització de les funcions branquials. Les cèl·lules mucoses tenen com a funció reconeguda la de segregar moc per revestir l'epiteli i protegir-lo (Mallat, 1985; Crespo i altres, 1988). D'altra banda, el fet de ser més nombroses en espècies d'aigua dolça, ha suggerit un paper en l'osmoregulació, controlant la pèrdua de ions (Laurent, 1984; Laurent i Hebibi, 1989). Tant el nombre de cèl·lules mucoses com la quantitat de moc que aquestes segreguen es veuen augmentats per l'exposició a diferents contaminants (Misra i altres, 1985; Lang i altres, 1987; Richmonds i Dutta, 1989; Black i McCarthy, 1990; Marlasca i Crespo, 1992).

Les cèl·lules de clorur són els components principals de l'epiteli del filament branquial, i es consideren el lloc d'intercanvi actiu de ions (Laurent i Dunel, 1980; Payan i altres, 1984; Karnaky, 1986; Zadunaisky, 1996; Perry, 1997) intervenint, per tant, en la funció osmoreguladora. En espècies marines són les responsables de l'excreció activa de NaCl (Evans, 1987; Wood i altres, 1999; Kelly i Woo, 1999), i en espècies d'aigua dolça el lloc on són captats els ions Na^+ i Cl^- (Avella i altres, 1987; Battram i altres, 1989; Goss i altres, 1992; Perry i Fryer, 1997; Goss i altres, 1998;) i també el Ca^{2+} (Payan i altres, 1981; Perry i Wood, 1985; Perry i Flik, 1988; Perry, 1997). Els canvis fisiològics i ambientals (fotoperíode, salinitat, acidesa i duresa de l'aigua) que poden promoure una pèrdua d'electròlits interns, estan associats amb un increment en la densitat de les cèl·lules de clorur, així com de l'augment de la seva grandària (Fischer-Scherl i Hoffmann, 1988; Laurent i Hebibi, 1989; Lubin i altres, 1991; Conklin i altres, 1992; Goss i altres, 1992; Goss i altres, 1998; Pisam i altres, 1995; Lee i altres, 1996; Bartels i altres, 1996). La presència de contaminants en el medi també poden alterar el funcionament d'aquestes cèl·lules (metalls pesants: Engelhardt i altres, 1981; Oronsaye i Brafield, 1984; Crespo i Sala, 1986a, 1986b; Sola i altres, 1995; Karan i altres, 1998; pesticides: Pfeiffer i altres, 1997; tensioactius: Albassam i altres, 1987).

Els treballs realitzats amb tensioactius, majoritàriament de tipus aniònic, estan dirigits a l'estudi dels seus efectes sobre la brànquia dels teleostis (Abel, 1974; Abel i Skidmore, 1975; Jackson i Fromm, 1977; Nuwayhid i altres, 1980; Misra i altres, 1985; Albassam i altres, 1987; Evans, 1987; Byrne i altres, 1989; Brusle, 1991; Partearroyo i altres, 1991; Svobodová i altres, 1993; Ribelles i altres, 1995). Un dels efectes més característic dels agents tensioactius és el d'alterar les membranes cel·lulars al interaccionar amb els components fosfolipídics d'aquestes. El fet que la tensió de l'aigua disminueix per la presència dels tensioactius, fa que els lípids siguin menys repel·lents a l'aigua, fet que comporta la seva entrada, i per tant l'engrandiment del volum cel·lular. (Helenius i Simons, 1975). A

concentracions baixes de tensioactiu aquest efecte és reversible; a altes concentracions pot portar a una supressió dels processos metabòlics cel·lulars. Una exposició a llarg termini pot danyar les cèl·lules, les quals es tornen necròtiques com estadi final. Aquests canvis comporten principalment un deteriorament de l'epiteli branquial (Svobodová i altres, 1993).

4.1.1.2. Fetge

S'han realitzat diversos treballs sobre la morfologia i fisiologia normal del fetge dels teleostis (Hampton i altres, 1985, 1988, 1989; Díaz i altres, 1989; Biagianti-Risbourg, 1991; González i altres, 1993, 1994; Bernet i altres, 1999). La unitat cel·lular que forma el parènquima hepàtic és l'hepatòcit. Aquestes cèl·lules s'organitzen formant cordons, en nombre de 5 o 7 cèl·lules que es disposen de manera tubular (Hampton i altres, 1988, 1989; Hinton i Laurén, 1990).

En peixos, es troben regions artèrio-biliars que estan constituïdes per un conducte biliar i una artèria hepàtica (Gingerich, 1982, Hampton i altres, 1985, Hinton i Laurén, 1990), a les que s'hi solen trobar associats melanomacròfags (Roberts, 1989).

L'orientació dels hepatòcits i la distribució dels orgànuls dins de la cèl·lula suggereix una polarització d'aquesta (Hampton i altres, 1988, 1989). La part apical de la cèl·lula està orientada cap a una estructura biliar (un canalícul envoltat totalment per hepatòcits o un preconducte o conducte biliar envoltat per hepatòcits i cèl·lules epitelials biliars), i els orgànuls associats a aquesta regió són l'aparell de Golgi, un nombre variable de lisosomes i una gran quantitat de microvellositats que es projecten a la llum del canalícul biliar (Hampton i altres, 1988; Hinton i Laurén, 1990). La part basal de l'hepatòcit està orientada cap als sinusoides, i el seu citoplasma conté una quantitat variable de glicogen i de lípids, reticle endoplasmàtic rugós i mitocondris (Hampton i altres 1985, 1988; Hinton i Laurén, 1990). La membrana cel·lular en aquesta regió basal forma prolongacions que es projecten cap al espai de Disse, que es troba delimitat també per les cèl·lules endotelials que envolten als sinusoides.

L'endoteli dels sinusoides és discontinu, mostra fenestracions, i no presenta làmina basal. D'aquesta manera es veu facilitat l'intercanvi entre hepatòcit i la sang (Welsch i Storch, 1973; Hinton i Pool, 1976; Ferri i Sesso, 1981; González i altres, 1994). En aquest espai de Disse podem trobar les cèl·lules de Ito, d'estructura similar a la dels mamífers (Hinton i Laurén, 1990).

Les unions de les membranes apicals dels hepatòcits formen els canalículs biliars, la llum dels quals està plena de microvellositats. A ells és on els hepatòcits van a abocar la bilis. Els canalículs s'uneixen formant els preconductets biliars, els quals estan delimitats per hepatòcits

i per cèl·lules epitelials, però no presenten làmina basal (Hampton i altres, 1988). A mida que aquests preconductes es van engrandint, van formant els conductes biliars, la transició entre els preconductes i els conductes biliars es caracteritza per la presència de làmina basal. Envoltant als conductes biliars es troben macròfags, cèl·lules musculars llises i fibroblasts (Hinton i Pool, 1976; Hampton i altres, 1988; González i altres, 1994).

Entre les funcions en les que intervé el fetge dels teleostis s'han de destacar (Hinton, 1993): (1) l'emmagatzemat de nutrients de reserva (lípid i glicogen) derivats de l'absorció intestinal per al seu posterior catabolisme en altres òrgans (Moon i altres, 1985); (2) síntesi biliar, la qual intervé en la digestió d'àcids greixosos i en el transport de metabolits conjugats de xenobiòtics per a la seva excreció o recirculació enterohepàtica (Gingerich, 1982; Health, 1987); (3) presència de sistemes enzimàtics capaços d'activar, inactivar i conjuguar els metabolits derivats de la degradació de xenobiòtics (Ferguson, 1989; Stegeman i altres, 1990; Van Veld i altres, 1990; Porter i Cool, 1991; Doblander i Lackner, 1996).

Considerant l'increment de substàncies xenobiòtiques en el medi aquàtic i la eficàcia en que són captades per les brànquies, l'intestí i la pell dels teleostis, la presència d'aquests sistemes enzimàtics són de vital importància per a l'adaptació i supervivència del grup, i han fet que l'activitat d'aquests enzims s'utilitzi com a biomarcador biològic (Myers i altres, 1991, 1998; Khan i Semalulu, 1995; Haley i altres, 1995; Spies i altres, 1996); tanmateix, aquests sistemes enzimàtics també són presents en altres òrgans de l'animal (ronyó, intestí i brànquies), i poden ser tant actius, si no més, que els presents en el fetge (Stegeman i altres, 1979, 1990; Miller i altres, 1988; Ferguson, 1989; Van Veld i altres, 1990; Ueng i altres, 1992).

Les respostes subletals de molts contaminants aquàtics poden ser detectades a nivell cel·lular i subcel·lular en el fetge dels teleostis. Varis estudis centrats en la influència de diversos factors en la morfologia i ultraestructura del fetge dels teleostis, com la innanició i composició de l'aliment (Storch i altres, 1983; Segner, 1985; Ventura i altres, 1986; Segner i Witt, 1990), la temperatura (Berlin i Dean, 1967), i els compostos tòxics (Rojik i altres, 1983; Wester i Canton, 1987; Spitsbergen i altres, 1988; Braunbeck i altres, 1989; Bucher i altres, 1992; Braunbeck, 1993; González i altres, 1994; Zahn i Braunbeck, 1993; Arnold i altres, 1996a, 1996b) han demostrat que els hepatòcits són molt sensibles als canvis ambientals.

4.2. MATERIAL I MÈTODES

4.2.1. TRACTAMENT SUBCRÒNIC

Amb el tractament subcrònic s'ha pretès estudiar els efectes provocats en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) per una exposició continuada durant un llarg període de temps (30 dies) a dos dels cinc tensioactius utilitzats en els estudis de toxicitat. Es van escollir un del tipus amoni quaternari (DSDMAC) i un del tipus imidazolina (DAAIMS), tant en la forma emulsionada com microemulsionada. Es van escollir aquests per ser el més i el menys tòxics respectivament.

Per a la realització de l'assaig es va seguir la norma OCDE 204 (1984). Es van utilitzar 20 animals repartits en dues peixeres de 20 litres per cada compost (10 individus/tanc) i també pel control. La concentració de cada compost que es va utilitzar va ser 1/10 de la CL₅₀ trobada en el tractament agut per cada un. Els animals van ser alimentats amb pinso diàriament, i van rebre una dosi equivalent a l'1 % del seu pes corporal (Riva, 1989). Les condicions de l'aigua van ser les mateixes que pels tractaments aguts.

El medi va ser renovat cada dos dies, tant per a eliminar-ne les substàncies excretades pels animals, ja que en altes concentracions poden ser tòxiques, com per a mantenir relativament constant la concentració dels tensioactius, ja que tendeixen a adherir-se a les parets de les peixeres.

Durant el període d'experimentació es va tenir control de les condicions del medi d'assaig; es van fer mesures periòdiques de pH, temperatura, oxigen dissolt, duresa, nitrits i amoni, utilitzant diferents kits comercials.

La durada del tractament va ser de 30 dies, i els diferents grups de tractament van ser contrastats amb un grup control, mantingut en les mateixes condicions d'experimentació.

4.2.2. ESTUDI ESTRUCTURAL DELS ÒRGANS

Per a estudiar les diferents alteracions que poguessin aparèixer després del tractament subcrònic es va fer l'estudi estructural de diferents òrgans de les truites tractades i les no tractades. Els animals van ser anestesiats amb MS 222 (metanosulfonat de triclaïna, SANDOZ)

i posteriorment es va portar a terme l'extracció dels diferents òrgans objecte d'estudi: brànquies i fetge.

Immediatament després es va començar el processament de les mostres, per tal d'evitar les possibles alteracions *posmortem*. Es van efectuar dos tipus d'inclusions, una en parafina (Paraplast) i una altra amb Araldite.

La inclusió en parafina es va realitzar per a l'estudi general dels teixits i per a la caracterització dels melanomacròfags utilitzant tincions histoquímiques específiques. La inclusió en Araldite ens va permetre un estudi més detallat a nivell de microscòpia òptica i l'estudi a microscòpia electrònica de transmissió.

4.2.2.1. Fixació i inclusió de les mostres en parafina. Estudi a microscòpia òptica.

A. Fixació

Els òrgans van ser fixats immediatament després de la seva extirpació de l'animal i de la extracció d'una petita mostra de cada un d'ells per al seu processat en Araldite.

El fixador utilitzat va ser formaldehid 4 %. en tampó fosfat. Com a mínim han d'estar en fixador durant de 2 o 3 dies, a una temperatura de 20-25 °C, abans de ser inclosos. En formaldehid es poden guardar els exemplars durant un temps indeterminat.

B. Inclusió i muntatge dels blocs

Un cop fixades les mostres van ser emplaçades en cassetts de plàstic i van ser processades segons un esquema en el qual hi ha una sèrie de banys de deshidratació en alcohols en grau creixent, uns banys de transició en xilè, i la inclusió final en parafina (veure l'annex 9.1 de material i mètodes). Aquest protocol va ser realitzat en un inclusor automàtic Citadel 2000.

Un cop processades les mostres, es van formar els blocs mitjançant un equip formador de blocs Histocentrez.

C. Secció i Tinció

La secció de les mostres, un cop confeccionats els blocs, es va efectuar mitjançant un microtom Reichert Jüng utilitzant ganivetes d'un sol ús. Es van realitzar talls de 4 a 6 µm, els

quals van ser recollits i estesos en un bany d'aigua a 37 °C i muntats en portaobjectes prèviament rentats i desengreixats. El seu assecat es va fer en una estufa a 37 °C durant 24 hores.

Per a la observació macroscòpica dels talls en parafina es va utilitzar la tècnica histomorfològica general de Hematoxilina de Mayer/Eosina acètica al 1 % (Luna, 1968) (veure l'annex 9.2.1 de material i mètodes).

4.2.2.2. Fixació i inclusió de les mostres en Araldite. Estudi a microscòpia òptica i electrònica de transmissió (MET)

A. Fixació i deshidratació

Perquè la fixació sigui bona, s'ha de reduir al màxim el temps entre la mort de l'animal i el moment de posar la mostra en fixador. Per tenir una fixació curta i ràpida, el volum de teixit que s'ha d'incloure ha de ser inferior a 0,5-1 mm³, el volum del fixador de 5 ml, i la temperatura a 4 °C i que es mantingui constant. A les mostres que tenen molta sang, com les brànquies, se'ls fa un primer rentat amb fixador per tal d'eliminar-la.

Els fixadors utilitzats van ser el glutaraldèhid i el tetraòxid d'osmi (OsO₄). Primer es realitza una fixació amb glutaraldèhid 5 % en tampó cacodilat 0,1 M, seguida d'una postfixació amb OsO₄. Aquests compostos resulten especialment efectius a pH fisiològic (pH = 7,4)

Un cop els òrgans van ser fixats, es van realitzar una sèrie de rentats amb tampó (tampó cacodilat 0,1 M i tampó fosfat) per a eliminar les restes de glutaraldèhid que poguessin interferir en l'acció de l'OsO₄.

Després del rentat s'inicia el procés de deshidratació per tal d'eliminar l'aigua, ja que en observacions a microscòpia electrònica la mostra serà posada en una camera de buit, i en cas que hi quedés aigua, les baixes pressions provocarien un procés d' "ebullició" que destruiria el teixit. Aquesta deshidratació es fa seguint una sèrie de rentats en banys d'alcohols de diferent grau. Finalment es fan dos rentats amb òxid de propilè, que ens permetrà que la resina penetri bé en el teixit (veure l'annex 9.3 de material i mètodes).

B. Inclusió

El medi utilitzat per al procés d'inclusió va ser l'Araldite. L'Araldite és una resina epoxílica de ponts transversals, insoluble en qualsevol solvent. Les barreges d'Araldite contenen quatre components, dos de minoritaris, que són:

- Dibutylftalat, actua com a plastificant i dona al material una textura més tova.
- Un derivat del fenol amb un grup amino, que actua com a accelerador i determina el grau de duresa. S'oxida i té una vida limitada.
- Els altres dos components són resina epoxílica i enduridor (un anhidrid de l'àcid dicarboxílic amb una cadena alifàtica lateral); són estables durant mesos a temperatura ambient.

El procediment complet del procés de fixació, deshidratació i inclusió de les mostres està esquematitzat en l'annex 8.1 de material i mètodes.

C. Microtomia i tinció

La microtomia, la tinció i l'observació de les mostres, tant per microscòpia òptica com electrònica, es va portar a terme en el Laboratori de Biologia de la Facultat de Veterinària (Universitat Autònoma de Barcelona).

Un cop inclosa la mostra en els blocs d'Araldite, aquests s'han de "preparar" per a ser tallats. Aquesta "preparació" consisteix a tallar un extrem del bloc en forma piramidal, de manera que la mostra quedi en el vèrtex de la piràmide. L'aparell utilitzat és un piramidòtom REICHTERT TM 60.

C.1. Talls semifins i tinció. Microscòpia òptica

Per a la realització dels talls semifins i ultrafins s'ha utilitzat l'ultramicrotom LKB NOVA, amb avanç tèrmic, i ganivetes de vidre obtingudes a partir de blocs de vidre LKB tallats en un aparell KnifeMaker 2178 LKB.

Els talls per microscòpia òptica que es van obtenir eren d'1 µm de gruix i van ser tenyits amb blau de toluidina a l'1 % en tampó Borax (pH=12) sobre una placa calefactora LKB 2208 multiplate (veure l'annex 9.4 de material i mètodes).

L'observació d'aquests talls es va fer en un microscopi OLYMPUS BH-2.

C.2. Talls ultrafins i tinció. Microscòpia electrònica de transmissió

A partir de les observacions a microscòpia òptica, es van seleccionar zones per a fer l'estudi ultraestructural. Els talls ultrafins es realitzen per a l'observació al microscopi electrònic de regions molt concretes d'una mostra. El mecanisme és, bàsicament, el mateix que per als talls semifins, encara que en aquest cas es fa una piràmide ("meseta") de dimensions molt més reduïdes de la regió que volem estudiar. Únicament es van escollir aquells talls que presentaven una coloració daurada o platejada per ser les que presenten un gruix adequat (60 a 150 nm) (Peachey, 1958) per a la seva utilització en el microscopi electrònic.

Aquests talls van ser posteriorment recollits per flotació en aigua bidestil·lada mitjançant reixetes-suport de coure de 3,05 mm de diàmetre G-200c (EBS).

El tinció utilitzat va ser el de citrat de plom durant 45 minuts en placa de Petri juntament amb lleties de NaOH per a evitar la formació de precipitats per reacció del CO₂ amb el plom, i posteriorment una sèrie de rentats amb aigua bidestil·lada per a treure l'excés de citrat de plom. Es va utilitzar la fórmula de Reynolds (1963) modificada (veure l'annex 9.5 de material i mètodes).

Les observacions van ser realitzades amb el microscopi electrònic de transmissió model HITACHI 7100 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

4.2.2.3. Microscòpia electrònica d'escànnig

Aquest estudi es va portar a terme únicament en la brànquia. La microscòpia electrònica d'escànnig permet l'estudi de la superfície de les mostres, i es pot fer una avaluació dels diferents tipus de lesió que apareixen.

El procediment esquematitzat de tot el procés de preparació de les mostres està inclòs en l'annex 9.6 de material i mètodes.

A. Fixació i deshidratació

Per a la fixació de les brànquies es va utilitzar formaldehid 4 % en tampó fosfat. La mida de les mostres no sobrepassava el centímetre de longitud.

Un cop fixades les mostres, van ser rentades amb tampó fosfat per a eliminar-ne les restes de fixador. Es van fer una sèrie de rentats de 15 minuts cada un, i un últim de 12-15 hores (tota la nit), i tots es van fer a 4 °C (nevera).

Després dels rentats es va iniciar el procés de deshidratació a fi d'eliminar l'aigua. Aquest procés es va portar a terme realitzant una sèrie de banys en concentracions creixents d'etanol. Finalment es van fer una sèrie de rentats amb acetat d'isoamil.

B. Punt crític

Aquest procés permet l'eliminació total de les restes de líquid que puguin restar a nivell intracel·lular i extracel·lular, modificant mínimament l'estructura cel·lular.

El punt crític d'un líquid és aquella combinació de temperatura i pressió en què la interfase líquid/gas desapareix. Aquest procés es va realitzar amb un equip Polaron en el qual l'acetat d'isoamil va ser substituït per diòxid de carboni (CO₂) líquid; posteriorment es va augmentar la temperatura i la pressió del CO₂ fins al seu punt crític, passant d'estat líquid a gas i deixant la mostra totalment dessecada.

C. Metal·litzat

Aquest tractament es realitza per a augmentar la resolució en observar pel microscopi electrònic d'escànnig, i evita l'anomenat efecte de càrrega (canvis electrostàtics alts) que es produeixen en les mostres quan aquestes no estan metal·litzades i s'utilitzen alts voltatges.

El procés consisteix a recobrir la mostra amb una fina capa d'or, material conductiu. Es va portar a terme amb un metal·litzador model Polaron Equipment limited, SEM coating unit E-5000 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Les observacions van ser realitzades amb el microscopi electrònic d'escànnig model HITACHI S-570 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

4.3. RESULTATS

4.3.1. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC DE LA TRUITA IRISADA (*Oncorhynchus mykiss*):

L'estudi histològic a microscopi òptic i electrònic de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) després d'una exposició de 30 dies a una concentració subcrònica dels suavitzants DSDMAC i DAAIMS emulsionats i microemulsionats, ens mostra l'existència de canvis histològics en els òrgans estudiats (brànquia i fetge). Tanmateix, aquests canvis han estat similars en els quatre tractaments estudiats.

4.3.1.1. Histopatologia de la Brànquia

L'estudi a microscòpia òptica de les brànquies dels animals tractats (FIGURA 32) ens mostra que l'epiteli de la majoria dels peixos examinats (entre un 60 i un 70 % dels peixos exposats als 4 suavitzants) presenta una apariència esponjosa, en comparació amb el dels animals control (FIGURA 32a i 32b); aquest aspecte sembla estar provocat per l'engrandiment dels espais limfoides, que en el filament es tradueix en una laxitud del teixit (FIGURA 32c i 32d). En les lamel·les aquesta esponjositat és causada per la separació de les dues capes epitelials (FIGURA 32e i 32f).

Aquest augment dels espais limfoides es reflexa a microscopia electrònica d'escanning (SEM) en la gran irregularitat que presenta la superfície branquial (FIGURA 33).

És de remarcar la gran infiltració de macròfags i granulòcits neutròfils que té lloc en aquests espais limfoides engrandits, tant en els de l'epiteli del filament com en els de les lamel·les (FIGURA 34a). Els macròfags, amb un gran nucli rodó, presenten en el seu citoplasma gran quantitat de productes derivats de la degeneració cel·lular, com són cossos mielínics i lisosomes secundaris (FIGURA 34b). Els granulòcits neutròfils es caracteritzen ultraestructuralment per presentar un nucli multilobulat i gran quantitat de petits grànuls electrodensos en el seu citoplasma (FIGURA 34c).

En relació a la distribució de les cèl·lules granulars no s'han observat diferències entre els

animals control i els animals sotmesos a tractament. Aquestes cèl·lules es troben normalment en el sinus venós central (FIGURA 32a, 32b). Ocasionalment també els podem trobar en els espais limfoides en la zona aferent de l'epiteli del filament.

D'altra banda, l'estudi a microscòpia òptica ens mostra la presència de fusions entre lamel·les (FIGURA 35a, 35b), les quals afecten a un 40-50 % de les lamel·les estudiades dels animals sotmesos a tractament, i es produeixen sobretot entre aquelles que estan situades en la zona mitjana i distal dels filaments. Les fusions es donen entre els extrems apicals de dues o tres lamel·les (FIGURA 35c, 35d). En la zona de fusió, es pot observar que l'epiteli s'ha reorganitzat completament, tanmateix el sistema vascular de les lamel·les implicades està totalment individualitzat (FIGURA 35c).

En la superfície de l'epiteli del filament es manifesten canvis en les cèl·lules pavimentàries. Els plegaments apicals d'aquestes cèl·lules, que creen el característic sistema de microsolcs i formen un peculiar dibuix (FIGURA 36a i 36b), es veuen notablement alterats després dels tractaments (FIGURA 36c, 36d i 36e), sent poc evidents i en alguns casos pràcticament inapreciables.

Entre les cèl·lules pavimentàries es troben les cèl·lules mucoses, que es reconeixen fàcilment per la seva petita obertura i la massa de moc que es mostra adherida a aquesta. En els animals control aquestes cèl·lules són poc nombroses (FIGURA 36a, 36b). Tanmateix, després del tractament el seu nombre augmenta considerablement (FIGURA 36c, 36d i 36e).

L'altre tipus cel·lular que també es localitza entre les cèl·lules pavimentàries són les cèl·lules de clorur, les quals es poden diferenciar de les anteriors per presentar microvellositats en la zona de contacte amb l'exterior (FIGURA 37a i 37c). En els animals tractats les microvellositats apicals d'aquestes cèl·lules mostren una reducció del seu nombre i de la seva longitud (FIGURA 37b i 37d). També s'observa un augment en el seu nombre, especialment en les lamel·les (FIGURA 38a), presentant la majoria d'elles una forma més arrodonida que les presents en les lamel·les dels animals control (FIGURA 38b i 38c).

Ultraestructuralment algunes cèl·lules de clorur mostren signes clars de degeneració. A

diferència de les cèl·lules de clorur típiques (FIGURA 39a), aquestes presenten característiques de disfunció cel·lular, com són un nucli picnòtic, un citoplasma molt electrodens i mitocondris molt inflats, amb pèrdua de les seves crestes mitocondrials (FIGURA 39b). En altres cèl·lules, si bé la seva aparença no es veu greument alterada, s'observen alteracions en l'estructura dels mitocondris, trobant-se mitocondris amb formes rares (d'anell, de copa, de Y) (FIGURA 39c, 39d), i exhibint crestes mitocondrials amb una orientació oblícua a l'eix longitudinal de l'orgànul. Moltes d'aquestes cèl·lules també presenten cossos mielínics (FIGURA 39e).

FIGURA 32: HISTOLOGIA DE LA BRÀNQUIA
 Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

- a. Filament branquial sencer d'animal control (ef: epiteli del filament; l: lamel·la; svc: sinus venós central; aa: artèria aferent; ae: artèria eferent). (x 230). Araldite. Blau de Toluidina.
- b. Filament branquial sencer d'animal tractat durant 30 dies amb DSDMAC emulsionat (ef: epiteli del filament; l: lamel·la; svc: sinus venós central; aa: artèria aferent; ae: artèria eferent). (x 210). Araldite. Blau de Toluidina.
- c. Epiteli de la zona eferent d'un animal control (x 1100). Araldite. Blau de Toluidina
- d. Epiteli del filament d'animal tractat durant 30 dies amb DSDMAC microemulsionat. Observis l'aspecte esponjós d'aquest epiteli a causa de l'augment dels espais limfoides (□) (x 1060). Araldite. Blau de Toluidina.
- e. Lamel·les branquials (L) d'animal control (ele: epiteli lamel·lar extern; eli: epiteli lamel·lar intern). (x 530). Araldite. Blau de Toluidina.
- f. Lamel·les branquials (L) d'animal tractat durant 30 dies amb DAAIMS emulsionat. Observis la separació dels dos epitelis (ele: epiteli lamel·lar extern; eli: epiteli lamel·lar intern). (x 660). Araldite. Blau de Toluidina.

FIGURA 32

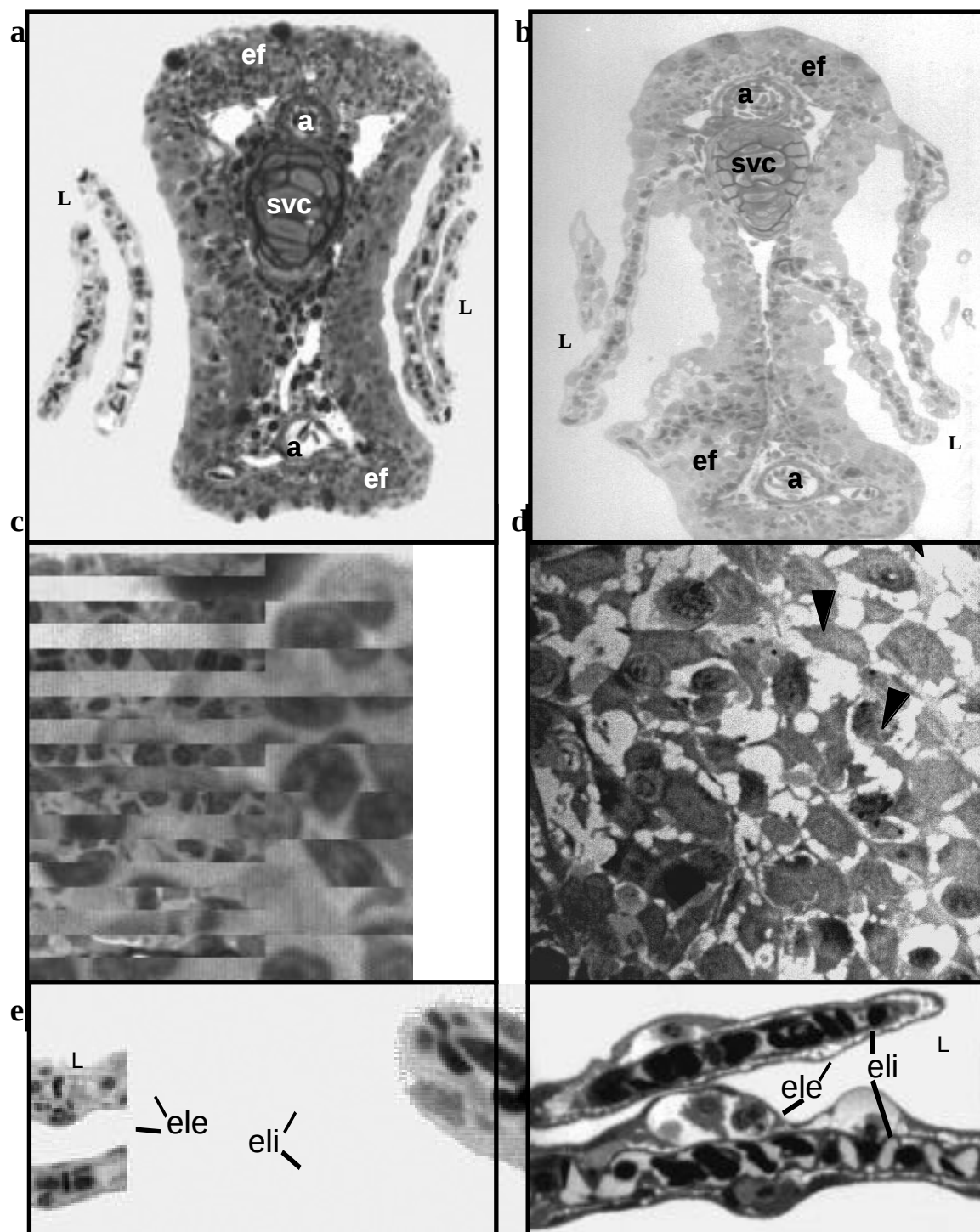


FIGURA 33: HISTOLOGIA DE LA BRÀNQUIA

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

- a. Micrografia electrònica d'un filament branquial d'animal control. Observi's la disposició de les lamel·les sobre el filament (x 270). Microscòpia electrònica d'escànnig.
- b. Micrografia electrònica de lamel·la d'animal tractat amb DSDMAC microemulsionat. Observi's la irregularitat de la superfície de les lamel·les (x530). Microscòpia electrònica d'escànnig.

FIGURA 33

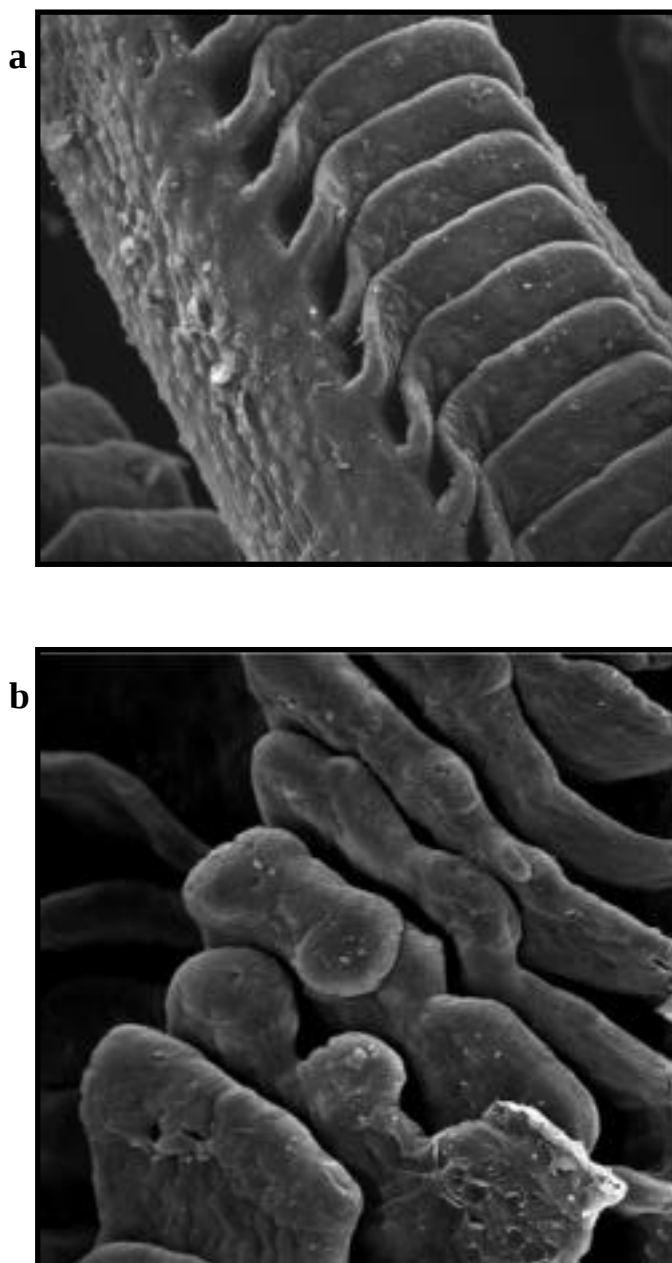


FIGURA 34: HISTOLOGIA DE LA BRÀNQUIA

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

- a. Lamel·les branquials d'animal tractat amb DAAIMS emulsionat. Observi's la gran infiltració de macròfags (M) en els espais limfoïdes lamel·lars (el) (x 940). Araldite. Blau de Toluidina.
- b. Micrografia electrònica de l'epiteli lamel·lar d'animal tractat amb DAAIMS emulsionat. En l'espai limfoïdes de les lamel·les s'observa infiltració de macròfags (M) amb productes derivats de degeneració cel·lular (cm: cossos mielínics, f: fagosomes; N: nucli) (x 5000). Microscòpia electrònica de transmissió.
- c. Micrografia electrònica de l'epiteli del filament d'animal tractat amb DSDMAC emulsionat. Observi's la infiltració de granulòcits neutròfils (n) en els espais limfoïdes. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per presentar un nucli multilobulat i un gran nombre de petits grànuls electrodensos (x 3900). Microscòpia electrònica de transmissió.

FIGURA 34

