

FIGURA 41: HISTOLOGIA DEL FETGE

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

Observació a Microscopia Electrònica de Transmissió (MET) de les cisternes del reticle endoplasmàtic rugós (RER) d'hepatòcits de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) control i després del tractament.

- a. RER d'un hepatòcit d'animal control. Observi's la disposició paral·lela de les cisternes (RER), i la distribució regular dels ribosomes adossats a la seva membrana (m: mitocondris). (x 37000).
- b. RER d'un hepatòcit d'animal tractat amb DSDMAC microemulsionat. És de destacar la disposició més desordenada de les cisternes (RER), així com la dilatació d'aquestes. També es pot observar com els ribosomes no es troben distribuïts uniformement sobre la seva membrana (m: mitocondris). (x 31000).
- c. RER d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS emulsionat. La dilatació i vesiculació de les cisternes és més pronunciada (RER). La membrana de les cisternes sembla estar lliure de ribosomes (m: mitocondris; N: nucli; gl: gota lipídica). (x 2600).
- d. RER d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS microemulsionat. El reticle està totalment vesiculat i lliure de ribosomes (RER) (m: mitocondri; N: nucli). (x9300)

FIGURA 41:

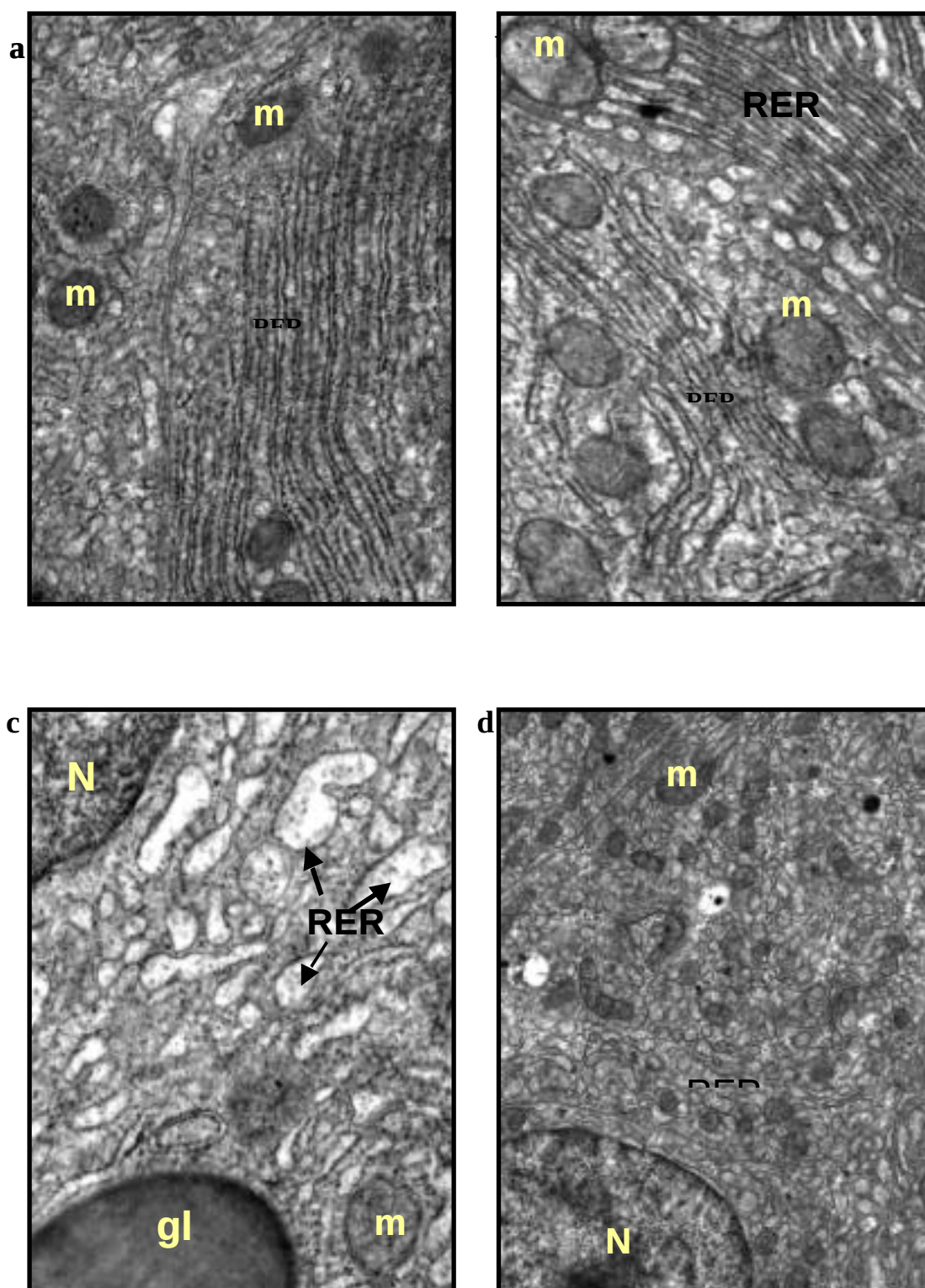


FIGURA 42: HISTOLOGIA DEL FETGE

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

Observació a Microscopia Electrònica de Transmissió (MET) del reticle endoplasmàtic rugós (RER) d'hepatòcits de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) després del tractament.

- a. Hepatòcits d'animal tractat control (N: nucli; m: mitocondis; RER: reticle endoplasmàtic rugós). (x 9200).
- b. Hepatòcits d'animal tractat amb DAAIMS emulsionat. Gran desorganització del RER, presentant les seves cisternes anastomosades entre elles (N: nucli; gl: gotes lipídiques). (x 4500).
- c. Detall d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS. Observi's la formació d'estructures en forma d'anell, degudes a l'anastomosament de les cisternes del RER.(x 6800).
- d. Hepatòcits d'animals tractats amb DSDMAC microemulsionat. Observi's la presència de cossos multivesiculats (cv) en el citoplasma d'aquests hepatòcits. (x11700).

FIGURA 42:

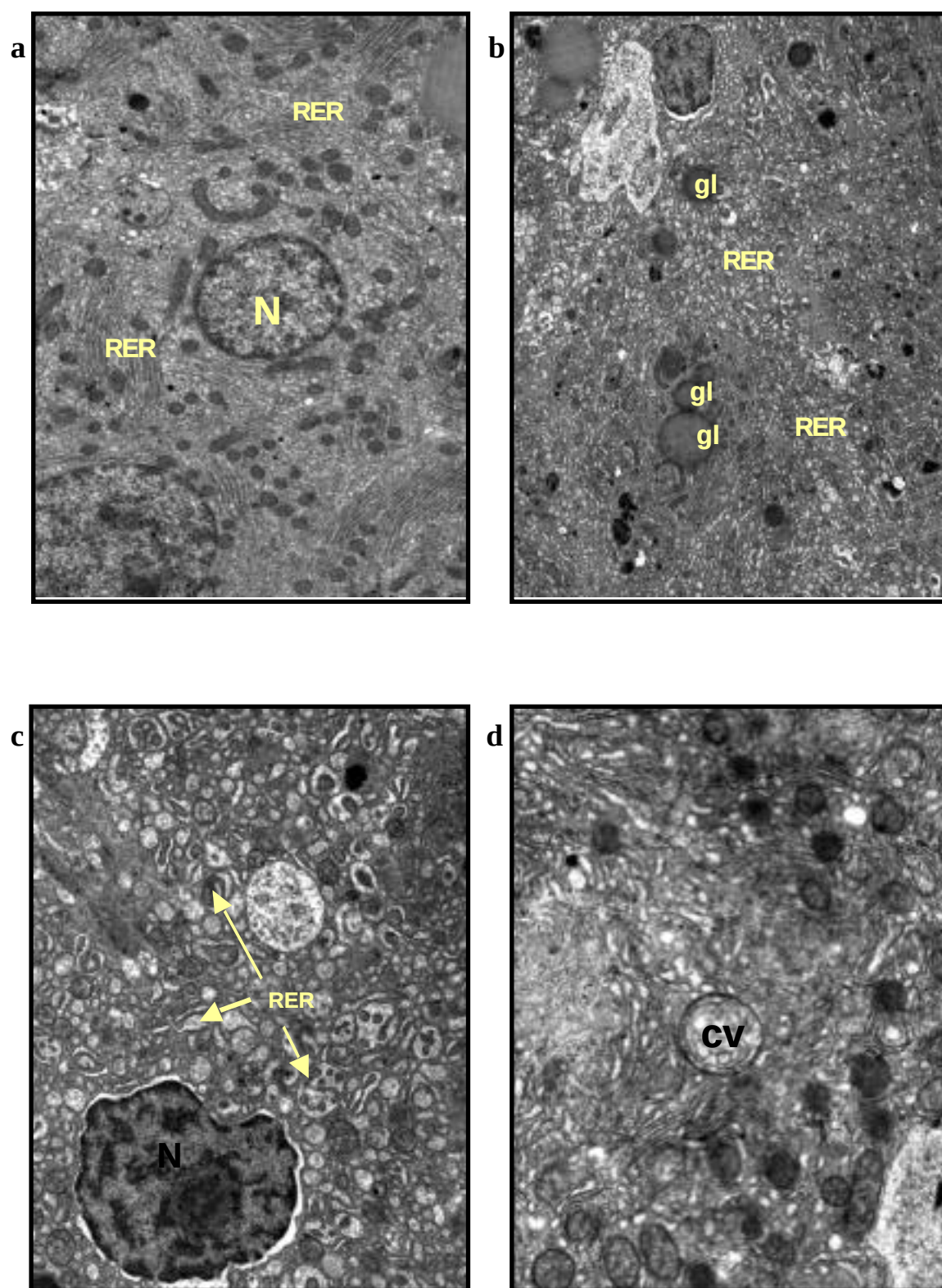


FIGURA 43: HISTOLOGIA DEL FETGE

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

Observació a Microscopia Electrònica de Transmissió dels mitocondris dels hepatòcits de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) després del tractament.

- a. Mitocondris d'un hepatòcit d'animal control. Observi's com els mitocondris (m) presenten una matriu electrodensa i una disposició ordenada de les seves crestes (RER: reticle endoplasmàtic rugós; N: nucli). (x 28500).
- b. Mitocondris d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS emulsionat. Observi's que els mitocondris (m) no presenten una matriu electrodensa però les seves crestes no mostren indicis de desorganització. Les cisternes del RER exhibeixen una dilatació i vesiculació més accentuada, amb perdua quasi bé total de ribosomes. (x 29300).
- c. Mitocondris d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS microemulsionat. Els seus mitocondris (m) presenten una gran dilatació, quasi bé han perdut les seves crestes mitocondrials, i s'observa la formació de cossos mielínics (cm) en el seu interior. (x 22800).
- d. Mitocondris d'un hepatòcit d'animal tractat amb DAAIMS microemulsionat. La desorganització mitocondrial gaire bé és total. La seva matriu és translúcida; s'observa fusió mitocondrial, perdua total de crestes i formació de cossos mielínics en el seu interior. (x 14700).

FIGURA 43:

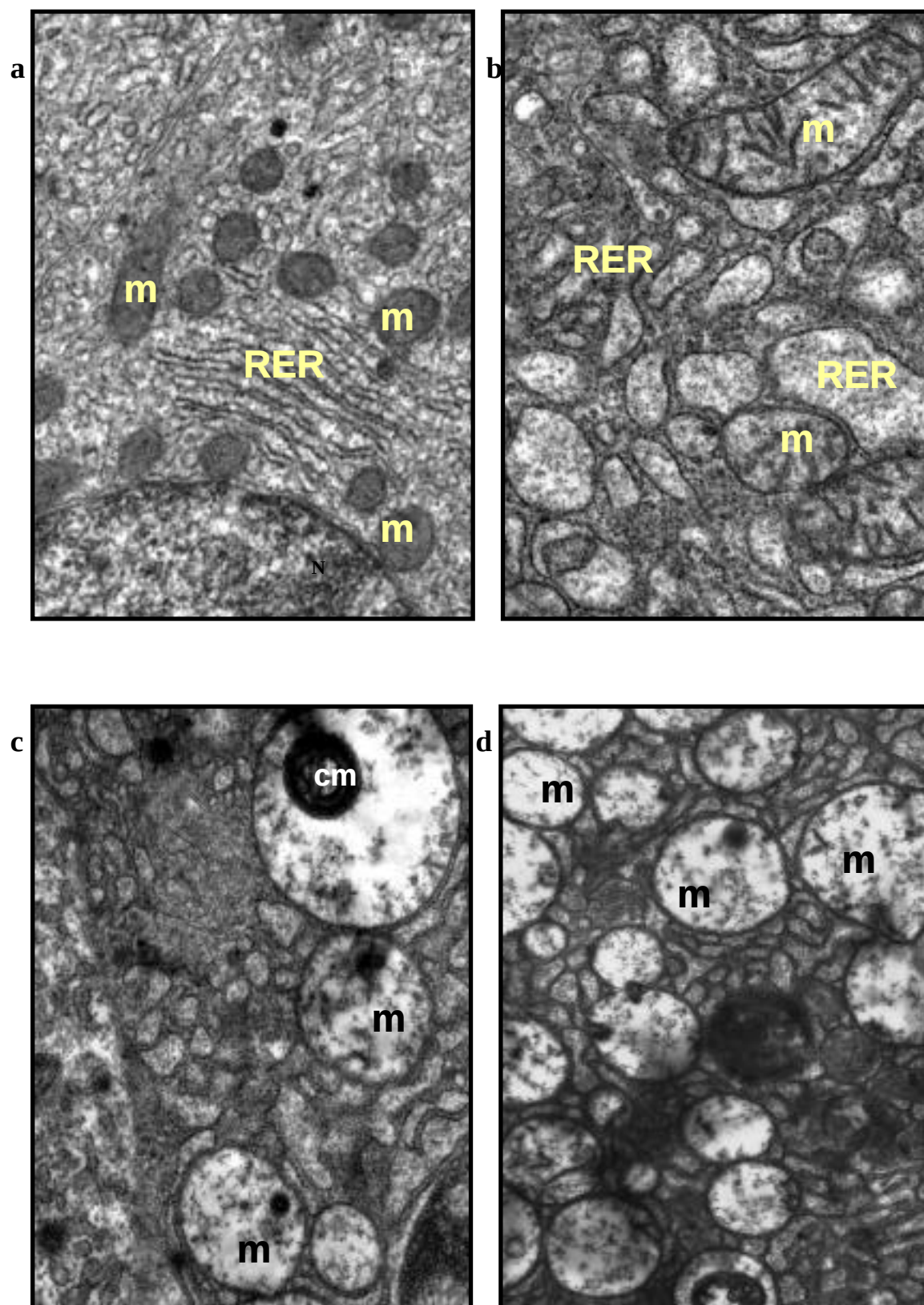


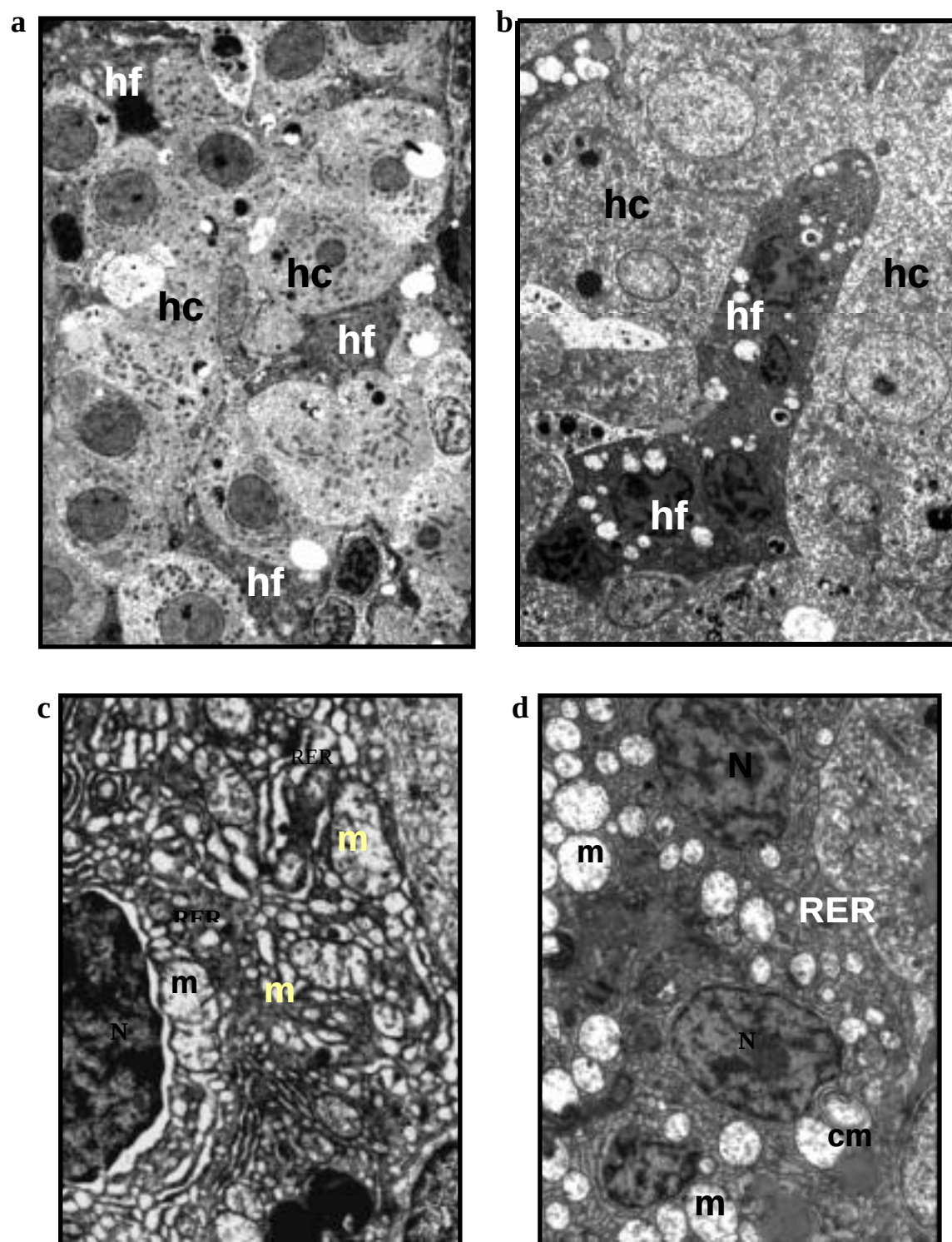
FIGURA 44: HISTOLOGIA DEL FETGE

Truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)

Observació a Microscopia Electrònica de Transmissió del fetge de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*). Cèl·lules fosques.

- a. Micrografia electrònica de fetge d'un animal tractat amb DSDMAC emulsionat on es poden observar algunes cèl·lules fosques (hf) entremig d'hepatòcits normals (hc). (x2250).
- b. Detall de cèl·lules fosques (hf) d'un animal tractat amb DSDMAC microemulsionat. Es poden distingir cinc aquestes cèl·lules juntes. Els altres hepatòcits presenten un RER vesiculat però no dilatat. (x 2850).
- c i d. Detall de RER i mitocondris de cèl·lules fosques d'animals tractat amb DSDMAC emulsionat (x15300) i DAAIMS microemulsionat (x 5000) respectivament. Observi's les cisternes del RER altament dilatades (RER), amb un contingut translúcid, els mitocondris molt inflats (m), amb pèrdua de la seva integritat mitocondrial, i el nucli contraïgut (N).

FIGURA 44:



4.4. DISCUSSIÓ

4.4.1. Brànquia

L'augment dels espais limfoides i la separació de les dues capes epitelials lamel·lars han estat les alteracions branquials més evidents en els animals sotmesos als tractaments amb els suavitzants (DSDMAC i DAAIMS) emulsionats i microemulsionats a 30 dies. Aquests tipus d'alteració ha estat descrit anteriorment per diversos autors com a resposta a diferents tipus de contaminants tòxics (Playle i altres, 1989; Tietge i altres, 1988; Wood, 1989; Conklin i altres, 1992; Nowak, 1992; Jonsson i Toledo, 1993; Klontz, 1995; Randi i altres, 1996; Dutta i altres, 1997; Hemalatha i Banerjee, 1997; Pfeiffer i altres, 1997; Szakolczai, 1997) entre ells en tensioactius (Abel i Skidmore, 1975; Misra i altres, 1985; Byrne i altres, 1989; Brusle, 1991; Umezu, 1991; Wayusuwanwit i Kawatsu, 1995). Aquest augment dels espais limfoides probablement és degut a l'influx d'aigua causat per l'augment de la porositat en la membrana, com també ja van constatar en truita irisada Byrne i altres (1989) després d'una exposició amb un tensioactiu catiónic. D'altra banda, Morgan i Tovell (1973) i Dutta i altres (1997) van suggerir que la separació dels dos epitelis lamel·lars era una reacció no específica a gran varietat de compostos tòxics, i podria actuar com un mecanisme de defensa en incrementar la distància de difusió entre l'aigua i la sang; no obstant això, aquesta resposta tindria lloc a expenses de l'eficàcia respiratòria de l'animal en disminuir la superfície branquial responsable de l'intercanvi de gasos, fet també constatat per altres autors, els quals observen una disfunció respiratòria i de l'osmoregulació associades a estrès agut i crònic produït per diferents agents tòxics (Playle i altres, 1989; Tietge i altres, 1988; Wood, 1989; Conklin i altres, 1992; Nowak, 1992; Klontz, 1995; Wayusuwanwit i Kawatsu, 1995; Randi i altres, 1996; Dutta i altres, 1997; Hemalatha i Banerjee, 1997; Pfeiffer i altres, 1997; Szakolczai, 1997; Pawert i altres, 1998).

La fusió lamel·lar també és una de les alteracions que s'ha trobat en la majoria del peixos tractats. Aquesta lesió és també molt inespecífica, ja que s'ha observat com a resposta a gran nombre de contaminants: pesticides (Jonsson i Toledo, 1993; Pfeiffer i altres, 1997), petroli (Engelhardt i altres, 1981; Onwumere i Oladimeji, 1990), metalls pesants (Gupta i Rajbanshi, 1995; Oliveira i altres, 1996; Pandey i altres, 1993; Randi i altres, 1996; Hemalatha i Banerjee, 1997), efluents industrials (Couillard i altres, 1988; Temmick i altres, 1989), organohalogenats (Wester i altres, 1988) i tensioactius (Misra i altres, 1985; Byrne i altres, 1989; Wayusuwanwit i Kawatsu, 1995). Aquesta és una lesió que, com la separació epitelial, també està considerada com una mesura protectora ja que contribueix a disminuir la superfície branquial vulnerable als contaminants (Mallat, 1985; Richmonds i Dutta, 1989). Tanmateix, aquesta lesió en casos extrems en els quals la fusió lamel·lar és generalitzada a tot el filament, té un efecte negatiu sobre la respiració ja que no només redueix l'entrada del tòxic sinó que

també disminueix la superfície amb funció respiratòria (Leino i altres, 1987a; 1987b). En afectar a la zona apical de les lamel·les, on està situat el canal marginal, la respiració i l'intercanvi de gasos encara es veuen més alterats (Conklin i altres, 1992). No obstant això, en el nostre cas no sembla que les estructures vasculars distals de les lamel·les fusionades es vegin alterades, fet que ens fa pensar que no influeix seriosament en la funció respiratòria dels animals afectats.

Si bé en alguns casos la fusió lamel·lar ha estat associada a una hiperplàsia de l'epiteli branquial (Misra i altres, 1985; Couillard i altres, 1988; Wester i altres, 1988; Temmink i altres, 1989; Black i McCarthy, 1990; Nowak, 1992; Randi i altres, 1996) o de les lamel·les (Temmink i altres, 1983; Conklin i altres 1992; Bingsheng i altres, 1994; Wayusuwanwit i Kawatsu, 1995), en els animals sotmesos a tractament no s'ha observat aquests tipus d'alteracions. Ferguson (1989) va assenyalar que les fusions podien ser causades per la projecció de processos citoplasmàtics de les cèl·lules epitelials cap a les lamel·les adjacents. Alguns contaminants, com els metalls pesants, poden alterar la càrrega de les glicoproteïnes presents en el moc que cobreix les lamel·les, fet que afectaria a la càrrega negativa de l'epiteli i afavoriria l'atracció de cèl·lules de lamel·les adjacents (Daoust i altres, 1984; Fischer-Scherl i Hoffmann, 1988). Aquest fet també el va constatar Byrne i altres (1989) amb l'exposició de la truita irisada a un tensioactiu catiònic.

La presència de macròfags i de neutròfils en els espais limfoides engrandits de les lamel·les i de l'epiteli del filament dels animals tractats, podria fer pensar en una resposta de tipus inflamatori (Skidmore i Tovell, 1972; Abel, 1974; Abel i Skidmore, 1975; Walters i Plumb, 1980; Segers i altres, 1984; Albassam i altres, 1987; Ferguson, 1989; Balm i Pottinger, 1993; Jonsson i Toledo, 1993; Kent i altres, 1995; Noya i altres, 1995; Randi i altres, 1996). En aquest sentit Skidmore i Tovell (1972) en tensioactius i també, més recentment, Kent i altres (1995) i Pandey i altres (1993) van proposar que la separació de l'epiteli lamel·lar tal com nosaltres l'hem observat, era el resultat de la infiltració d'un exudat sanguini a l'epiteli, fet que provocaria l'aparició d'un edema.

La infiltració de neutròfils en teixits o el seu increment en sang és el principal indicador d'inflamació aguda (Ferguson, 1989; Borrell i altres, 1992). Finn i Nielsen (1971) van observar en experiments *in vivo* en truita irisada que les primeres cèl·lules que migren com a resposta a inflamació eren els neutròfils, i el segon tipus els monòcits/macròfags, similar al que passa en mamífers, amb la única diferència de que en peixos el nombre de cèl·lules infiltrades era menor i el temps necessari per resoldre la lesió era més llarg. Suzuki (1984) també va observar aquesta diferència entre peixos i mamífers. L'activitat fagocítica dels neutròfils de tots els peixos no està molt clara (Ellis, 1977), encara que en salmònids si que

sembla establerta (Finn i Nielson, 1971; Griffin, 1983, Suzuki, 1984).

Alguns autors (Griffin, 1984; McArthur i altres, 1985), en proves *in vitro*, han demostrat en els peixos que els macròfags i els neutròfils són les cèl·lules que presenten activitat quimiotàctica. Les cèl·lules fagocítiques són atretes per varis tipus de substàncies, tant emeses per el causant de la lesió com les ja presents en el sèrum de l'animal. També s'ha observat la presència de factors de defensa no específics en el moc de l'epidermis, de les brànquies i del tracte intestinal (Thuvander, 1990; Anderson i Zeeman, 1995), detectant-se lisozim i sistema del complement. Això és molt important ja que la presència d'aquests factors en el moc faria que aquest no únicament tingués una funció física protectora de la brànquia sinó que també intervindria en la resposta immunològica de l'animal.

Els efectes tòxics dels contaminants liposolubles, com són els tensioactius, poden ser causats per la seva capacitat de dissoldre i alterar la integritat de les membranes cel·lulars a altes concentracions, i pot afectar a la permeabilitat d'aquestes a concentracions baixes permetent l'entrada d'aigua tant a nivell cel·lular com d'espais limfoides (Abel, 1974; Nuwayhid i altres, 1980; Byrne i altres, 1989; Umezsu, 1991; Ribelles i altres, 1995). Partearroyo i altres (1991) van observar que l'acció dels tensioactius afectava a la capacitat de transferència difusional de l'aigua i de l'urea a través de la membrana de les cèl·lules epitelials de la brànquia de la truita irisada. Així doncs, la degeneració hidròpica i l'espongosi de l'epiteli lamel·lar i del filament probablement seria provocada per l'influx d'aigua degut a l'augment de la porositat de la membrana.

A nivell de superfície branquial s'ha observat una pèrdua del dibuix del sistema de microsolcs de les cèl·lules pavimentàries dels epitelis del filament i lamel·les. En un treball sobre el comportament de tensioactius en bicapa lipídica i membranes cel·lulars Helenius i Simons (1975) van observar que els tensioactius provocaven un augment de la flexibilitat, causant un efecte d'estirament en aquestes.

Aquestes alteracions podrien provocar una reducció de la superfície responsable de l'intercanvi de gasos, i una pèrdua de suport per a la capa de moc (Jagoe i altres, 1993). Això també ho van observar Abel i Skidmore (1975) i Bryne i altres, (1989) en brànquies de truita irisada exposades a tensioactius aniònics i catiònics respectivament, suposant que aquests canvis podrien estar afectant a la respiració i també a altres sistemes enzimàtics intracel·lulars.

La membrana basal de les lamel·les no sembla estar alterada possiblement a causa de que està formada majoritàriament per mucopolisacàrids, i al estar associada íntimament amb fibres de col·lagen (Laurent, 1984). Al tenir pocs lípids en la seva composició, hi ha pocs llocs on els

radicals lliures dels tensioactius es puguin unir (Helenius i Simons, 1975). El fet que es mantingui la làmina basal intacta pot ajudar a mantenir la integritat estructural de la xarxa de cèl·lules pilars a pesar del deteriorament de l'epiteli lamel·lar (Byrne i altres 1989).

Les cèl·lules mucoses són un altre dels tipus cel·lular que presenten alteracions. Després dels tractaments el seu nombre ha augmentat com també el d'aquelles que han descarregat el seu contingut al medi extern. Això fa pensar en una possible hipersecreció de moc. L'augment de la secreció de moc pot ser causat per un increment en el nombre de cèl·lules mucoses o bé que l'activitat de les cèl·lules presents hagi incrementat.

La secreció de moc és una de les respostes més comunes dels animals aquàtics als contaminants (Mallatt, 1985). La seva funció en la brànquia no es coneix totalment. La presència de moc s'ha considerat com una mesura protectora de l'epiteli contra l'abrasió mecànica produïda per materials en suspensió (Mesegner i altres, 1981; Amores i altres, 1984); com a prevenció a infeccions a causa de les seves propietats antisèptiques (Kennedy-Stoskopt, 1993); com a regulador de la permeabilitat branquial al controlar el gruix de a distància de difusió de gasos (Laurent, 1984; Laurent i Habibi, 1989; McDonald i altres, 1991); i en la formació de la bola alimentària (Hoogenboezen i Van der Boogaart, 1993; Sanderson i altres, 1996). També ha estat relacionat amb la regulació iònica d'espècies eurihalines en la seva adaptació a medi dolçaquícola (Laurent i Hebibi, 1989) i, com ja s'ha comentat abans, amb la resposta immunològica degut a la presència de factors de defensa no específics en ell (Thuvander, 1990; Anderson i Zeeman, 1995).

La hipersecreció mucosa s'ha descrit en condicions d'estrès com poden ser l'exposició a diferents contaminants: efluents industrials (Lichtenfels i altres, 1996; Thiyagarajah i altres, 1996; Teh i altres, 1997; Pawert i altres, 1998) metalls pesants (Jagoe i altres, 1993; Sola i altres, 1995; Randi i altres, 1996; Alazemi i altres, 1996; Coello i Khan, 1996), pesticides (Richmonds i Dutta, 1989; Marlasca i Crespo, 1992; Dutta i altres, 1997; Pfeiffer i altres, 1997), tensioactius (Misra i altres, 1985), amoni (Lang i altres, 1987) sals (Wester i altres, 1988; Prasad, 1994; Prasad i altres, 1995; Pandey i altres, 1993) clor (Black i McCarthy, 1990). En presència de metalls pesants, les càrregues negatives de la mucina atraparien els cations metàl·lics impedingent que aquests travessin l'epiteli branquial (Lock i van Overbeeke, 1981; Pärt i Lock, 1983; Fischer-Scherl i Hoffmann, 1988). De la mateixa manera, ens pot fer pensar que el moc s'uneix a la càrrega positiva que presenten els tensioactius catiónics, de forma que el moc actuaria com a una barrera protectora interferint en l'acció biològica dels tensioactius sobre les membranes cel·lulars.

Un dels tipus cel·lulars més afectat en la brànquia és el de les cèl·lules de clorur. Les alteracions observades són importants degut a les implicacions fisiològiques que poden comportar a l'animal ja que aquestes cèl·lules estan relacionades amb la regulació iònica i amb l'equilibri àcid-base en espècies d'aigua dolça (Zadunaisky, 1996).

L'augment del nombre de cèl·lules de clorur, especialment en la lamel·la, així com l'arrodoniment de les cèl·lules i l'increment de la seva àrea superficial apical observat en els animals tractats, han estat considerats per varis autors com a una resposta a variacions iòniques de l'aigua, tant per canvis en salinitat com en duresa de l'aigua o pH (Gaino i altres, 1984; Leino i altres, 1984; Laurent i altres, 1985; Perry i Wood, 1985; Avella i altres, 1987; Leino i altres, 1987a, 1987b; Fisher-Schert i Hoffmann, 1988; Laurent i Habibi, 1989; Cioni i altres, 1991; McDonald i altres, 1991; Goss i altres, 1992; Perry i Goss, 1994; Pisam i altres, 1995; Lee i altres, 1996; Perry i altres, 1996; Haaparanta i altres, 1997; Vanderheijden i altres, 1997; Fernandes i altres, 1998; Goss i altres, 1998; Kelly i Woo, 1999). Tant l'augment del seu nombre com els canvis en la seva morfologia s'han explicat com una resposta adaptativa provocada per la pèrdua passiva de ions Na^+ i Cl^- pel fet que l'animal està en un medi hipotònic; al augmentar el nombre de cèl·lules de clorur també augmenta l'influx actiu de ions, proporcionant un mecanisme compensador per a aquest eflux iònic (Leino i altres, 1987a, 1987b; Greco i altres, 1996; Goss i altres, 1998).

També s'han descrit alteracions similars per la presència de contaminants en el medi: nitrats (Gaino i altres, 1984), metalls pesants (Sola i altres, 1995; Jagoe i altres, 1996a, 1996b; Jagoe i Haines, 1997), pesticides (Dutta i altres, 1996) i efluents industrials (Thiyagarajah i altres, 1996)

Durant l'assaig, les membranes de les cèl·lules de clorur, a l'igual que la de les cèl·lules pavimentàries, estan sotmeses a l'acció dels suavitzants. Els detergents iònics poden desnaturalitzar proteïnes, incloses aquelles que estan associades a la membrana cel·lular (Abel, 1974; Helenius i Simons, 1975; Ribelles i altres, 1995). Partearroyo i altres (1991) van observar l'acció lítica dels tensioactius en les membranes epitelials branquials de la truita irisada, alliberant proteïnes i solubilitzant fosfolípids. Es d'esperar doncs que els tensioactius puguin alterar el funcionament dels enzims responsables de l'equilibri iònic, les ATPases, les quals són grans proteïnes incloses en la membrana, i que presenten una funció important en el manteniment del gradient electroquímic a través de la membrana cel·lular de les cèl·lules de clorur i en la captura activa de Na^+ i Cl^- .

Gaino i altres (1984) i Jagoe i Haines (1997) van trobar que la presència de diferents contaminants en el medi provoca l'aparició de cèl·lules de clorur globuloses i sobresortints, de manera que augmentaven la seva superfície de contacte amb l'exterior, i per tant podien absorbir una proporció més elevada d'electrolits dissolts. Consideraven a aquestes cèl·lules

hipertròfiques, i com a una resposta d'hiperactivitat cel·lular per a poder mantenir els nivells de Cl^- fisiològic. Perry i Wood (1985) i Avella i altres (1987) també relacionaven l'aparició de cèl·lules actives a una deficiència iònica, de manera que augmentaven la capacitat de bombeig de Na^+ i de captar Ca^{2+} .

L'augment de la superfície de contacte de les cèl·lules de clorur s'ha descrit en animals amb alteracions en l'equilibri àcid-base (Goss i altres, 1992; Bindon i altres, 1994; Perry i Goss, 1994; Perry, 1997; Goss i altres, 1998). També s'han descrit variacions en la mida i el nombre de les microvellositats apicals d'aquestes cèl·lules per canvis en la salinitat (Bartels i altres, 1996; Lee i altres, 1996) i presència d'agents tòxics (Gaino i altres, 1984; Justesen i altres, 1993).

La funció de les microvellositats és la d'augmentar la superfície de contacte amb el medi extern per a facilitar l'intercanvi iònic (Leino i McCormick, 1984; Lubin i altres, 1991; Justesen i altres 1993). En el nostre estudi, ha augmentat la superfície de contacte amb l'exterior i s'ha reduït la longitud de les microvellositats. S'ha suggerit que la pèrdua de les microvellositats seria un mecanisme compensatori a l'augment de la superfície de contacte, tant per hipertròfia cel·lular (Gaino i altres, 1984) com per retracció de les cèl·lules pavimentàries adjacents (Bartels i altres, 1996). Donat que la sortida de ions és molt alta en truita, qualsevol situació que acceleri la pèrdua iònica ve acompanyada per una proliferació de cèl·lules de clorur (Perry, 1997), tal com hem vist en el nostre estudi.

La presència de cèl·lules de clorur amb el citoplasma molt electrodens està relacionat amb el fenomen de cèl·lules clares-cèl·lules fosques. Aquest fenomen ha estat molt discutit en el seu origen i apareix tant en teixits normals com en patològics (Ghadially, 1997). A l'igual que en altres estudis, en el present treball no solament s'han detectat en les cèl·lules de clorur de la brànquia (Crespo i Sala, 1986b; Balm i Pottinger, 1993), sinó també en els hepatòcits del fetge (Ferrer i altres, 1982; Mosconi-Bac, 1991; Marlasca i altres, 1992, 1998).

S'han postulat diverses hipòtesis sobre la seva aparició ja que es detecten tant en animals sans com en malalts. S'han interpretat com (1) un canvi patològic motivat per agents tòxics (Wood, 1965; Cheville, 1994; Ghadially, 1997), (2) a deficiències en l'estat de hidratació o funcional de la cèl·lula (Conte i Lin, 1967; Meseguer i altres, 1981; Crespo i Sala, 1986b; Ghadially, 1997), (3) a un artefacte de la fixació (Ghadially, 1997), o (4) apoptosi cel·lular (Bodamer i Murchelano, 1990; Balm i Pottinger, 1993; Majno i Jons, 1996).

En el cas del fetge, una fixació dolenta podria ser la causa de la seva aparició, ja que el parènquima hepàtic és molt compacte, sent difícil el pas del fixador a través d'ell; tanmateix, aquesta no és una bona explicació per a les cèl·lules de clorur de la brànquia, les quals són superficials. Tanmateix, el nombre de cèl·lules fosques en cada un d'aquests òrgans augmenta

després del tractament, i s'observen algunes alteracions a nivell d'òrgans citoplasmàtics, cosa que ens pot suggerir que la presència dels tensioactius provoqui una activitat citotòxica i/o un canvi funcional de la cèl·lula (Ghadially, 1997; Rojo i González, 1999). Per Wendelaar Bonga i Van der Meij (1989) les cèl·lules fosques representen cèl·lules que s'estan degenerant.

L'apoptosi es pot considerar com un "suïcidi" cel·lular, el qual es manifesta en els seus primers estadis per una alteració important del nucli i una posterior condensació del citoplasma, però sense que els òrgans citoplasmàtics es vegin alterats (Majno i Jons, 1996; Rojo i González, 1999). La presència de macròfags en l'epiteli branquial estaria justificada per a fagocitar els restes cel·lulars. No obstant això, no s'han observat macròfags amb cossos apoptòtics, procedents de la dissolució de cèl·lules fosques, al voltant d'aquestes; els macròfags els trobem sobretot a nivell lamel·lar.

El fet que el seu nombre augmenta després dels tractaments i que les cèl·lules fosques presenten signes evidents de degeneració cel·lular, com són nucli picnòtic, mitocondris inflats i dilatació de les cisternes del reticle endoplasmàtic, ens fa pensar en un canvi en l'estat funcional de la cèl·lula degut a l'acció directe o indirecte dels agents contaminants.

Les alteracions mitocondrials observades en algunes cèl·lules, com són l'aparició de mitocondris en forma de d'anell (O) i de copa (C), i la desorientació de les crestes mitocondrials, també s'han descrit després de l'administració de varis agents tòxics, i precedeix a la formació de cossos mielínics (Crespo i Sala, 1986a). Aquest fet fa pensar que siguin un fenomen de degeneració cel·lular (Ghadially, 1997). D'altra banda, s'ha observat una relació entre la desorientació de les crestes mitocondrials i un desacoblament parcial de la fosforilació oxidativa provocat per una inhibició de l'activitat d'alguns enzims mitocondrials responsables de la respiració cel·lular (Ghadially, 1997) provocant un bloqueig de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa. S'ha vist que la presència de agents tòxics en el medi inhibeix la funció de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa alterant la funció osmoreguladora de la brànquia dels peixos (Crespo i Sala, 1986a; Jagoe i altres, 1996a, 1996b; Wood i altres, 1999). Aquest fet està relacionat amb el que s'ha dit abans de l'efecte dels tensioactius els quals poden desnaturalitzar proteïnes, i per tant també enzims.

4.4.2. Fetge

Les alteracions observades en el fetge dels animals tractats amb els suavitzants són inespecífiques, ja que també s'han observat en altres òrgans com a resposta a gran varietat de contaminants en diferents espècies de teleostis, incloent-hi la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*: (Spitsbergen i altres, 1988; Braunbeck i altres, 1990; Braunbeck, 1993; Zahn i

Braunbeck, 1993; Arnold i altres, 1996a; Arnold i altres, 1996b); *Salmo salar* (Kent i altres, 1988), *Poecilia reticulata* (Wester i Canton, 1987), *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cyprinus carpio*, *Silurus glanis* (Rojik i altres, 1983), *Cottus gobio* (Bucher i altres, 1992), *Platichthys flesus* (Köhler, 1989, 1990), *Microgadus tomcod* (Cormier, 1986; Cormier i altres, 1989).

Els dipòsits lipídics en el fetge dels peixos poden ser observats en condicions normals, trobant-se una o dues gotes de greix en els hepatòcits de la truita. Aquests dipòsits juntament amb el glicogen, estan considerats com a font d'energia metabòlica (Moon i altres, 1985). La presència de grans quantitats de lípids en aquest tipus cel·lular, tal com hem descrit en els animals exposats als suavitzants, pot ser causada per diferents etiologies.

L'aparició de fetge gras en els peixos ha estat relacionat amb desequilibris en el tipus d'alimentació, a dietes artificials o enranciment d'aquestes (Stoch i altres, 1983; Segner 1985; Ventura i altres, 1986; Ferguson, 1989). Tanmateix, el fet de que en el nostre estudi únicament hem trobat aquests acumulats en els animals tractats i no en els control, fa que descartem la dieta com a possible causa de la seva aparició.

D'altra banda, l'excessiva acumulació de lípids pot estar relacionada amb un descens de la síntesi proteica com a conseqüència de l'alteració de les cisternes del RER (Ghadially, 1997). En animals tractats aquest organul està altament alterat, mostrant moltes cisternes anastomosades i degranulades (Arnold i altres, 1996b). Aquests canvis poden portar a l'alteració de la síntesi de proteïnes per part del RER i afectar, per tant, a la producció de les lipoproteïnes que transporten els triglicèrids a la sang, afavorint-se l'acumulació intracel·lular d'aquests (Arnold i altres, 1996b). Si el fetge no produeix les proteïnes necessàries per a transportar els lípids cap a la sang, es pot produir una acumulació lipídica anormal en els hepatòcits. L'alteració dels mitocondris també repercutiria en la pertorbació de la síntesi proteica (Wester i Canton, 1987).

A més, aquesta anomalia podria veure's potenciada per l'efecte desnaturalitzant dels tensioactius sobre les proteïnes, tal com van suggerir Martínez Tabche i altres (1990) després d'observar un descens de les proteïnes hepàtiques en tilapia (*Oreochromis hornorum*) exposades a un tensioactiu aniònic (laurilbencè sulfonat de sodi).

A l'igual que en la brànquia, també s'han observat cèl·lules d'electrodensitat alta en el teixit hepàtic d'animals control i en aquells sotmesos a tractament amb els suavitzants emulsionats i microemulsionats. Tanmateix, com també es va observar en el teixit branquial, la seva presència sembla augmentar després dels tractaments, i tal com s'ha descrit en les cèl·lules de clorur branquials, els hepatòcits foscos presenten signes de degeneració cel·lular, que fan pensar que la presència d'agents tòxics en el medi (suavitzants) han provocat un canvi en l'estat funcional de la cèl·lula.(Cheville, 1994; Ghadially, 1997)

L'inflament dels mitocondris i la dilatació, vesiculació i degranulació del reticle endoplasmàtic rugós que s'ha observat en els hepatòcits dels animals tractats amb els suavitzants són lesions que normalment venen lligades, i s'anomena degeneració hidròpica (Ghadially, 1997).

L'inflament mitocondrial s'ha relacionat amb entrada d'aigua a l'interior de l'organul, diluint la matriu mitocondrial. Aquesta infiltració de líquid provoca electrolucidesa de la matriu i desorganització de les crestes mitocondrials amb diferent graus de desorientació, d'escurçament i de reducció del seu nombre (Ghadially, 1997). A més, la presència de cossos mielínics, forma més comuna de degeneració mitocondrial (Ghadially, 1997), en el citoplasma d'aquestes cèl·lules també podria estar associat amb l'alteració d'aquests organuls. S'han detectat canvis similars en hepatòcits exposats a diferents contaminants (Rojik i altres, 1983; Cormier, 1986; Köhler, 1989; Arnold i altres, 1996a, 1996b; Marlasca i altres, 1998). D'altra banda, la dilatació i vesiculació del RER és una resposta que es dona freqüentment en els hepatòcits de peixos exposats a diferents agents tòxics, com poden ser efluents contaminats (Cormier, 1986; Köhler, 1989; Marlasca i altres, 1998), compostos organoclorats (Braunbeck i altres, 1990; Braunbeck, 1993; Stehr i altres, 1998; Hugla i Thome, 1999), herbicides (Zahn i Braunbeck, 1993; Braunbeck i Appelbaum, 1999), pesticides (Rojik i altres, 1983; Arnold i altres, 1996a, 1996b; Braunbeck i Appelbaum, 1999). Drewa i altres (1994) també ho van detectar en *Gasterosteus aculeatus* després d'un tractament amb un tensioactiu aniònic (sodi docetil-sulfat, SDS). Aquesta alteració pot ser originada per dos fenòmens: per l'ingrés d'aigua dins de les cisternes o per l'acumulació de productes de secreció. Si el contingut de les cisternes és translúcid, com en el nostre cas, podríem pensar que s'ha produït una entrada d'aigua a la cèl·lula (Cheville, 1994). La presència de mitocondris inflats reafirmaria aquesta hipòtesi (Ghadially, 1997). La degranulació del RER normalment està associada amb la dilatació i vesiculació d'aquest orgànul, i dona una aparença llisa a les cisternes d'aquest, quedant els ribosomes lliures pel citoplasma (Ghadially, 1997).

En l'inflament mitocondrial i del reticle endoplasmàtic poden estar implicats en algun tipus de defecte en els mecanismes de control osmòtic cel·lular. L'alteració dels mitocondris portaria a una supressió de la producció d'ATP, la qual cosa comporta a un mal funcionament de les bombes Na-K ATP-depenents de les membranes cel·lulars (Misra i altres, 1991; Ghadially, 1997), fet que induiria l'entrada d'aigua als compartiments cel·lulars.

Tot i així, varis autors consideren que aquests tipus de canvis ultraestructurals dels hepatòcits del fetge poden servir com a bons indicadors de l'exposició a contaminants (Hinton i Laurén, 1990; Braunbeck, 1994; Arnold i altres, 1996a, 1996b).