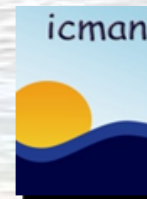


Bioindicadores y Biomarcadores Celulares y Moleculares en Acuicultura y Medio Ambiente



“A veces un pez muerto es mejor que un pez enfermo”.

Esto podría sonar cruel, pero las enfermedades son entre otras cosas, responsables de:

1.- Aumento de mortalidad

2.- Reducción del crecimiento y bajo índice de conversión del alimento y pérdida de apetito, con el consecuente incremento de desechos-pienso y menor calidad del agua.

3.- Mayor vulnerabilidad de los peces al desarrollo de enfermedades y patologías si la calidad del agua no es adecuada.

ACTIVIDAD ANTROPOGÉNICA

Físicos

Sólidos en suspensión

Turbidez

Espumas

Sustancias insolubles

Temperatura

Salinidad, etc.

Químicos

Hidrocarburos

Dioxinas

Pesticidas

Organofosforados

Retardantes de llama

Metales pesados, etc.

Biológicos

Fitoplancton

Bacterias, Virus, Hongos

Parásitos, etc.

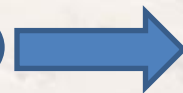
Biomarcadores

Detectan la presencia de una exposición a xenobióticos y determina las consecuencias biológicas de la exposición

Bioindicadores

Proporcionan una información semi-cuantitativa sobre la contaminación del medio acuático y permiten evaluar directamente el estrés o impacto ambiental

**Actividad
antropogénica**



Estrés ecológico

Tipos de contaminantes

Las sustancias que son vertidas a los ecosistemas costeros son de naturaleza muy diversa, siendo los principales grupos:

INORGÁNICOS

METALES

Hg
Cd
Ag
Cu
Zn

ORGANO-METÁLICOS

TBT Sn $(C_4H_9)_4$

CH_3Hg^+

$(CH_3)_2Hg$

$(CH_3)_2SnCl_2$

ORGÁNICOS

DETERGENTES

LAS
ABS
AES

PESTICIDAS

-DDTs Y ORGANOCOLORADOS
-ORGANOFOSFORADOS
-CARBAMATOS

PCBs

PAHs

RADIONUCLEIDOS

^{226}Ra

^{90}Sr

^{131}I

^{137}Cs

^{239}Pu

Biomarcadores en Acuicultura y Medio Ambiente

La necesidad de determinar el impacto que producen diferentes agentes estresantes y/o contaminantes ambientales, ha conducido al desarrollo de varios métodos de ensayo.

La evaluación de estrés y/o tóxicos ambientales puede realizarse mediante el análisis químico, sin embargo:

- ✓ el análisis se ve limitado por la sensibilidad de los métodos de detección.
- ✓ los contaminantes suelen encontrarse en la naturaleza formando parte de mezclas complejas.

ALTERNATIVA

Detección de los efectos biológicos que se producen en organismos expuestos a xenobióticos.

Incorporación

Acumulación

Desintoxicación
(biotransformación)

Cuantificación
(presencia y efecto)



Un **bioindicador** es un [indicador](#) consistente en una [especie vegetal](#), [hongo](#) o [animal](#); o formado por un grupo de especies (grupo eco-sociológico) o [agrupación vegetal](#) cuya presencia (o estado) nos da información sobre ciertas características ecológicas, es decir, (físico-químicas, micro-climáticas, biológicas y funcionales), del [medio ambiente](#), o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio. Se utilizan sobre todo para la [evaluación ambiental](#) (seguimiento del estado del medio ambiente, o de la eficacia de las medidas compensatorias, o restauradoras).

El principio consiste en observar los efectos biológicos, individualmente o en las poblaciones de diferentes ecosistemas (a escala de la [biosfera](#) o a veces de grandes [biomasa](#)). Estos efectos deben ser medibles vía la observación de diversos grados de alteraciones morfológicas, alteraciones de comportamiento, de los tejidos o fisiológicas (crecimiento y reproducción), lo que, en casos extremos, lleva a la muerte de estos individuos o a la desaparición de una población.

Debe estar suficiente (normalmente, o anormalmente) disperso en el territorio y ser relativamente abundante y, si es posible, fácilmente detectable. A menos que se quiera medir la movilidad de las especies, debe ser lo más [sedentario](#) posible para reflejar las condiciones locales. Debe tener un tamaño que permita el estudio de los diferentes tejidos y sus componentes (músculos, huesos, los órganos en el caso de un animal ...).

Debe tolerar los contaminantes en concentraciones similares a las observadas en el medio ambiente contaminado, sin efectos letales. También debe sobrevivir fuera del medio natural y tolerar las diferentes condiciones de laboratorio (pH, temperatura, ...).

Los bioindicadores son útiles en los programas de [evaluación ambiental estratégica](#).

Los invertebrados [bentónicos](#) son muy buenos bioindicadores de la calidad de las aguas dulces, especialmente en el estudio de las concentraciones de varios metales pesados. El modo de vida de estas especies les permite esconderse en los sedimentos. La diferencia en la concentración de un contaminante en los sedimentos y en las capas superiores del agua puede ser grande y el modo de vida del bioindicador debe tenerse en cuenta para reflejar su exposición real a los contaminantes estudiados

Recientemente, se utilizan los parásitos como adecuados bioindicadores del efecto de actividades antrópicas

Un marcador biológico o biomarcador son variables que indican un determinado momento del proceso de una enfermedad o patología (progresiva y de larga exposición).

Biomarcador: se define como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo, y que son cuantificables en un sistema biológico o muestra.

Marcador biológico son señales fisiológicas inducida por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas

In sensu estricto, un biomarcador hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico, y no a la presencia de este, o de alguno de sus metabolitos en el organismo.. Sin embargo, es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra, es un indicador biológico de exposición.

Por ello, los biomarcadores se clasifican como de exposición (xenobiótico y/o sus metabolitos), biomarcadores de efecto o respuesta (histopatología, cambios celulares, presencia de anticuerpos, aductos DNA, sobre-expresión genes/RNAm o proteínas, porfirinas/organoclorados, ALA-D/Pb; AChE/organofosforados). Los biomarcadores de susceptibilidad o riesgo son, generalmente debidos a factores genéticos (ADN y fragmentos de retricción/RFLPs), como marcadores de polimorfismos de sistemas enzimáticos-activadores o inhibidores/CYP-450/familias I, II, A,B..) y sistemas detoxificadores.

Un marcador biológico o biomarcador son variables que indican un determinado momento del proceso de una enfermedad o patología (progresiva y de larga exposición).

Biomarcador: se define como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo, y que son cuantificables en un sistema biológico o muestra.

Marcador biológico son señales fisiológicas inducida por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas

In sensu estricto, un biomarcador hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico, y no a la presencia de este, o de alguno de sus metabolitos en el organismo.. Sin embargo, es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra, es un indicador biológico de exposición.

Por ello, los biomarcadores se clasifican como de exposición (xenobiótico y/o sus metabolitos), biomarcadores de efecto o respuesta (histopatología, cambios celulares, presencia de anticuerpos, aductos DNA, sobre-expresión genes/RNAm o proteínas, porfirinas/organoclorados, ALA-D/Pb; AChE/organofosforados). Los biomarcadores de susceptibilidad o riesgo son, generalmente debidos a factores genéticos (ADN y fragmentos de retricción/RFLPs), como marcadores de polimorfismos de sistemas enzimáticos-activadores o inhibidores/CYP-450/familias I, II, A,B..) y sistemas detoxificadores.

• **Los biomarcadores más utilizados en la actualidad en estudios ecotoxicológicos son:**

- **Actividad de las enzimas colinesterásicas (acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, colinesterasas totales)**
- **Actividad de las enzimas ATPasa Na⁺-K⁺ y Mg dependientes**
- **Actividad de las enzimas detoxificadoras**
- **Respuestas genotóxicas**
- **Parámetros hematológicos**
- **Proteínas de estrés**
- **Estabilidad de membranas de lisosomas**
- **Estudios histopatológicos**
- **Respuestas fisiológicas y morfológicas**
- **Parámetros endocrinos**
- **Expresión de genes relacionados con la detoxificación de xenobióticos**

Los biomarcadores se clasifican, por lo general, en tres tipos concretos: biomarcadores de la exposición, del efecto y de la susceptibilidad o riesgo.

• **Marcadores de la exposición.** Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) que se introduce en el cuerpo, un producto interactivo entre el compuesto (o metabolito) y un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición. Comprende:

• **Marcadores internos de dosis.** Indican que el tóxico ha entrado en el organismo. Miden la concentración de xenobióticos y sus metabolitos en los medios biológicos.

• **Marcadores de dosis biológicamente efectivas.** Indican que el tóxico ya ha producido daño en el organismo. Son los compuestos que forma el tóxico o sus productos de bioactivación con los ácidos nucleicos y proteínas (Hb, albúmina). Son útiles cuando la vida media del compuesto es muy corta y resulta difícil medir su concentración.

• **Marcadores del efecto.** Pueden ser componentes endógenos o medidas de la capacidad funcional, o cualquier otro indicador del estado del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición. No identifican el Xb. Comprende:

• **Marcadores de respuesta biológica.** Representan estados avanzados del proceso de daño. Son más persistentes y a menudo representan alteraciones genéticas. Ej. mutaciones de ciertos oncogenes e intercambios entre cromátidas humanas.

• **Marcadores de enfermedades.** Son manifestaciones preclínicas o tempranas de enfermedades.

• **Marcadores de susceptibilidad.** Se usan para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población. Ej. la actividad N-acetiltransferasa (NAT). Los individuos con una alta actividad NAT tienen mayor riesgo si son expuestos a xenobióticos que son bioactivados por NAT (como el 2-aminofluoreno).

Bioindicador: es un organismo que aporta información sobre las condiciones ambientales de su hábitat mediante su presencia, ausencia y comportamiento. Los efectos fisiológicos no se incluyen en la definición de bioindicador.

- **Indicador ecológico:** son parámetros que describen la estructura y la función de los ecosistemas: diversidad de especies, dinámica de poblaciones, cinética del ciclo de nutrientes, tasa respiración/productividad, etc).

- **Parásitos y Factores Ambientales:**

Los cambios ambientales pueden inducir efectos complejos en la transmisión de parásitos que dependen de las interacciones específicas entre hospedadores, parásitos y condiciones bióticas y abióticas. Los factores que afectan al hospedador y ecología de los parásitos pueden ser letales o subletales. Los primeros directamente reducen hospedadores o parásitos. Los efectos subletales pueden alterar procesos en el hospedador y/o parásitos, tales como: incremento de la infectividad del parásito, <<inmunidad del hospedador, y consecuentemente ello afecta a la interacción parásito-hospedador y a la dinámica de la enfermedad.

Por tanto los factores ambientales pueden efectos negativos y “positivos” en la transmisión parasitaria, sin olvidar la importancia de cuantificar su efecto neto en el desarrollo de la enfermedad emergente. Es decir un factor ambiental puede directamente matar al parásito, y simultáneamente incrementar la susceptibilidad de los hospedadores frente a los que sobrevivan-parásitos-.

- La variabilidad de T^a causa disminución del sistema inmune y mayor susceptibilidad a las infecciones en general y parasitosis, en particular.

- **La respuesta inmune de los peces hospedadores de infecciones-infestaciones parasitarias es modulada por la Temperatura/Cambio Climático**

- **A 12°C**

- • Bajo número de parásitos
- • Infiltración del riñón por leucocitos
- • *Upregulation del sistema inmune*

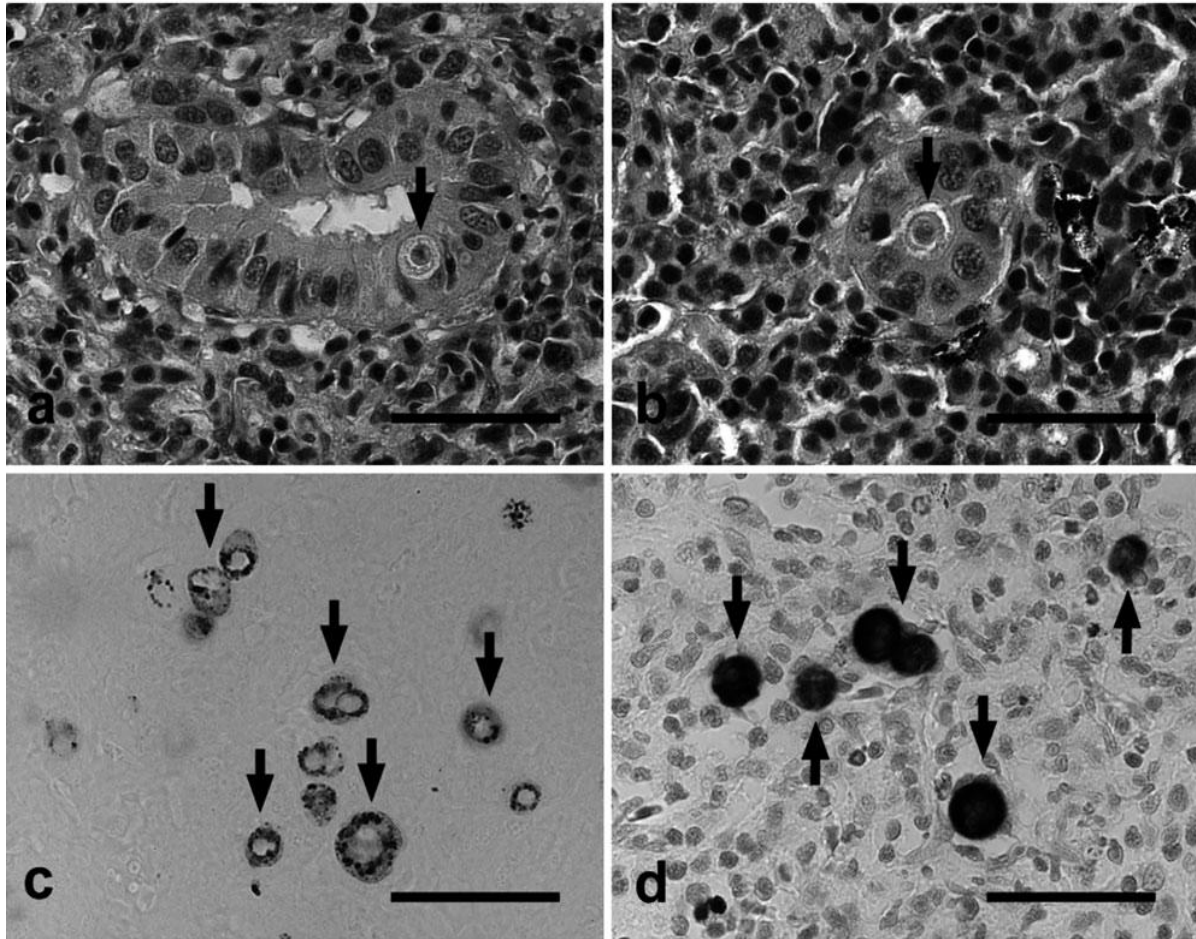
- **A 18° C**

- • Elevado número de parásitos
- • La infiltración renal por leucocitos no incrementa
- • Parcial *downregulation* del sistema inmune

- **12C18C051015-parasite DNA (106 copies)**

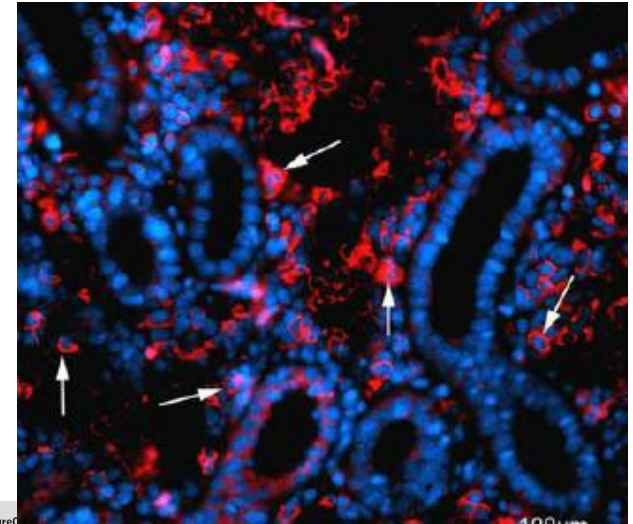
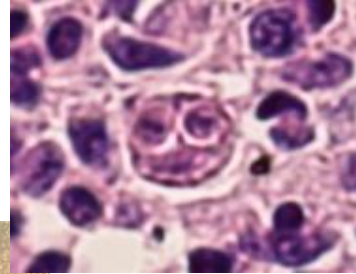
| GO | No. of genes | Beta weight 12° | Beta weight 18° |
|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Immune response</i> | 93 | 0.194 | -0.133 |
| <i>Humoral response</i> | 32 | 0.301 | 0-149 |
| <i>Complement</i> | 20 | 0.371 | -0.32 |
| <i>Chemokines</i> | 5 | 0.504 | 0.163 |

Incremento de Parásitos-Mixozoos en Riñón: Incremento de Tª y Disminución Sistema Inmune y >> Mortalidad



Enfermedad Proliferativa del Riñon: *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoo)

La Temperatura es un factor acelerador de la infeccion 12°C->>>18°C



Vol 455 | 30 October 2008 | doi:10.1038/nature06900

LETTERS

Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature?

Joseph M. Klesecker*



Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species

Jason R. Rohr^{1,2}, Anna M. Schotthoefer³, Thomas R. Raffel^{1,2}, Hunter J. Carrick⁴, Neal Halstead¹, Jason T. Hoverman⁵, Catherine M. Johnson⁶, Lucinda B. Johnson⁶, Camilla Lieske³, Marvin D. Piwoni⁷, Patrick K. Schoff⁶ & Val R. Beasley³

Parasitosis frecuentes en el cultivo en esteros/salinas

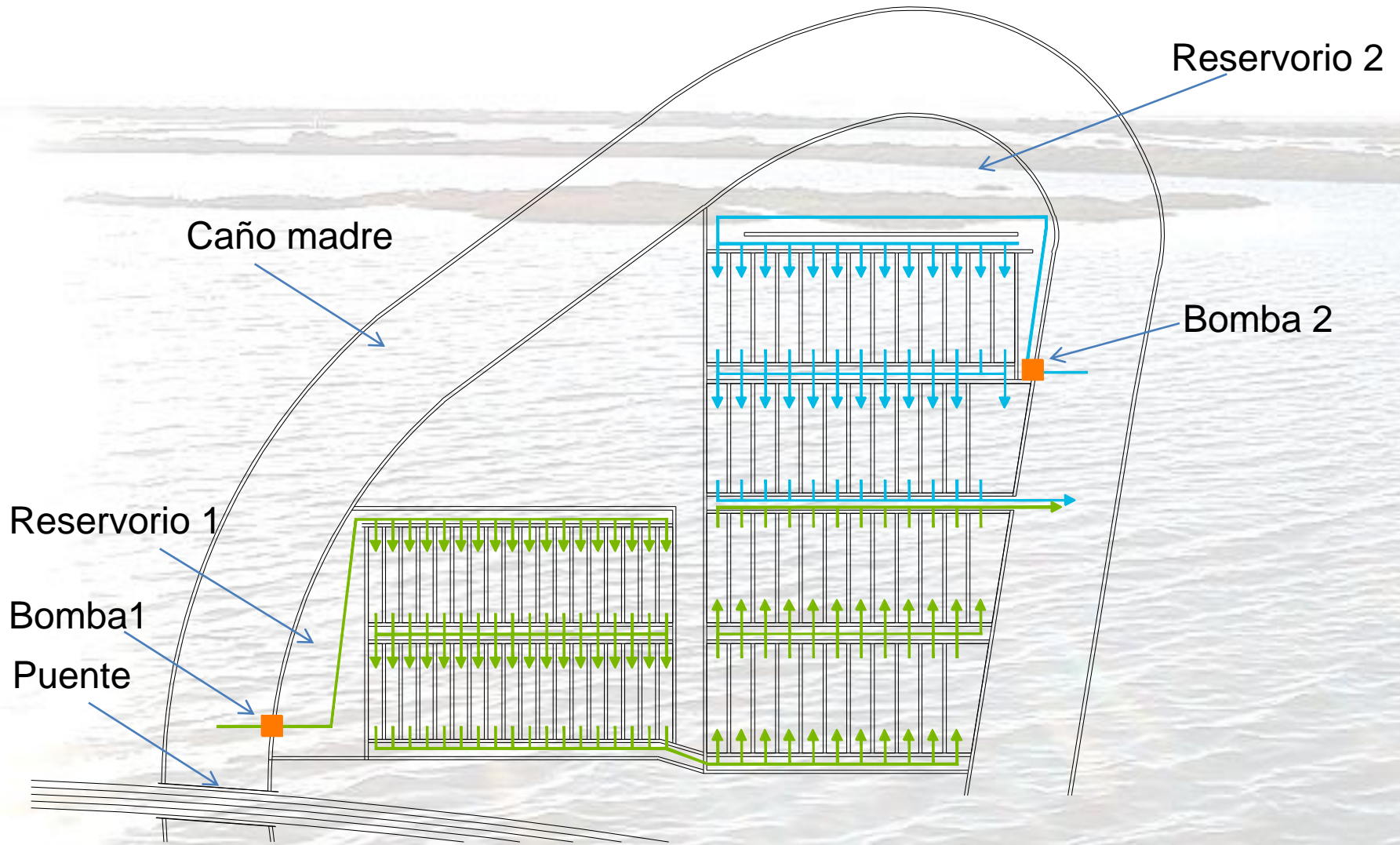
- *Amyloodinium ocellatum*
- *Cryptocaryon irritans*

- *Trichodina, Cryptobia o Chilodonella*
- *Monogeneas*
- *Flexibacter o Vibrio*
- *Rickettsia y Clamydia*

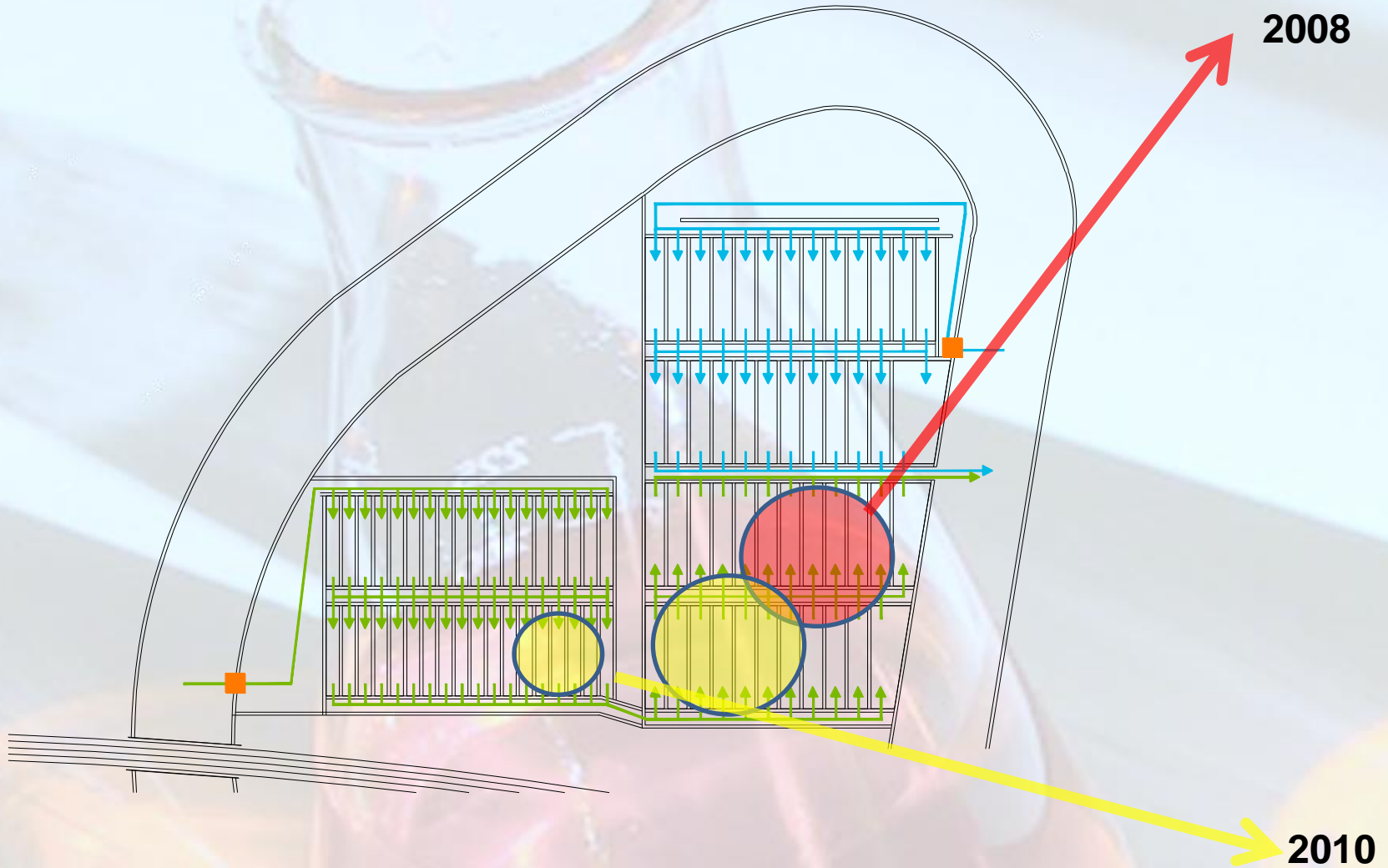
Bioindicadores

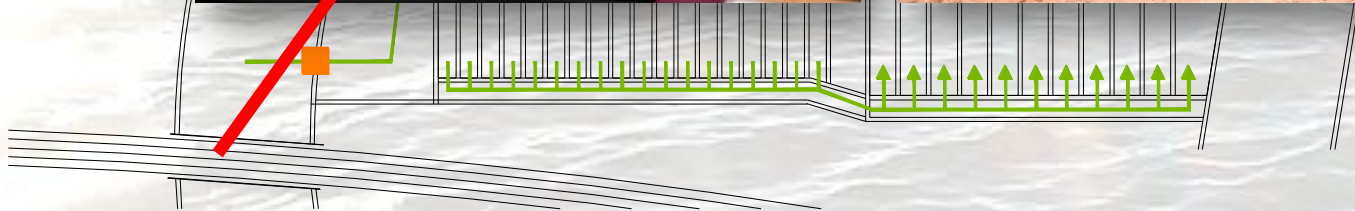


Salinas de estudio



Muestras









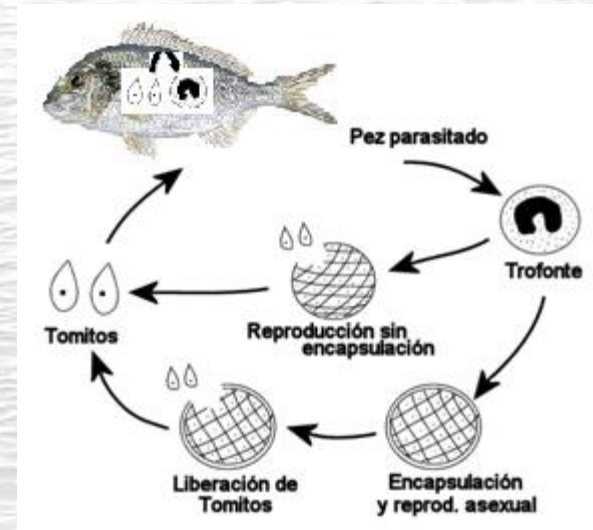
10/09/2007
13:30:06 h

- *Amyloodinium ocellatum*
- *Cryptocaryon irritans*

- *Trichodina, Cryptobia o Chilodonella*
- *Monogeneas*
- *Flexibacter o Vibrio*
- *Rickettsia y Clamydia*

- Metalotioneínas /MT
- Citocromo/CYPIA

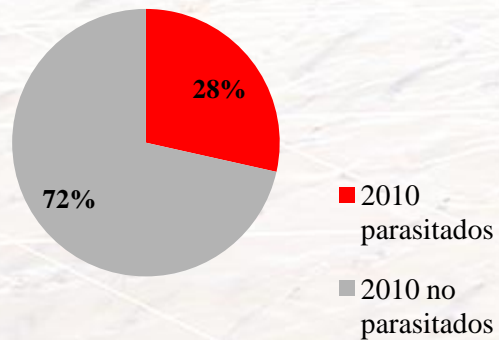
Bioindicadores



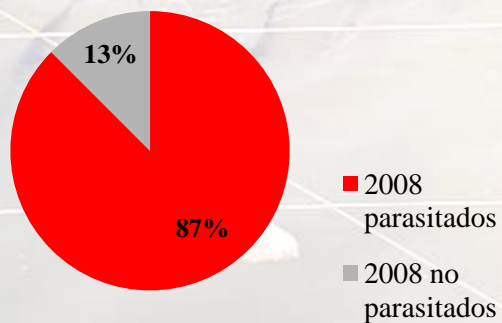
Biomarcadores

Parasitosis

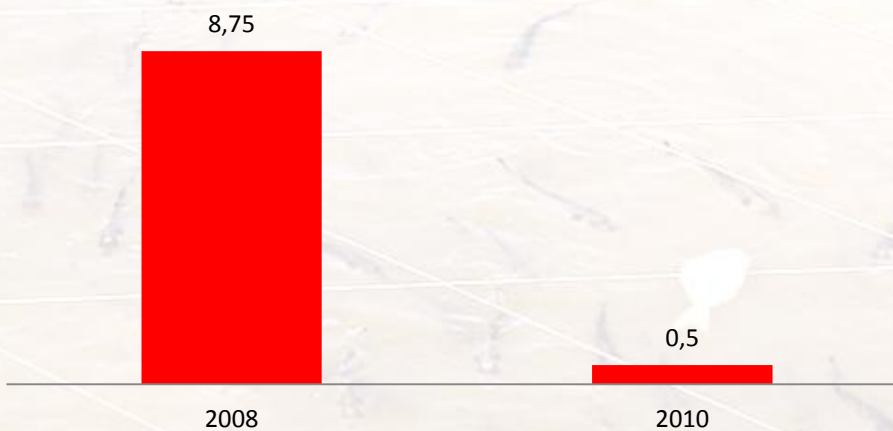
Porcentaje de peces parasitados:
año 2010



Porcentaje de peces parasitados
año 2008

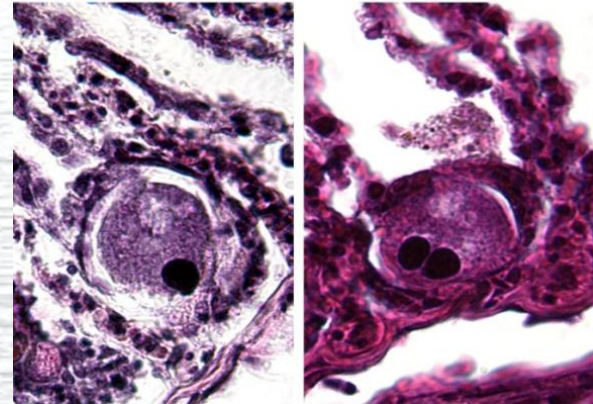
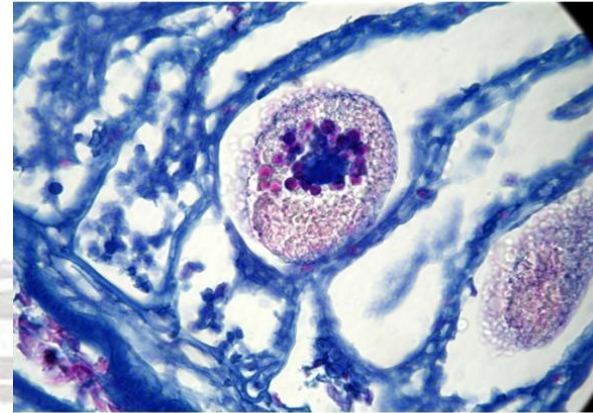


Infección-Infestación media



Muestreo 2008 : Infestación por protozoos:

Amyloodinium ocellatum ,
Cryptocaryon irritans y
Trichodina Sp. Monogeneas y
agrupaciones bacterianas



Muestreo 2010 : Se constató la presencia de parásitos en un 28% de las muestras analizadas, observándose pequeñas parasitosis por *Amyloodinium ocellatum* y *Cryptocaryon irritans*. No se han detectado *Monogeneas*.

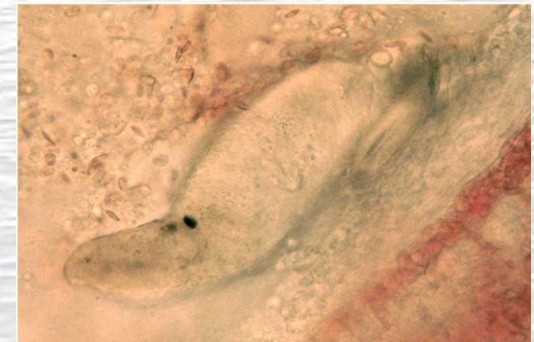
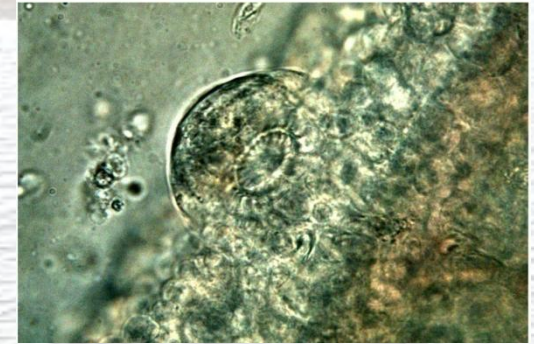
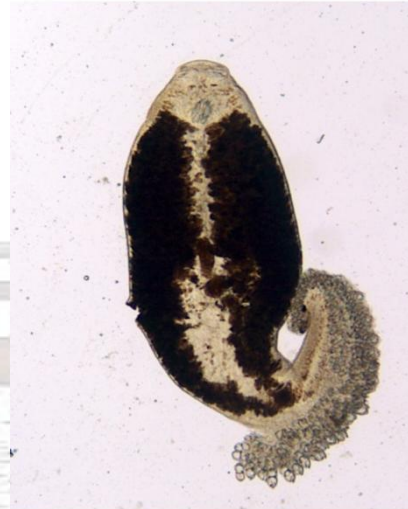
Muestreo 2008 (en fresco):

Infestación por protozoos

***Sparycotyle chrysophiri*,**

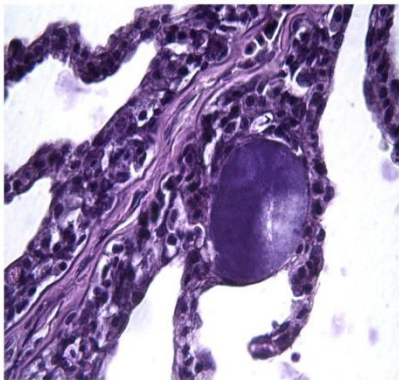
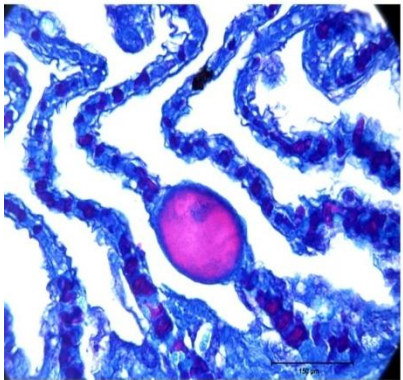
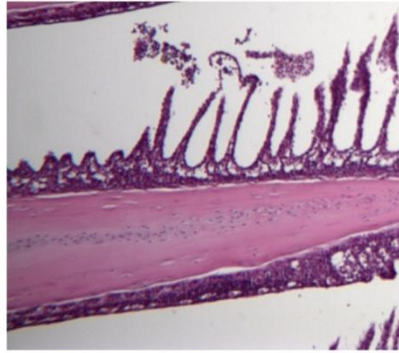
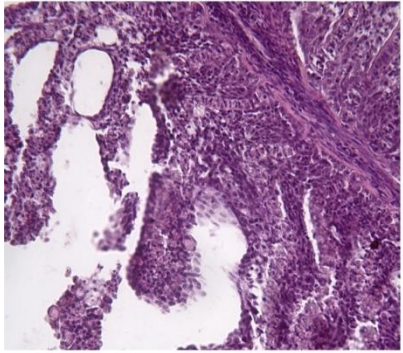
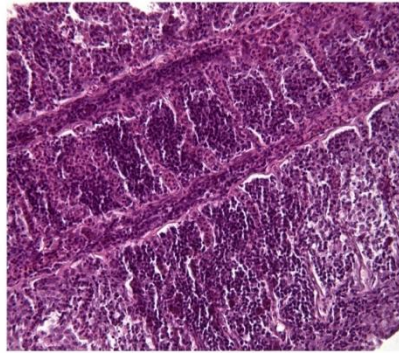
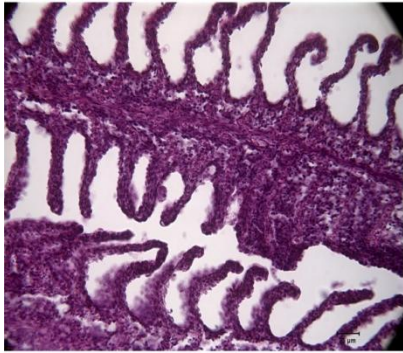
Trichodina sp.* *Dactylogyrus sp

Alta incidencia de ***Furneschinia***
***echeneis*.**



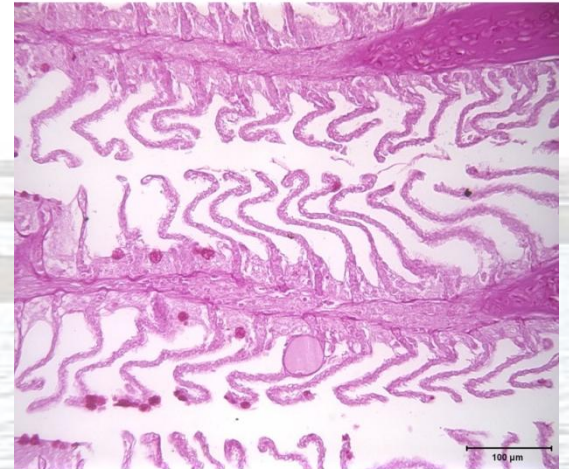
Muestreo 2010 : Escasez de parásitos.

Muestreo 2008:

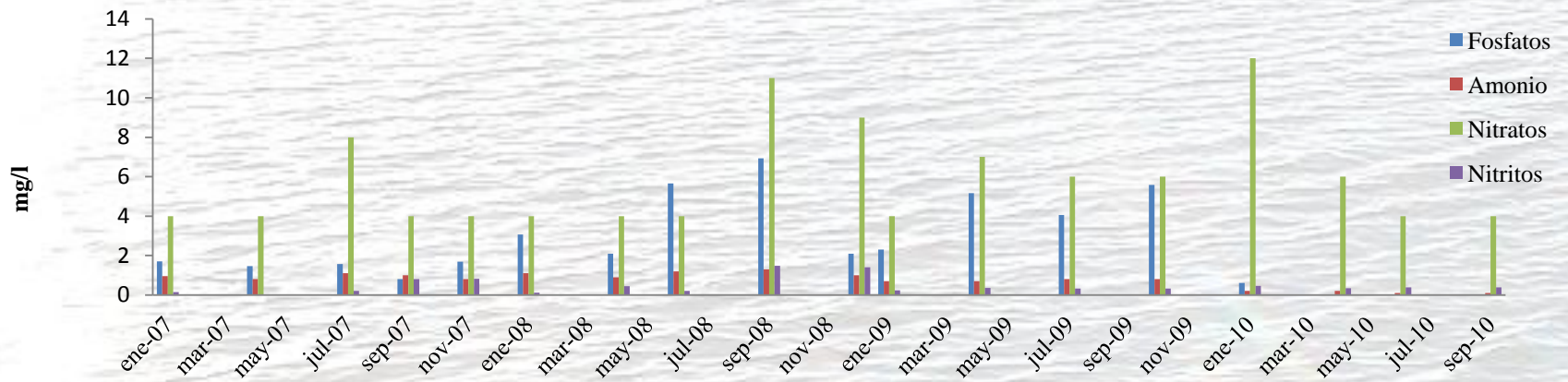


2008

2010

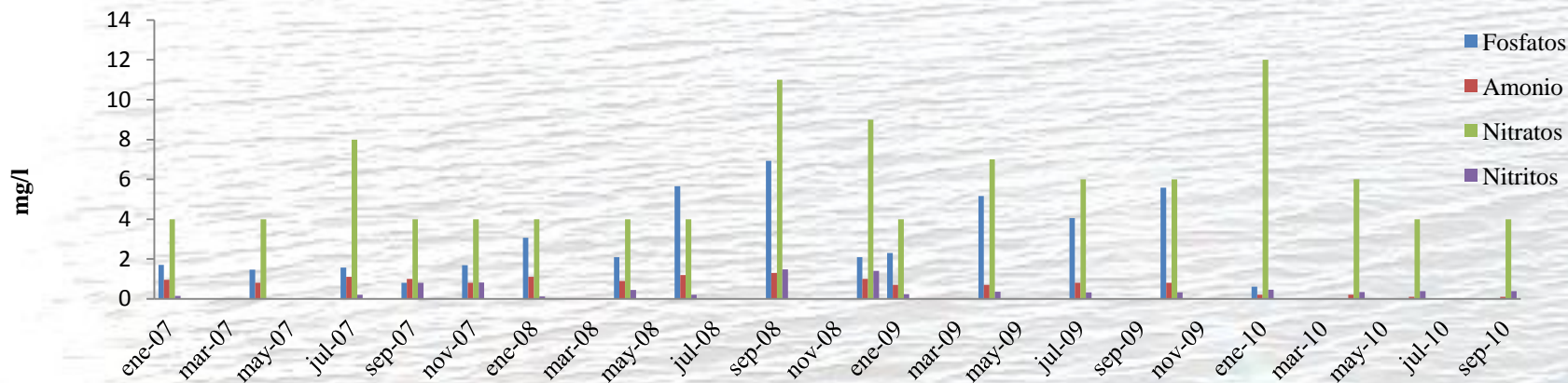
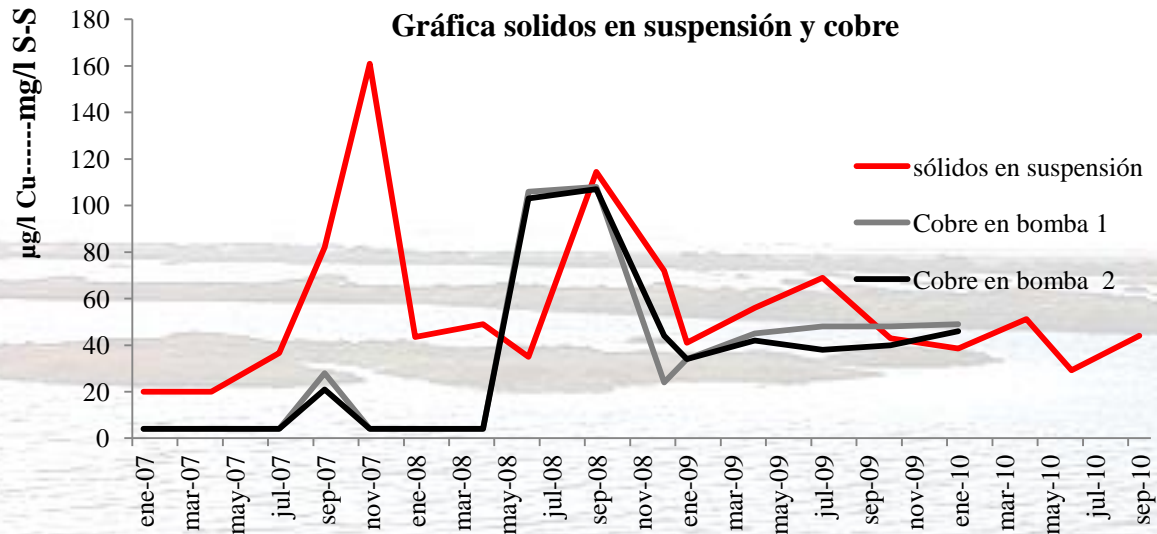


Calidad del agua



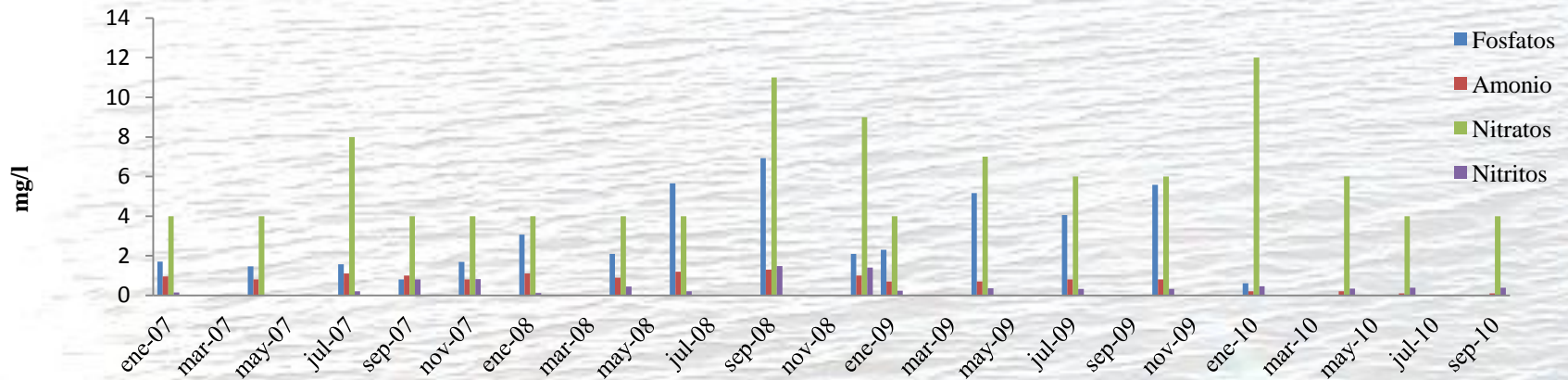
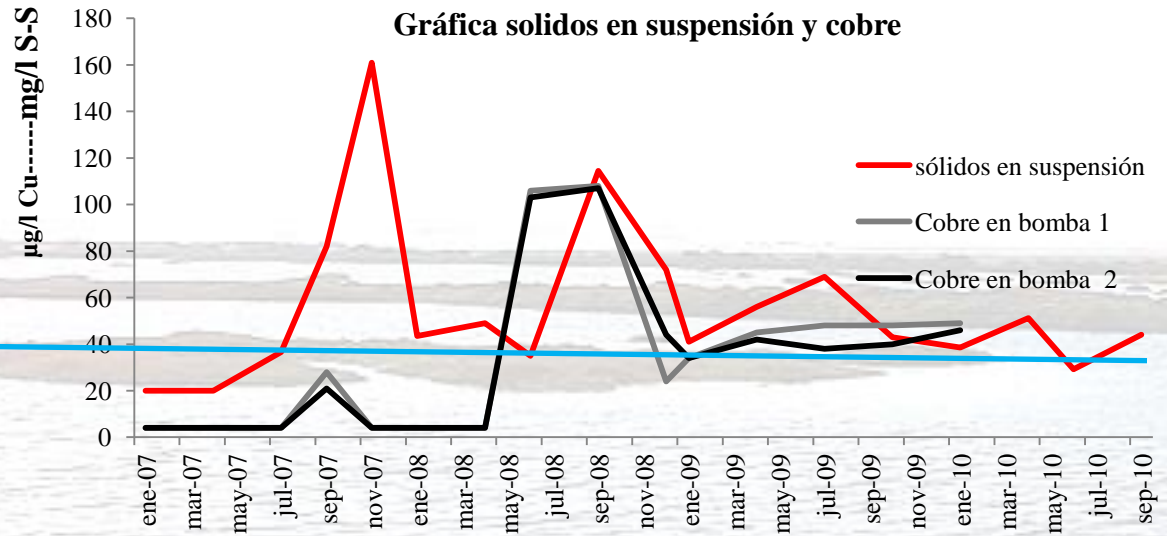
Calidad del agua

Orden de 14 de febrero de 1994, por la que se clasifica las aguas litorales andaluzas y su calidad que establece como máximo **40 µg/l** de cobre en aguas limitadas.



Calidad del agua

Orden de 14 de febrero de 1994, por la que se clasifica las aguas litorales andaluzas y su calidad que establece como máximo **40 µg/l** de cobre en aguas limitadas.

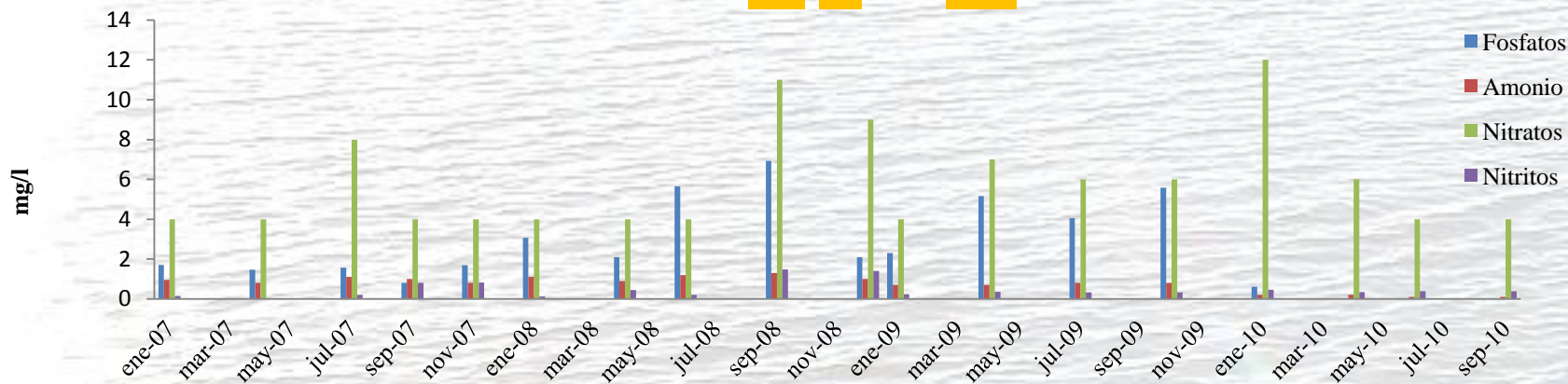
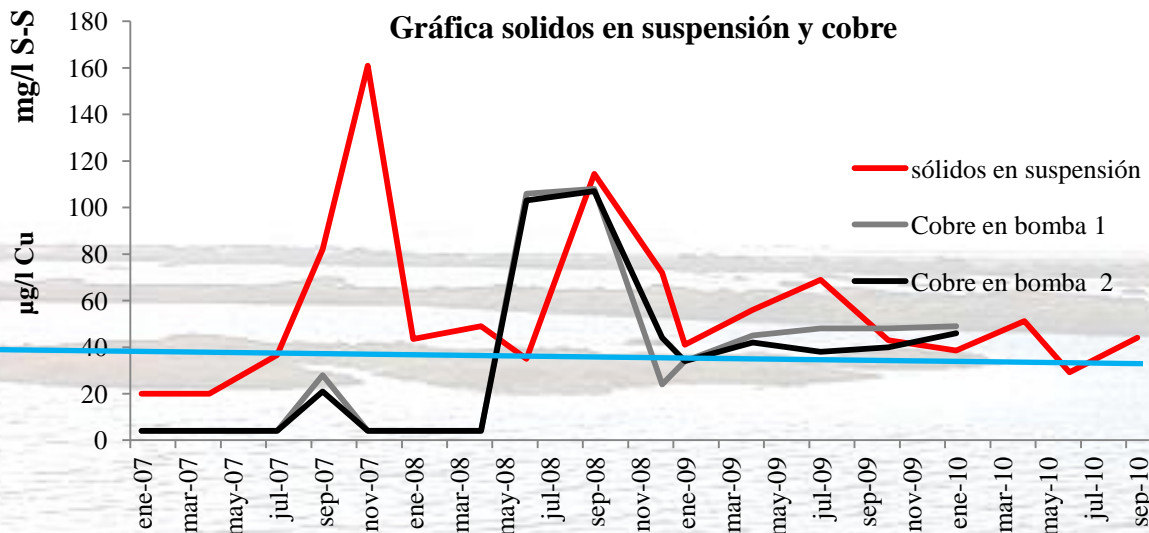


Calidad del agua

Orden de 14 de febrero de 1994, por la que se clasifica las aguas litorales andaluzas y su calidad que establece como máximo **40 µg/l** de cobre en aguas limitadas.



Gráfica sólidos en suspensión y cobre



Primer extendido
Nov 2005

Retirada
primer extendido
Jun-Jul 2007

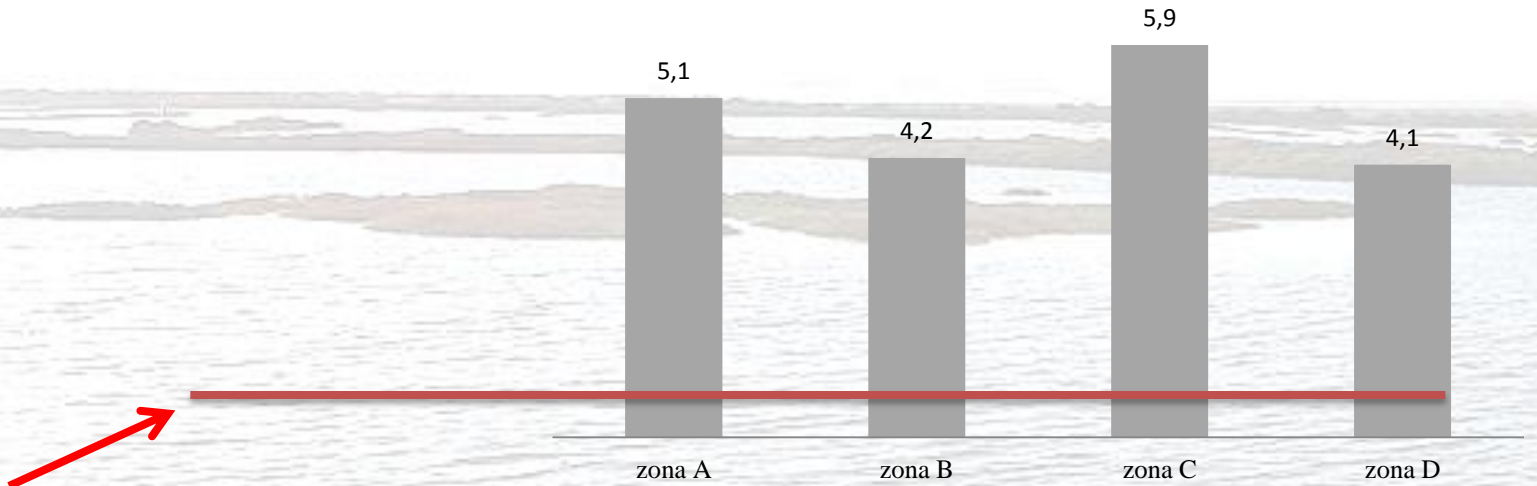
Segundo extendido
Sep 2007

Retirada segundo extendido
Feb-Abr 2008

Calidad del agua

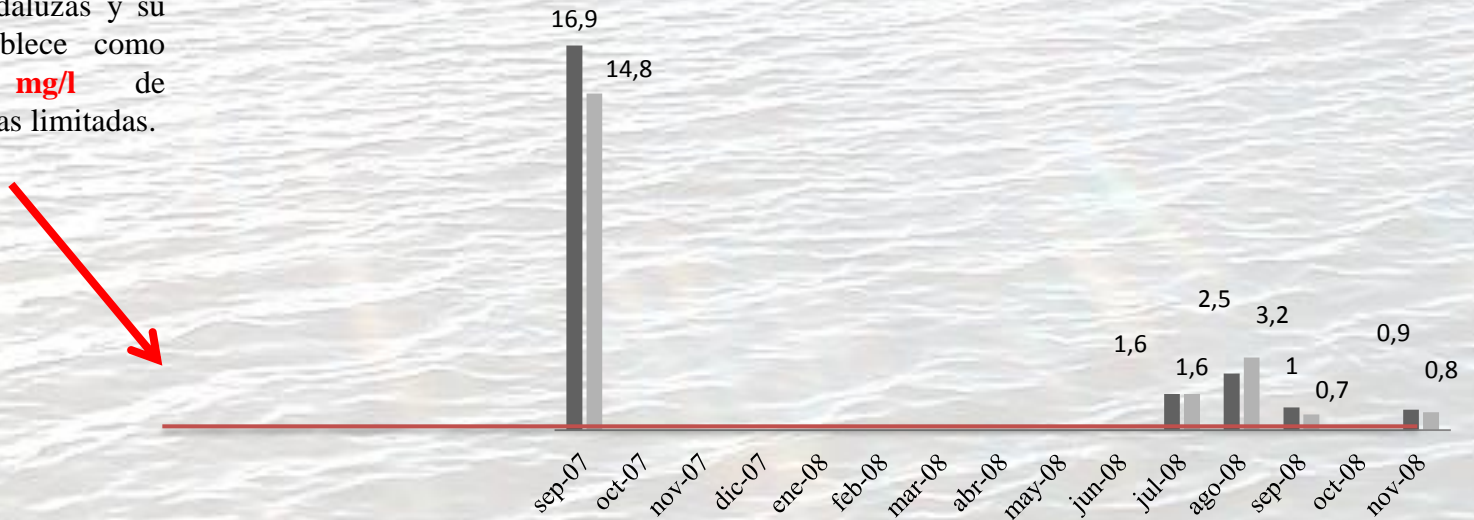
Concentración de detergentes (mg/l)

■ Dentro de la instalación 08-2008



Concentración de detergentes (mg/l)

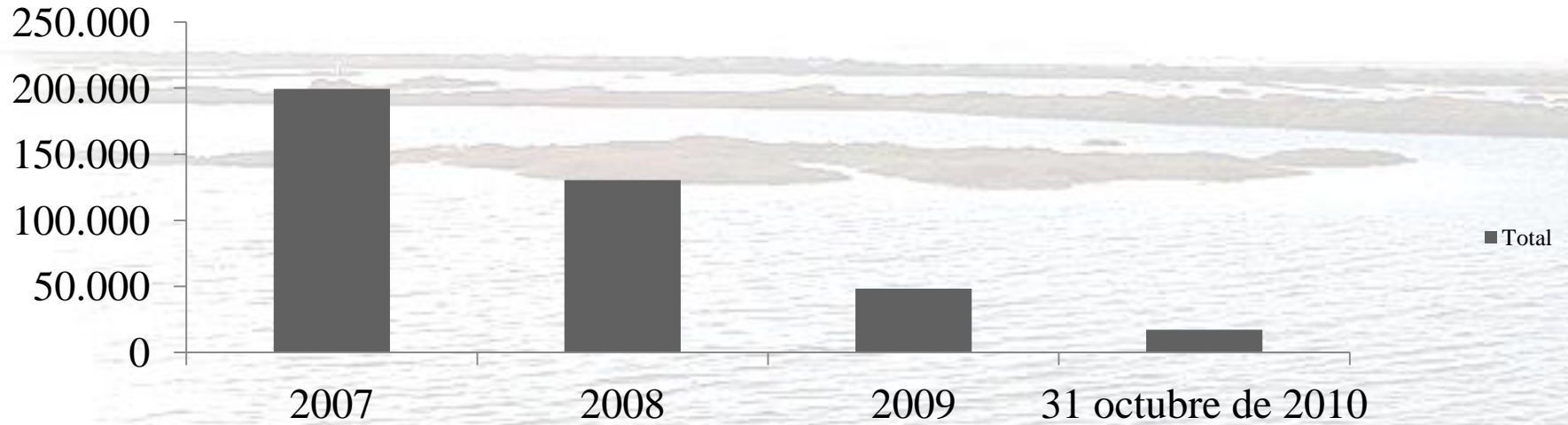
■ Detergentes totales bomba 1 ■ Detergentes totales bomba 2



Orden de 14 de febrero de 1994, por la que se clasifica las aguas litorales andaluzas y su calidad que establece como mínimo **0,3 mg/l** de detergentes en aguas limitadas.

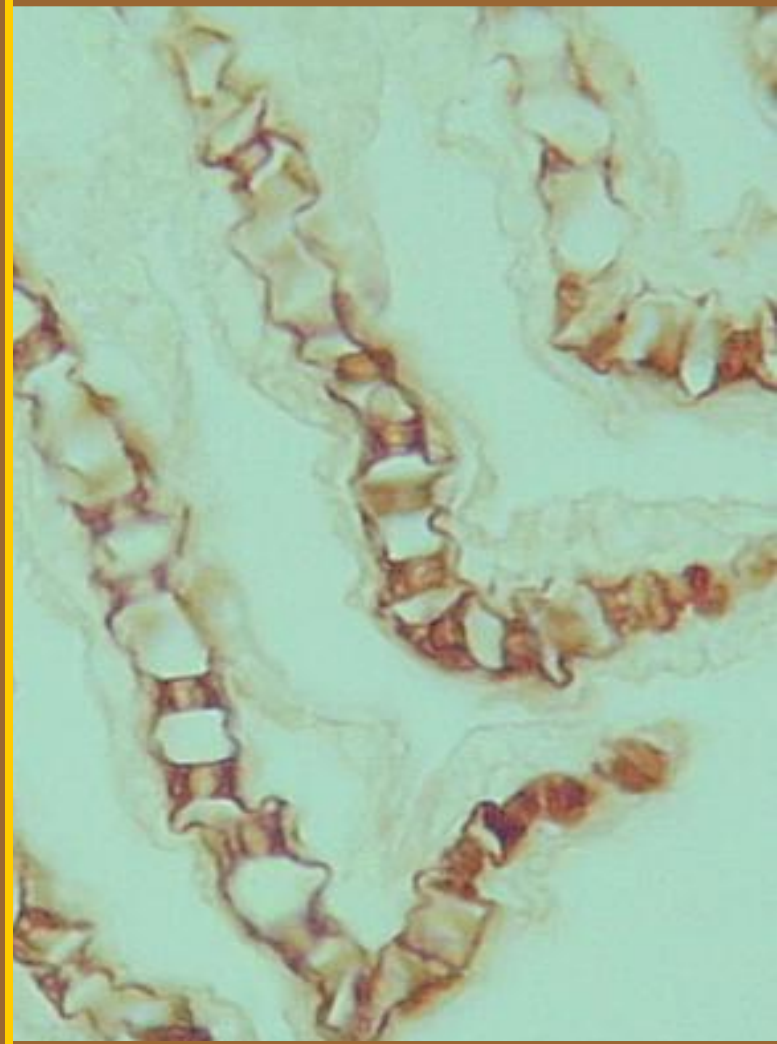
Mortandad

Total del número de bajas de la instalación acuícola



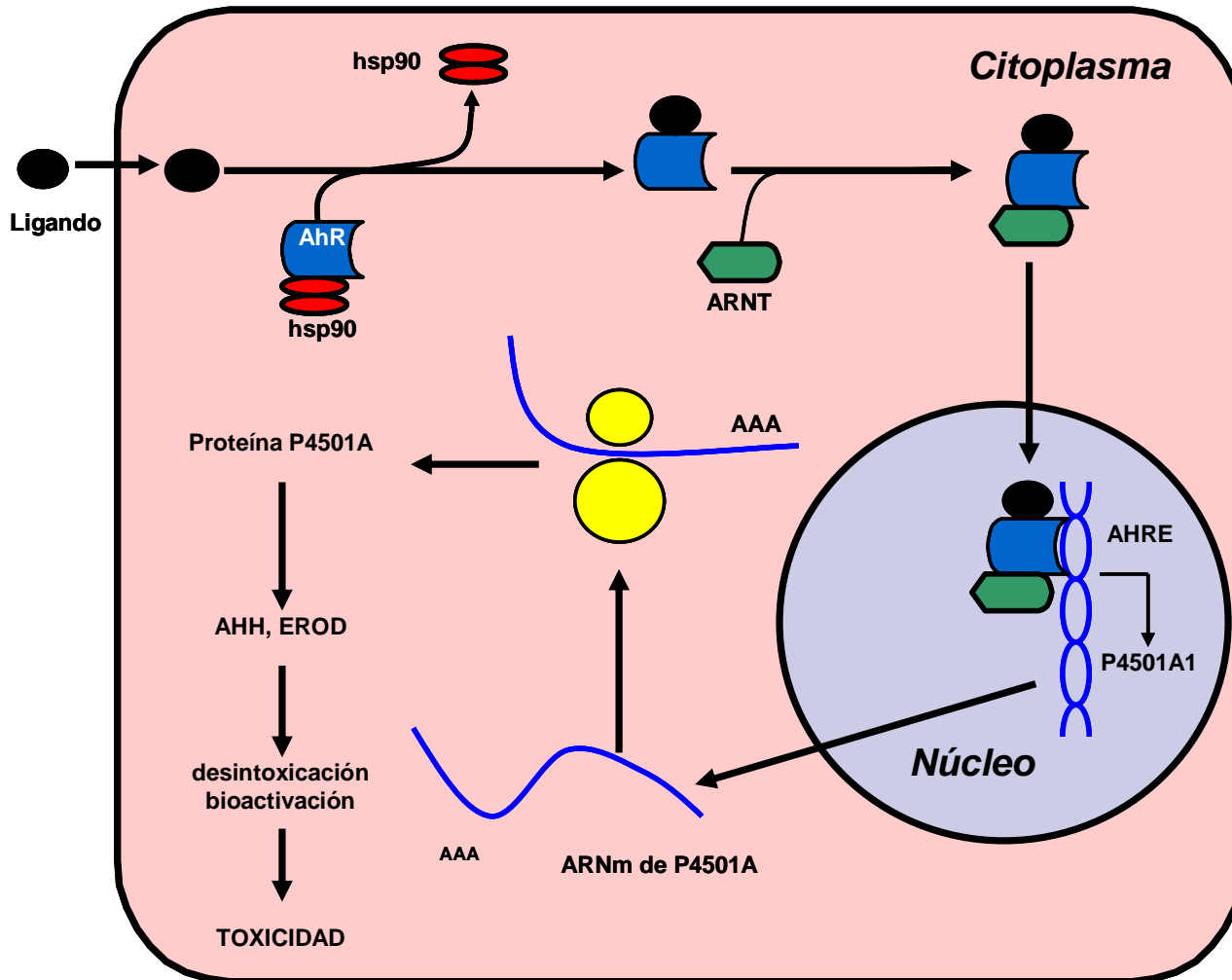
Inmunohistoquímica: Biomarcador de efecto

1. Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena: 3% H₂O₂ durante 15 minutos
2. Lavados: se lavan los corte en tampón Coons 0,1M, 0,1-0,2% Triton X 100, 10 minutos.
3. Saturación de los cortes durante 30 minutos en TCT, 0,5% de BSA
4. Incubación con el anticuerpo primario a temperatura ambiente, durante toda la noche en cámara húmeda.
5. Lavados durante 10 minutos en TCT.
6. Incubación con el anticuerpo secundario durante 90-120 minutos (RT) en cámara húmeda con el anticuerpo anti-IgG biotinilado diluido 1:1000 en TCT.
7. Lavados durante 10 minutos en TCT.
8. Incubación con el complejo estreptavidina peroxidasa, diluido 1:25000 en TCT, durante 90-120 minutos (RT) en cámara húmeda.
9. Lavados durante 10 minutos en TCT.
10. Visualización de la actividad peroxidasa usando un cromógeno como la DAB o el 4-Cloro 1-Naftol
11. Montaje en medio de montaje acuoso



Histopatología Molecular Ambiental

□ CYP1A como biomarcador de xenobióticos (AhR)



hsp90: proteína “heat shock 90”.

AhR: receptor de aril- hidrocarburos.

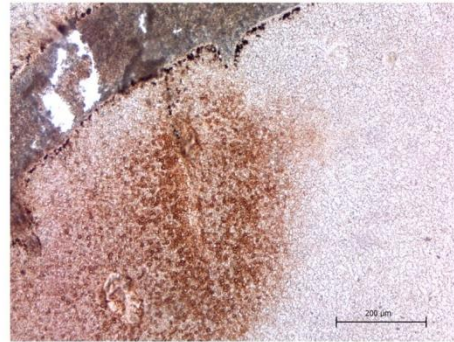
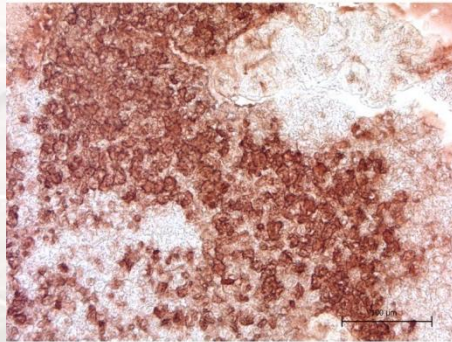
ARNT: proteína traslocadora del receptor de aril- hidrocarburos.

AHRE: elementos de respuesta al receptor de aril- hidrocarburos.

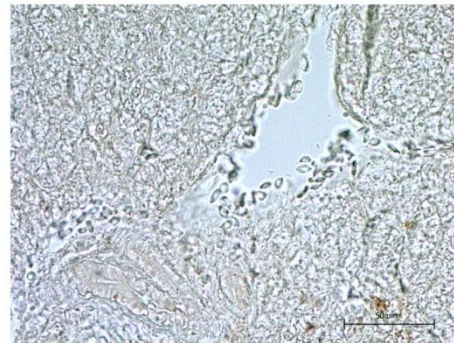
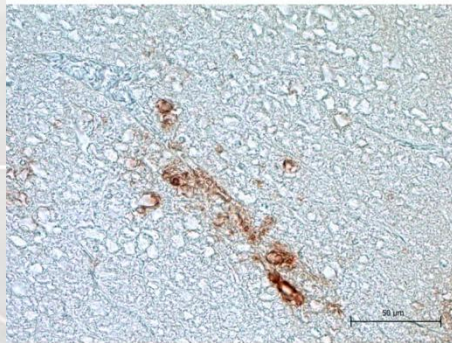
AAA: cadena de aminoácidos.

CYP1A

| Muestras | | 2008 | | | 2010 | | | 2010 Baja densidad | | |
|------------------|---------------------|------|-----|----|------|----|----|--------------------|----|----|
| | | 1a | 2a | 3a | 1b | 2b | 3b | 1c | 2c | 3c |
| Hígado | Hepatocitos | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | 0 |
| | Sistema vascular | ++ | +++ | + | - | - | - | + | + | 0 |
| Branquias | Células epiteliales | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| | Endotelio vascular | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| | Células pilares | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Células mucosas | - | - | - | - | - | - | + | - | - |



2008

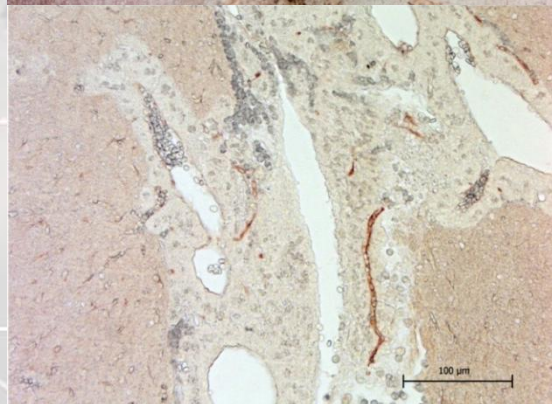
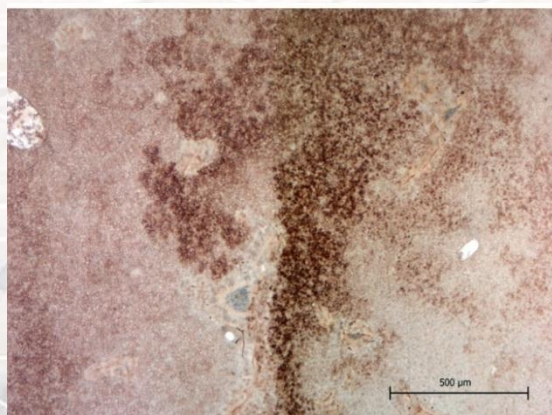


2010

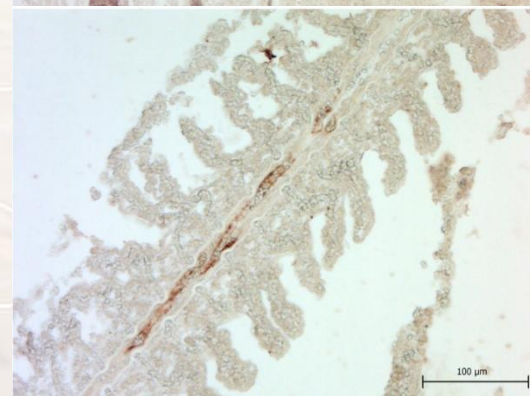
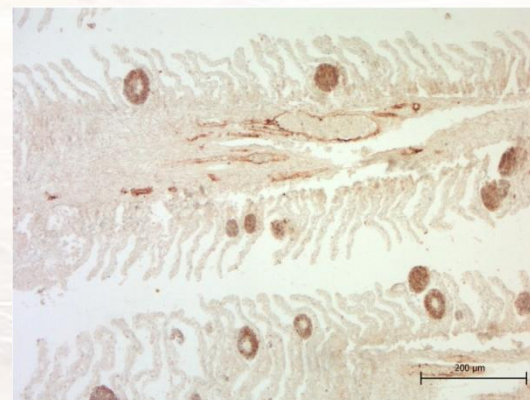


Metalotioneína/MTs

| Muestras | | 2008 | | | 2010 | | | 2010 Baja densidad | | |
|------------------|---------------------|------|-----|----|------|----|----|--------------------|----|----|
| | | 1a | 2a | 3a | 1b | 2b | 3b | 1c | 2c | 3c |
| Hígado | Hepatocitos | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | 0 |
| | Sistema vascular | ++ | ++ | + | - | - | + | - | + | 0 |
| Branquias | Células epiteliales | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| | Endotelio vascular | + | + | ++ | + | + | + | + | + | + |
| | Células pilares | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Células mucosas | - | - | - | - | - | + | ++ | + | + |



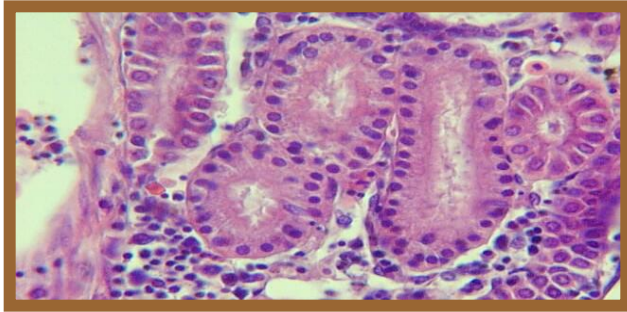
2008



2010

La histopatología como biomarcador de efecto

Algunos tóxicos producen un daño directo en los tejidos, produciendo la muerte de alguna o todas las células de un tejido u órgano. El daño puede ser reversible o irreversible y la respuesta tóxica dependerá de:



- Aporte sanguíneo.
- Función o posición del órgano.
- Grado de especialización tisular.
- Capacidad para reparar el daño.
- Capacidad de metabolismo/desintoxicación

La toxicidad de estos compuestos en el organismo puede ser directa e indirecta:

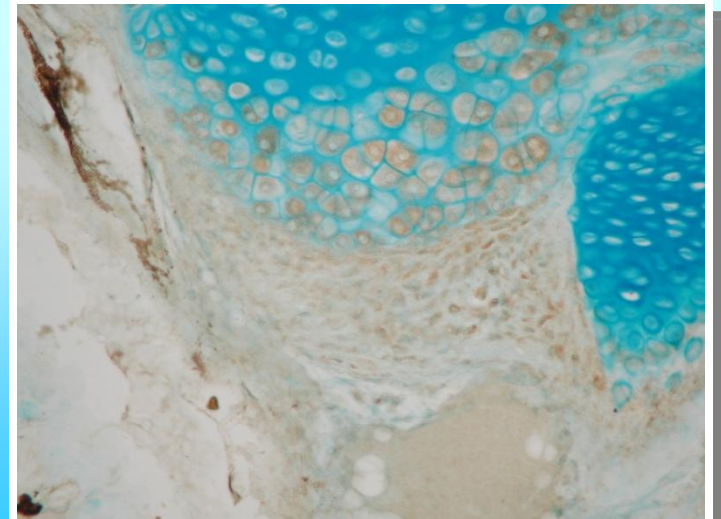
Indirecta: activación metabólica

Inducción CYP1A



Formación de compuestos tóxicos

Directa: alteración histopatológica



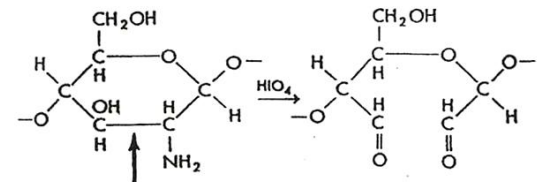
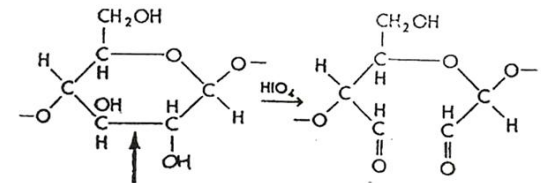
La Histoquímica: biomarcador de efecto

Reacción del PAS

Su especificidad se basa en el uso de dos reactivos selectivos:

- Ácido periódico que oxida los grupos hidroxilo libres de dos átomos de carbono adyacentes y los convierte a aldehídos.

- Reactivo de Schiff que reacciona con los aldehídos libres y produce un color rojo estable.



Histopatología Molecular Ambiental

□ Inducción de CYP1A en cerebro

Función:

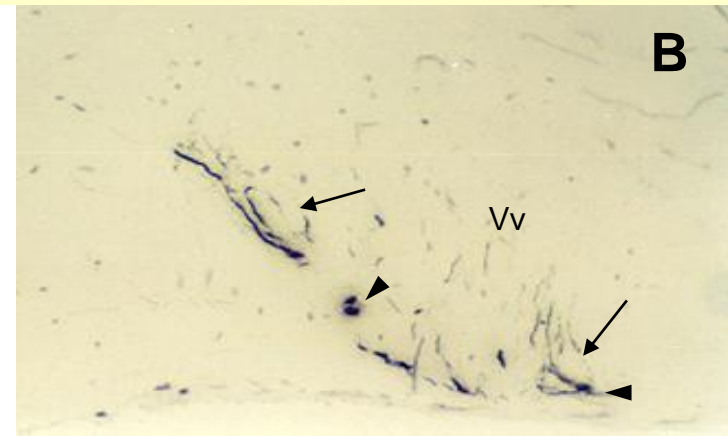
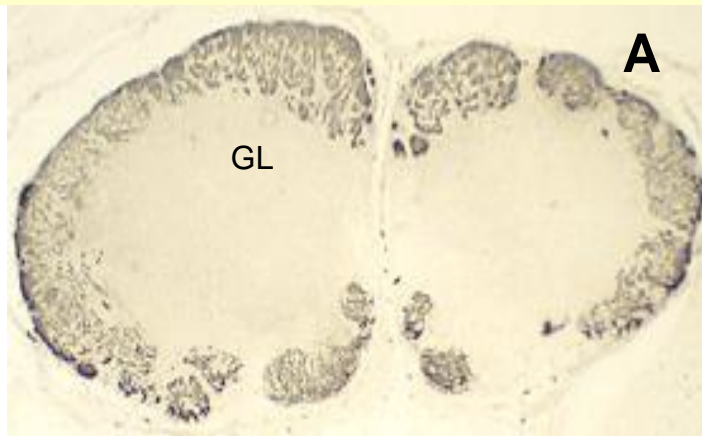
- Metabolismo de neurohormonas
- Síntesis de esteroides neuroactivos
- Mantenimiento del tono vascular

Para nuestro conocimiento, realizamos la primera descripción detallada de la distribución anatómica de CYP1A cerebral (basal e inducida) en una especie de teleosteo.

Organismos control

Fuerte inmunoreactividad CYP1A en la capa glomerular de los bulbos olfativos (GL).

Fibras y cuerpos celulares CYP1A inmunoreactivos en telencéfalo ventral (área ventralis telencephali pars ventrali) (Vv).



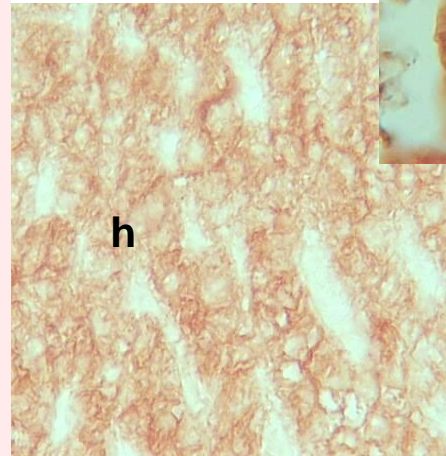
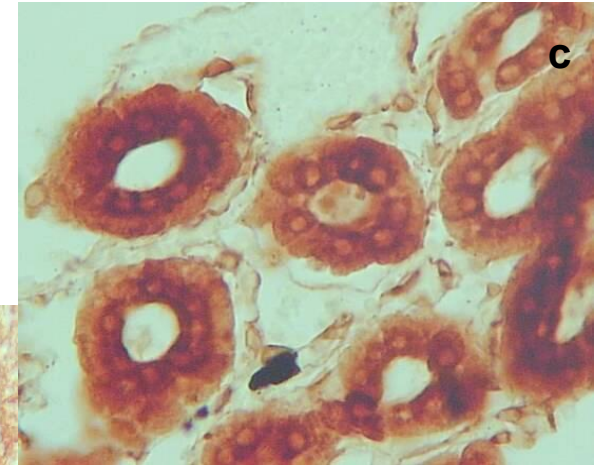
Histopatología Molecular Ambiental

Inducción de CYP1A en tejidos somáticos

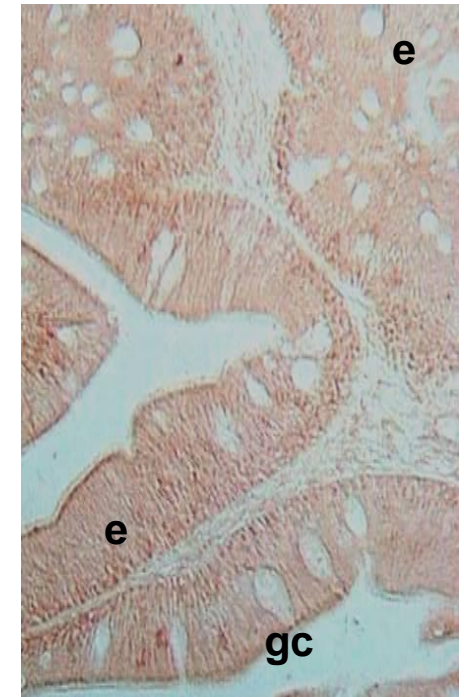
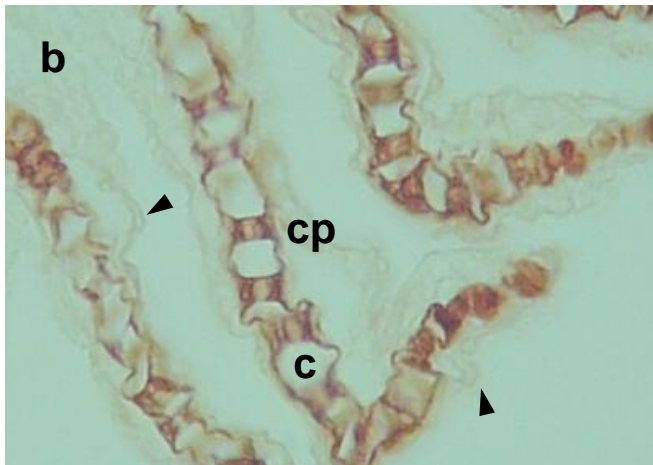
Adultos expuestos a 2,3,7,8-TCDD vía acuática

Tres patrones de inducción:

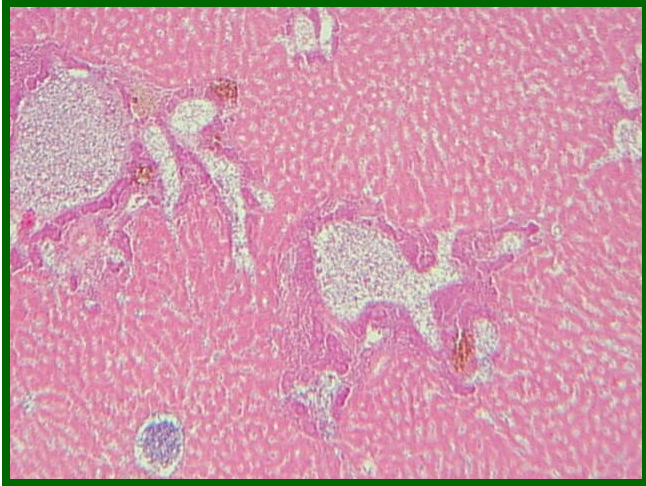
- Inducción en tipos celulares idénticos (Hígado, riñón, intestino). Diferencias en frecuencia e intensidad.
- Exposición a TCDD y no a B(a)P (páncreas exocrino, conductos biliares, estómago y ciegos pilóricos).
- Inducción de tipos celulares distintos en un mismo órgano: B(a)P en epitelio branquial y TCDD en células pilares.



6 pg TCDD/L

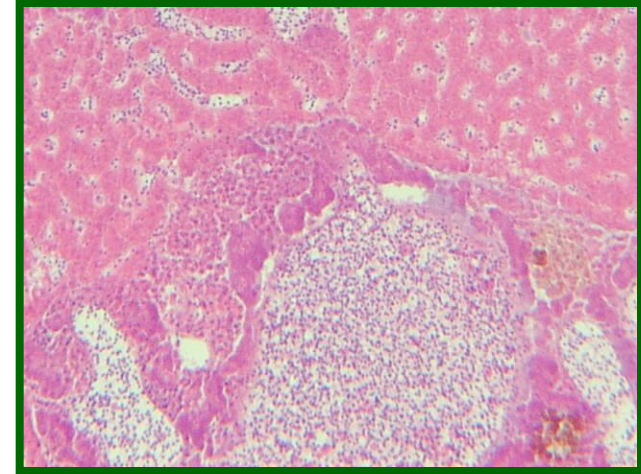


Alteraciones producidas por Cianuro sódico

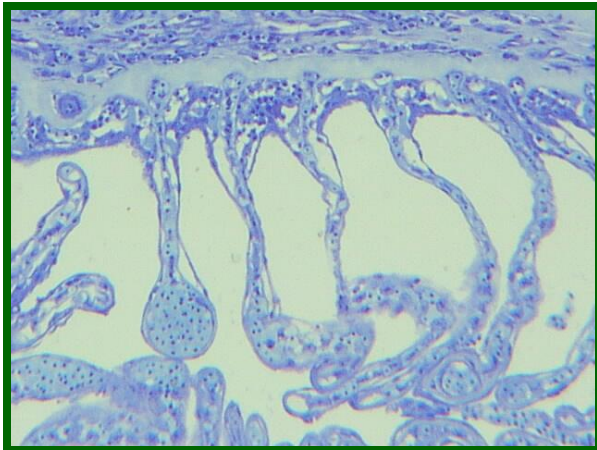


Dilatación
vascular

Las alteraciones
más significativas
aparecen a nivel
del sistema
vascular.

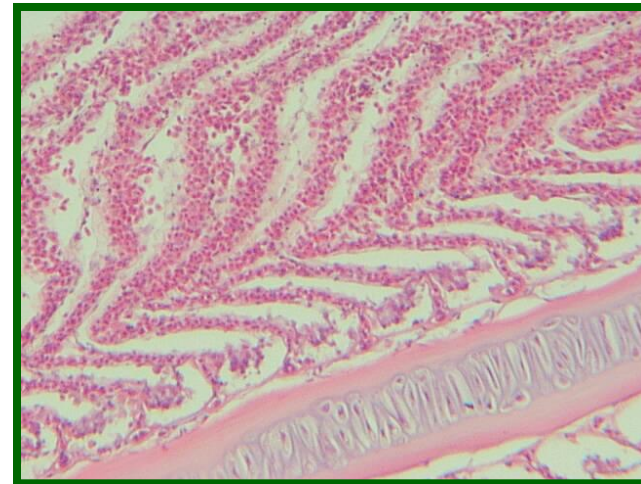


Éstasis
sanguínea



Aneurismas

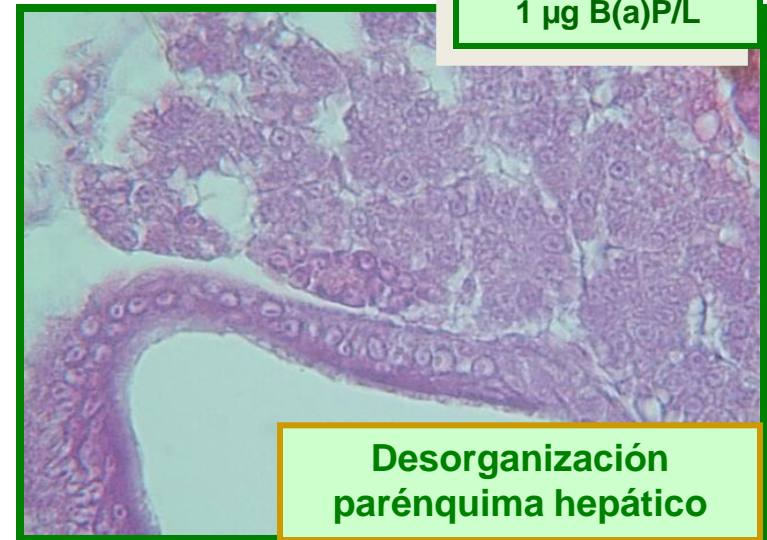
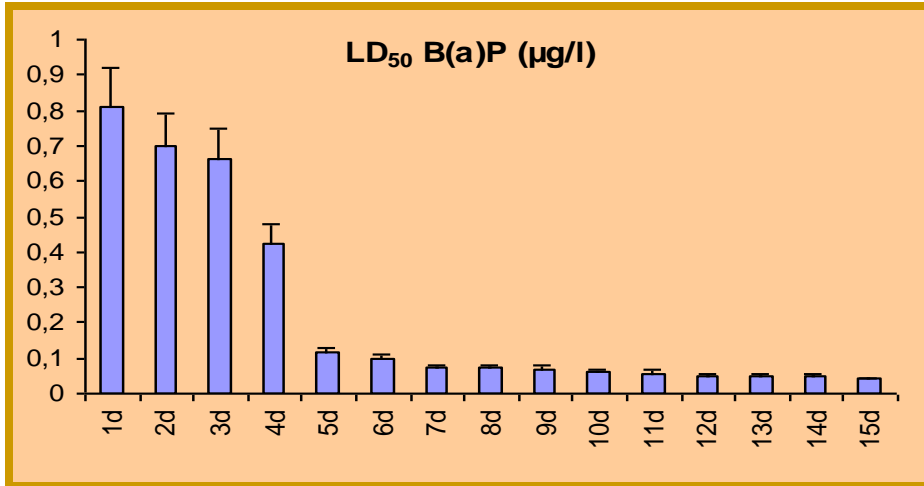
Se observa un
fallo generalizado
del sistema
circulatorio.



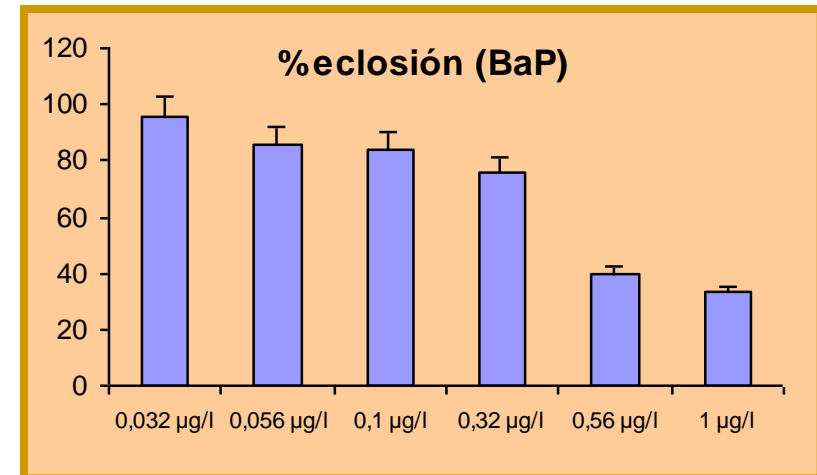
Extravasación
sanguínea

Toxicidad en larvas

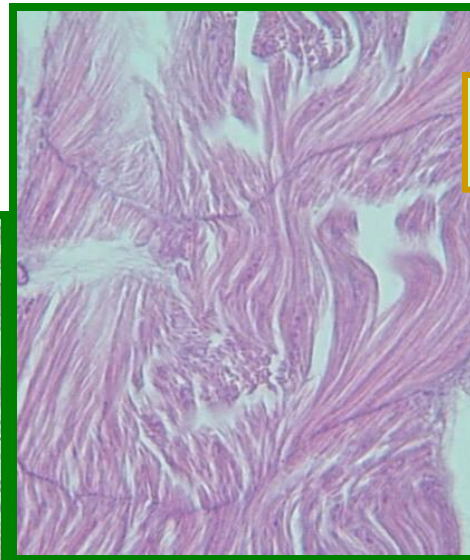
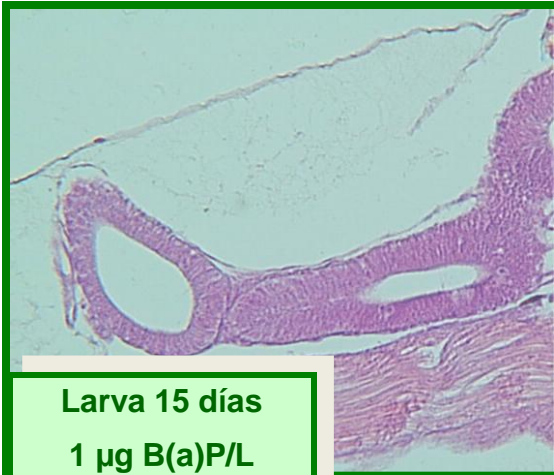
Ejemplares expuestos a B(a)P



Desorganización musculatura troncal

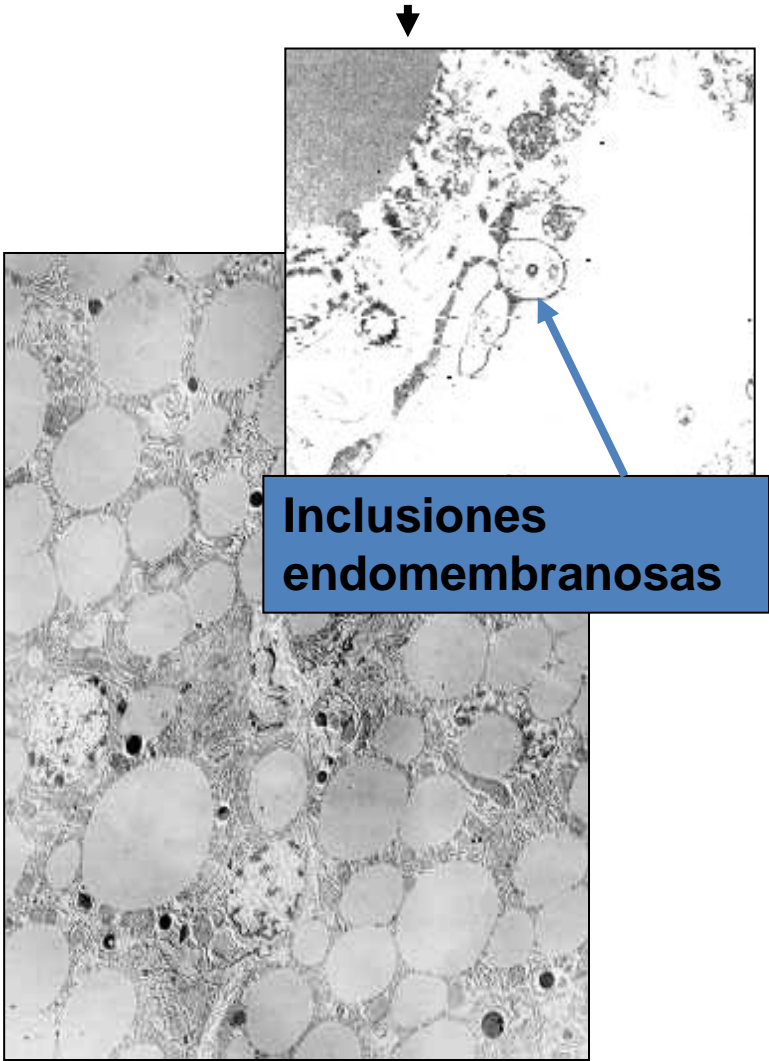
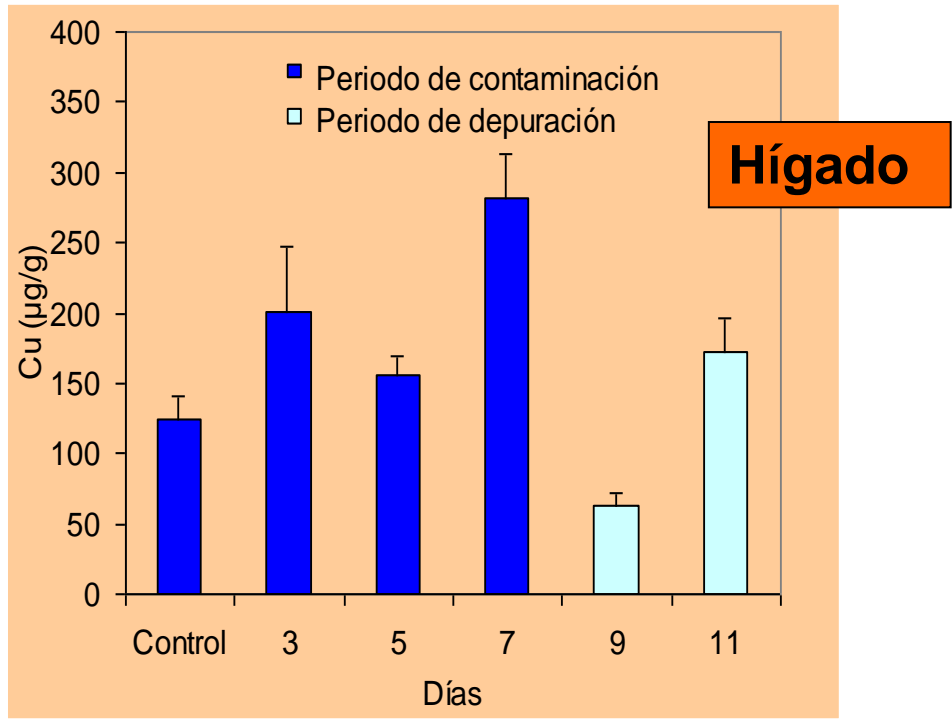


Edema subcutáneo



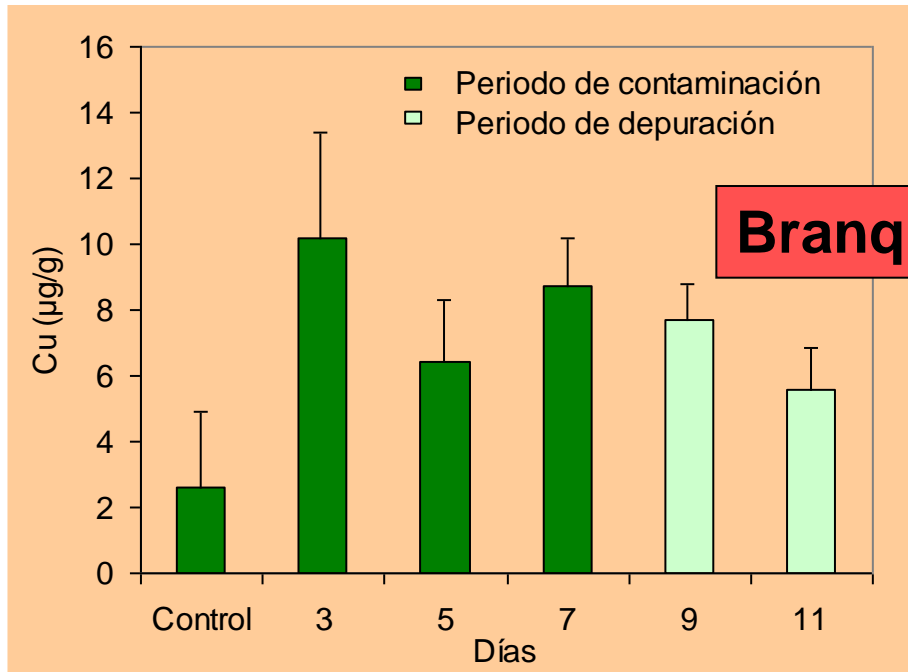
Alteraciones por cobre

Capa endotelial y *microvilli* alterados



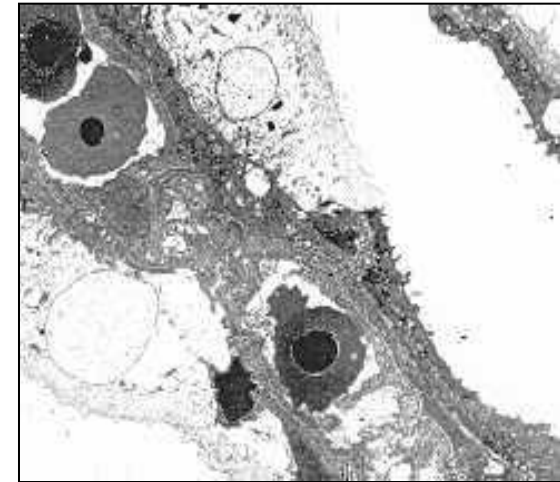
Aumento de número de gotas lipídicas en los hepatocitos que podrían indicar una alteración del metabolismo lipídico o un cambio parcial en su morfología.

Alteraciones por cobre

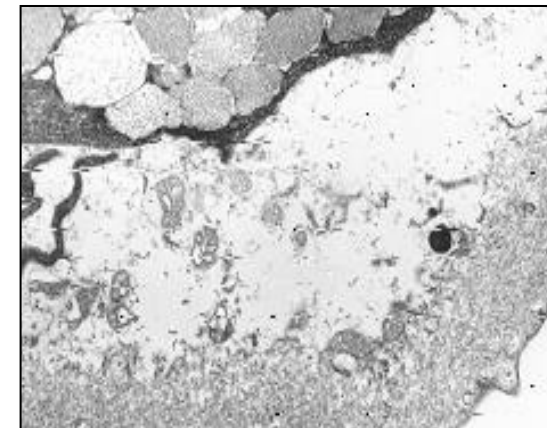


Branquias

Separación del epitelio

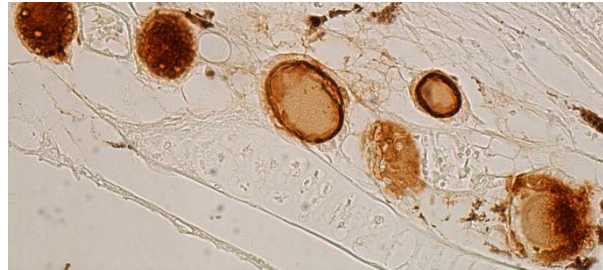
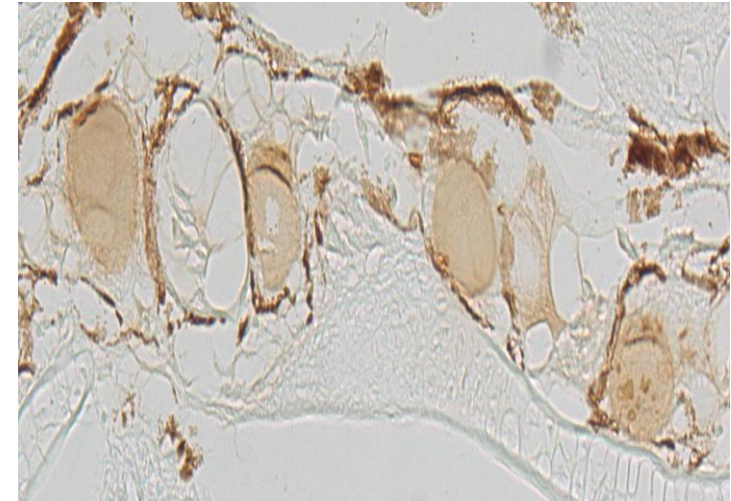
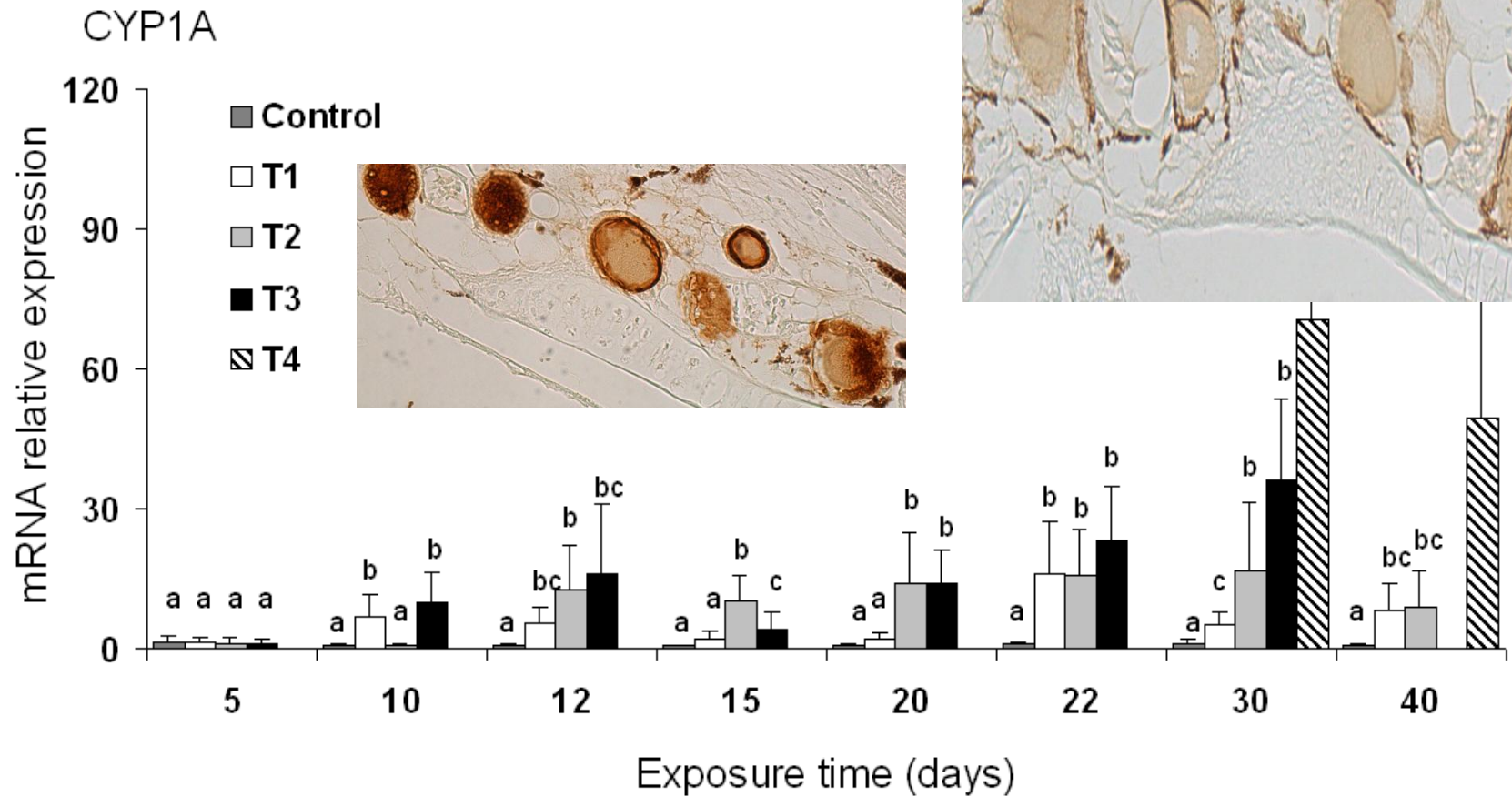


Hipertrofia en células pavimentosas



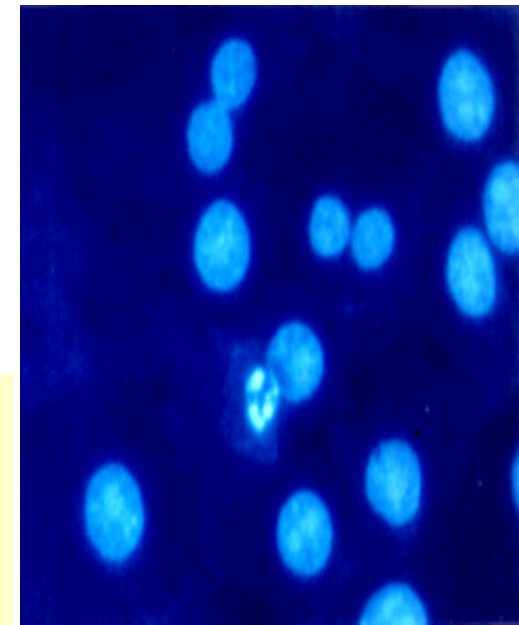
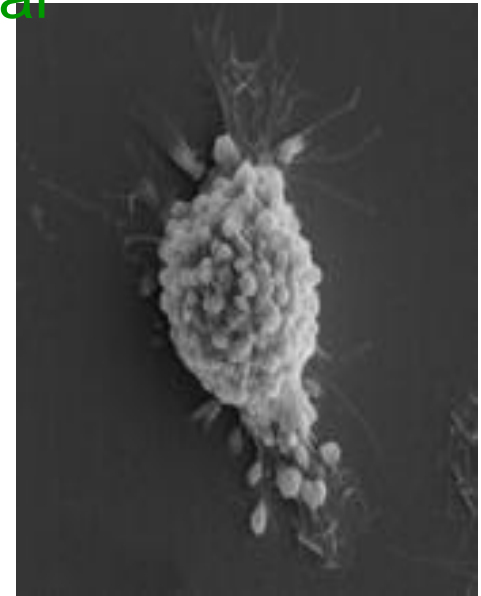
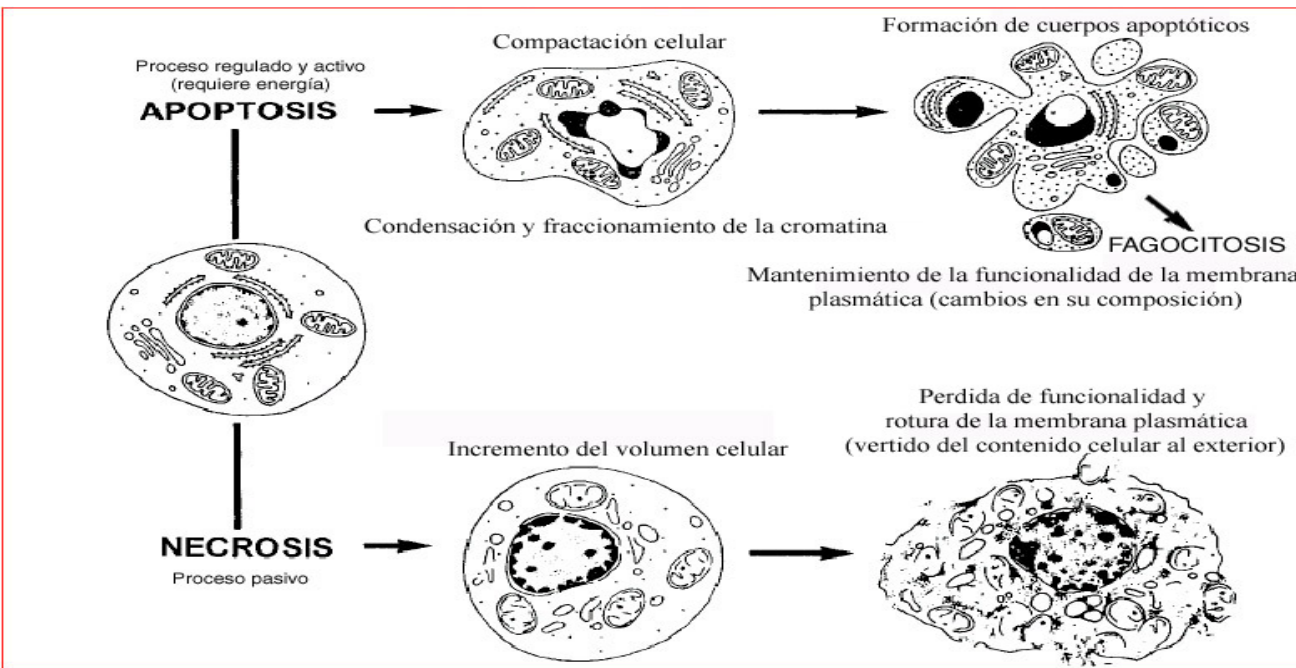
Estos cambios histológicos parecen aumentar la distancia que los contaminantes, procedentes del agua, deben atravesar para alcanzar el torrente sanguíneo.

Efectos del 3-metilcolantreno-3MC en la metamorfosis del lenguado senegales



Biomarcadores de Salud y/o Enfermedad:

Apoptosis versus Necrosis y Proliferación Celular



Durante la reproducción, embriogénesis, desarrollo, así como en procesos teratogénicos o tumorales, los procesos de diferenciación celular (PCNA) y apoptosis o « muerte celular genéticamente programada ». son esenciales para

La apoptosis está frenada en procesos fisiológicos de crecimiento y activada durante la diferenciación neuronal, germinal y somática y/o en procesos tumorales.

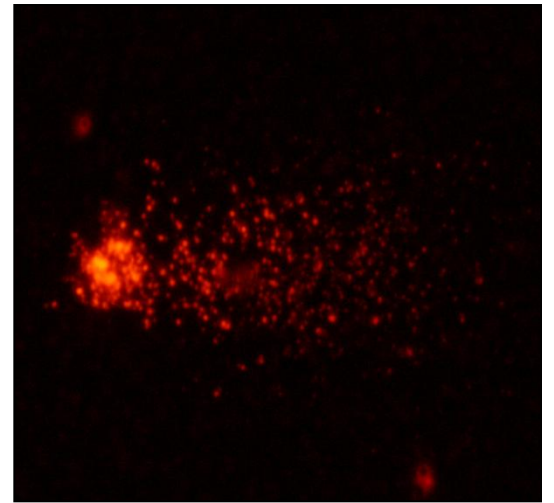
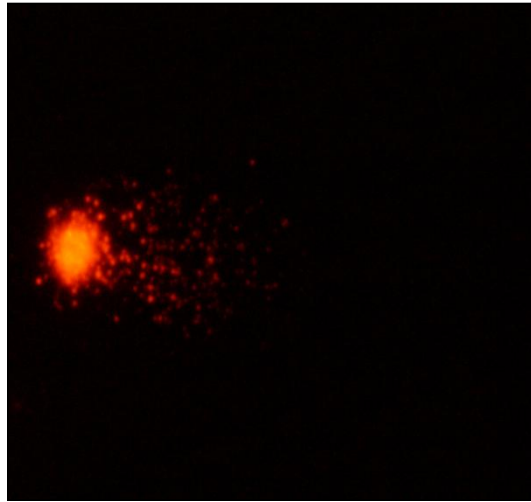
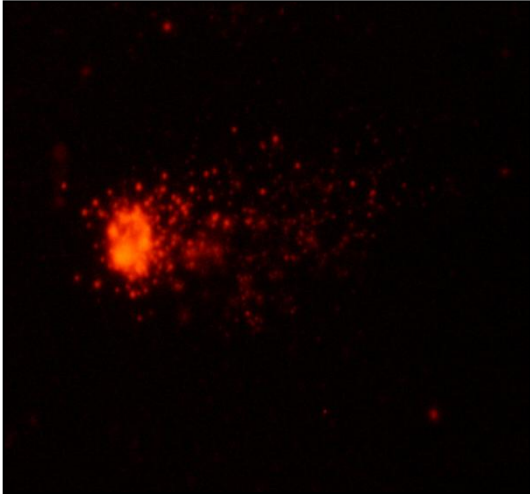
ENSAYO COMETA:

El Ensayo Cometa, es un método que permite extraer el ADN de la célula para evaluar los daños presentes en él, ha dado luz sobre la relación existente entre las afectaciones que puede sufrir el material genético y la aparición de enfermedades como el cáncer. Igualmente ha permitido apreciar las posibilidades reales que existen para la reparación de muchos de los perjuicios ocasionados al ADN.

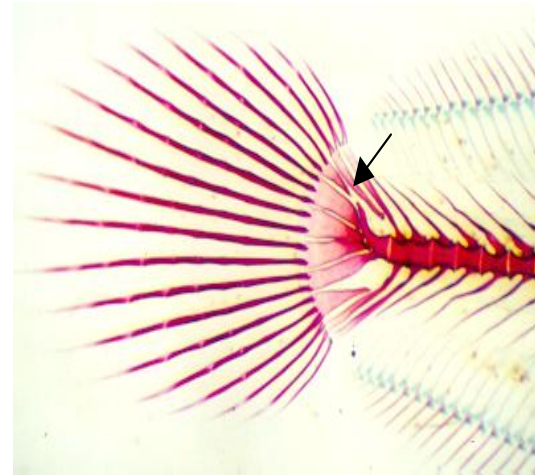
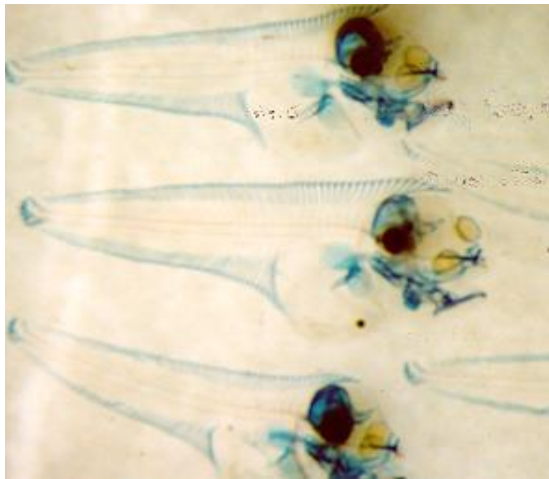
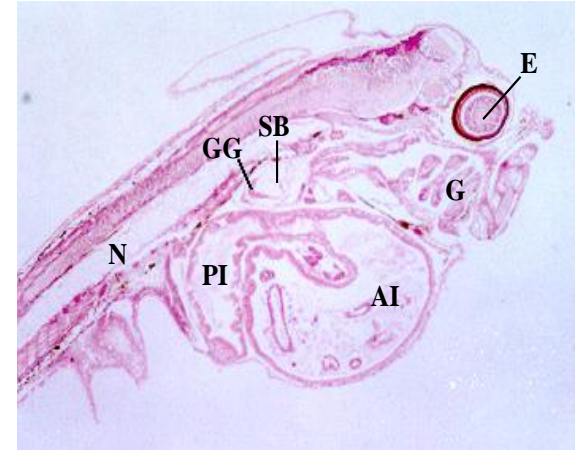
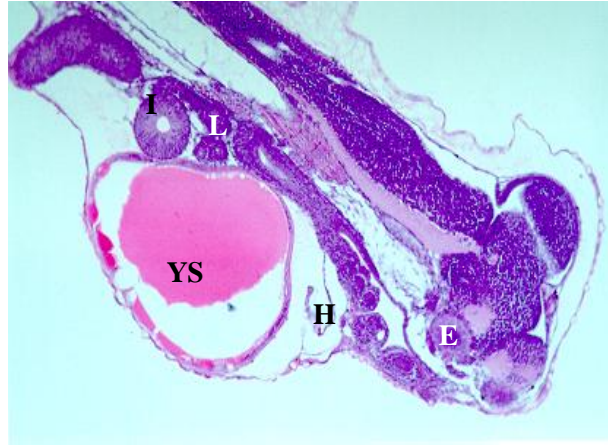
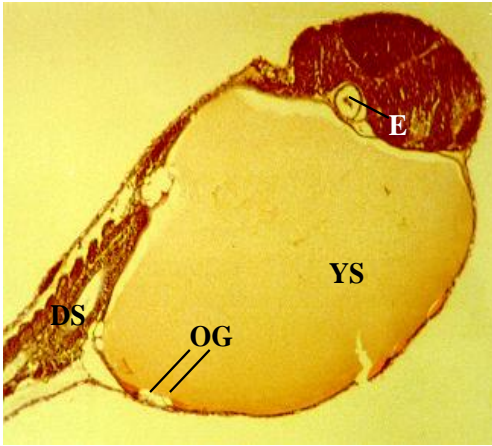
—En qué consiste el Ensayo?

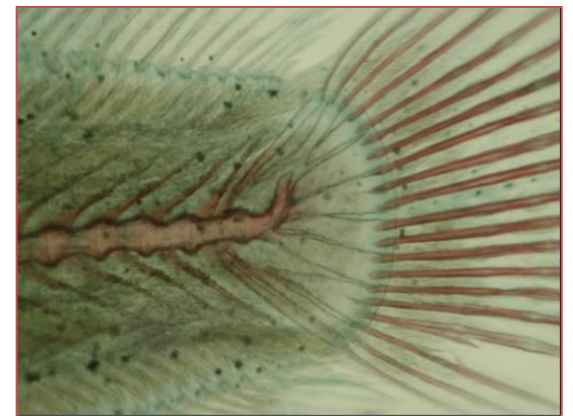
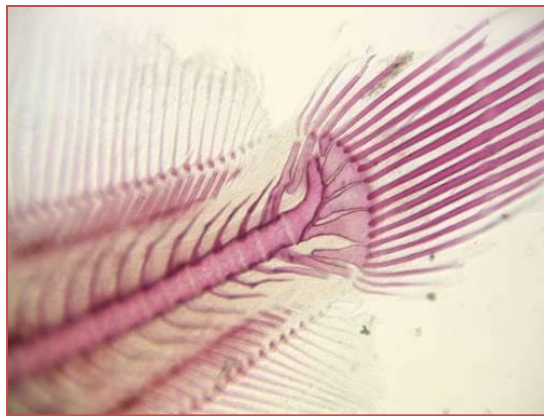
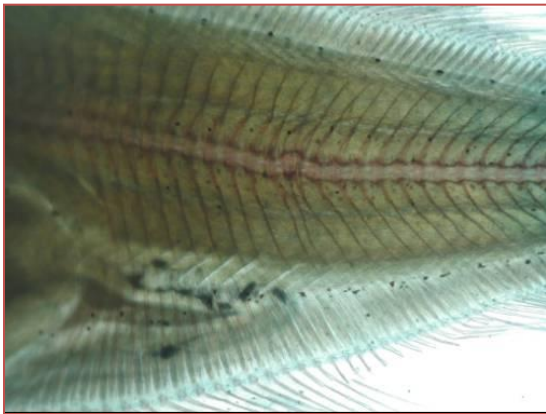
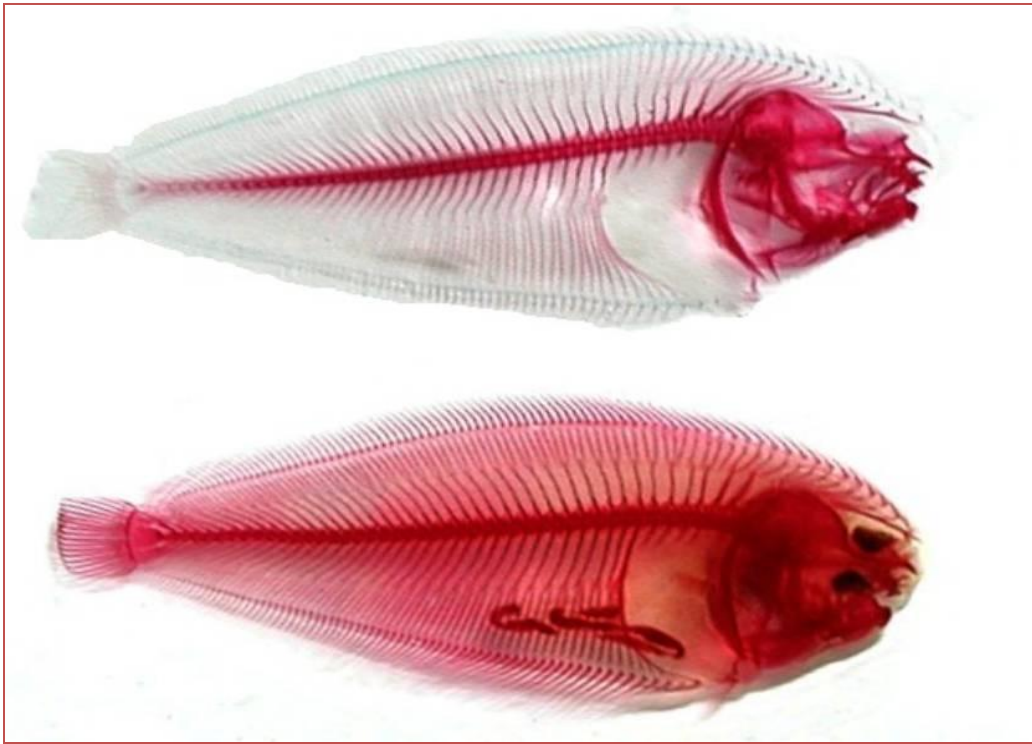
—Es un método muy simple. Células como los linfocitos (o cualquier otra con núcleo que se quiera estudiar), son impregnadas de una especie de gelatina y luego colocadas sobre la lámina de un microscopio. Allí son sometidas a procesos de lisis (Proteinasa K) para romper la membrana celular. Finalmente es expuesta a un campo eléctrico/electroforesis que hace salir al ADN del núcleo celular. Finalmente se tiñe con bromuro de etidio/fluorescente.

Al ocurrir esto se obtiene una imagen semejante a la de un cometa y según sea la magnitud de su 'cola' podrá calcularse el nivel de daño de la célula: mientras más grande, mayor es la afectación.



Histología e Histoquímica como Biomarcador Celular: Ontogenia, osificación.





□ Biomarcadores celulares del estado nutricional en estadias tempranas de peces

Intestino

Intestino funcional: inclusiones lipídicas, proteicas en los enterocitos

Inclusiones lipídicas:

No se consideran parte del RE o el aparato de Golgi y en muchos casos no se rodean de membrana



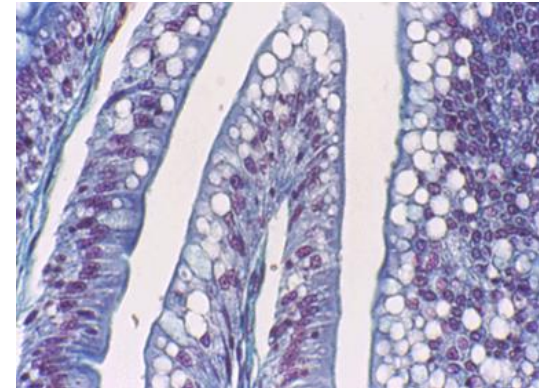
Almacén temporal en forma de ácidos grasos re-esterificados cuando:

- la absorción de lípidos excede la tasa de síntesis de lipoproteínas
- incapacidad de metabolizar lípidos

Presencia de abundantes inclusiones lipídicas (esteatosis):

- Fallo en síntesis de lipoproteínas
- Enterocitos inmaduros
- Dietas formuladas con elevado contenido en ácidos grasos

Puede causar abrasión epitelial, necrosis celular y/o reacción inflamatoria



□ **Biomarcadores celulares del estado nutricional en estadias tempranas de peces**

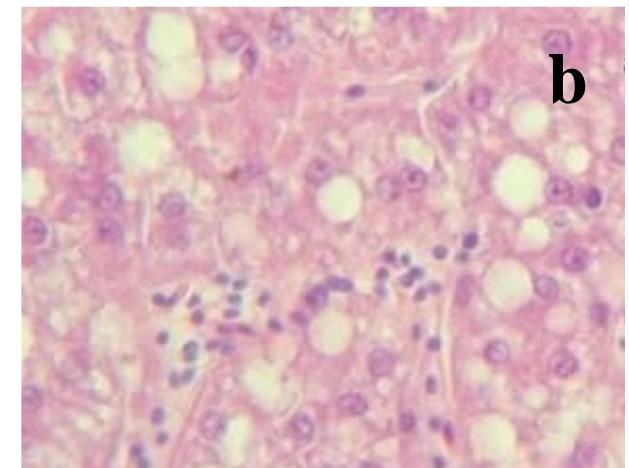
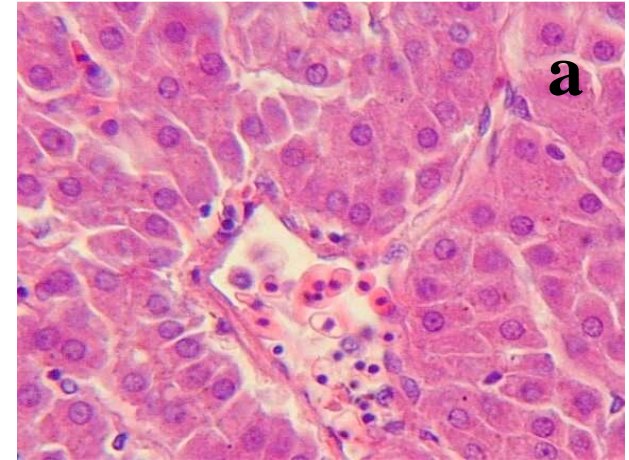
Hígado

Cambios morfológicos hepáticos durante la alimentación exógena:

Incremento de vacuolización citoplasmática por acumulación de:

- Glucógeno (PAS positivo y Diastasa/PAS negativo)
- Lípidos neutros

Desplazamiento del núcleo a la periferia en función del material almacenado



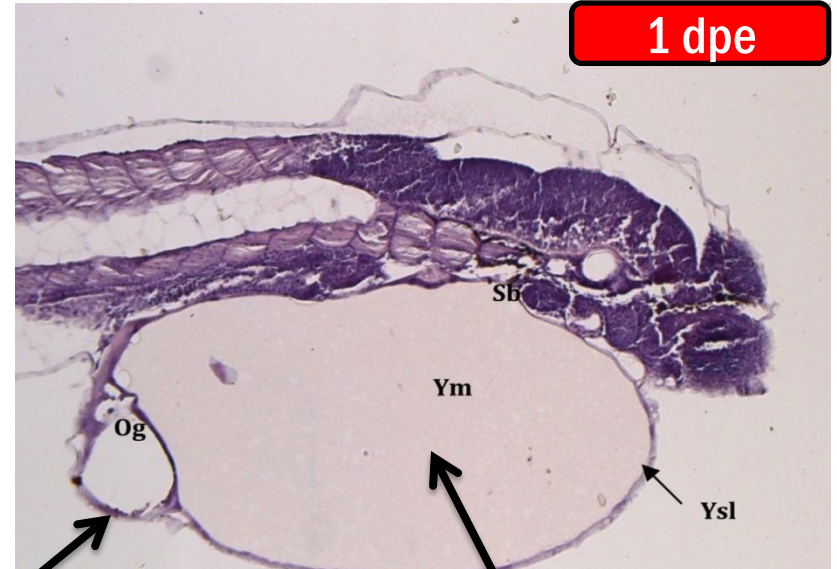
ETAPA ENDOTRÓFICA

0-5 dpe

0 dpe



1 dpe



Tracto digestivo: segmento tubular recto
Boca y ano cerrados

Gota de grasa

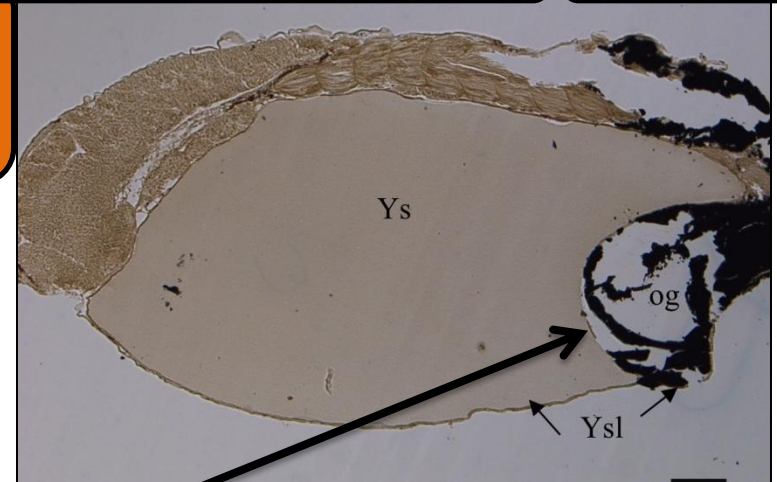
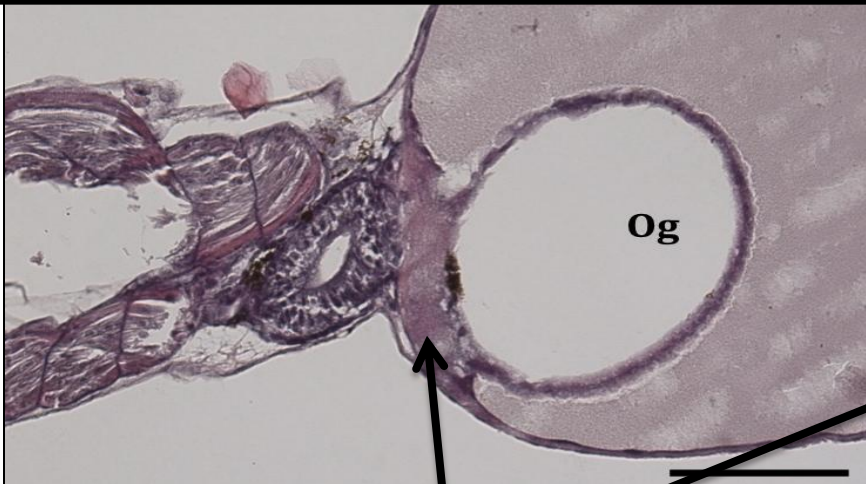
Saco vitelino acidófilo

| | Glicoconjugados neutros | Glicoconjugados Carboxilados | Glicoconjugados sulfatados | Glucógeno | Proteínas |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------|-----------|
| Saco vitelino/gota lipídica | 2-3/0 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 3/3 |

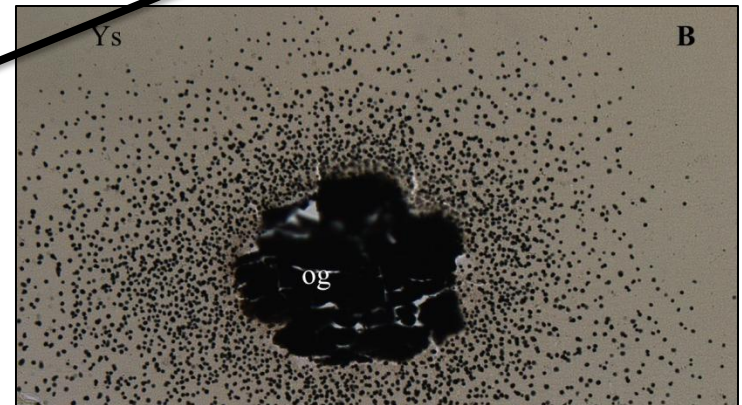
ETAPA ENDOTRÓFICA

0-5 dpe

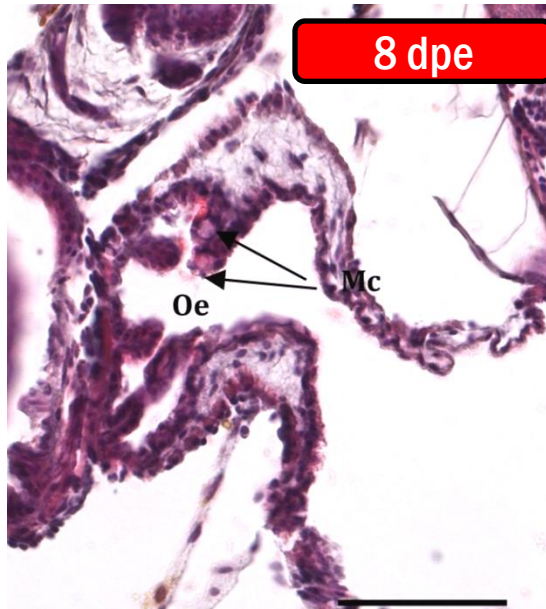
GLÓBULOS LIPÍDICOS: principal soporte de energía (lípidos no polares) durante la transición a la fase de alimentación exógena



Capa sincitial o periblasto rodeando al saco vitelino y gota de grasa (movilización de lipoproteínas)



Causas de la no adherencia:
Alimentación inadecuada (reproductores, larvas)
Condiciones ambientales no óptimas (temperatura, iluminación aireación)



ETAPA ENDO-EXOTRÓFICA

6-10 dpe

Gota de grasa ligada



Gota de grasa no ligada

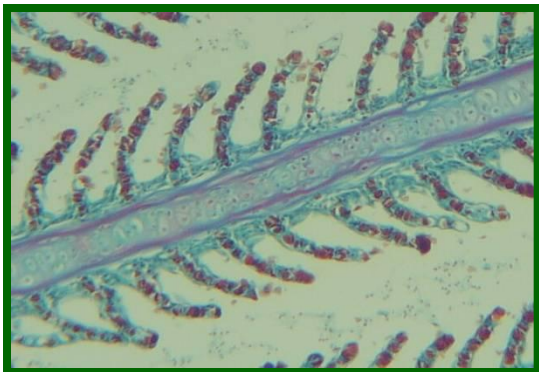


El contenido en lípidos no polares de la gota de grasa tiene un papel fundamental en el desarrollo larvario normal y funcionamiento de los sistemas neural y visual

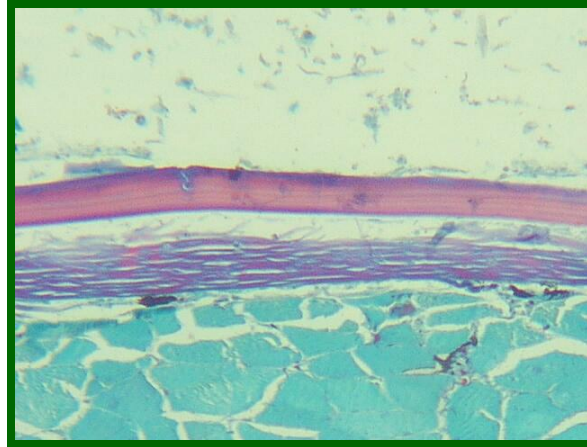
Histopatología: Hongos



Gran secreción mucosa en superficie bronquial



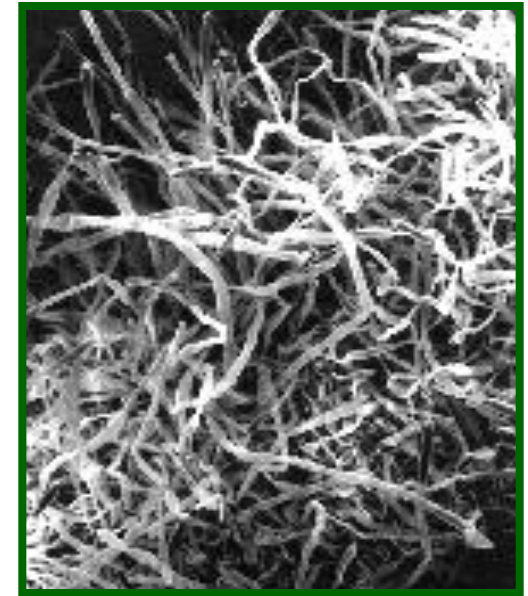
Hiperemia de capilares



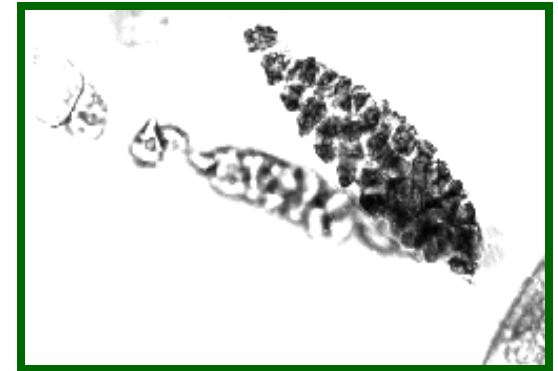
Erosión en piel, producida por el hongo



Esporangio visto al M.E.



Micelio del hongo de género *Saprolegnia*

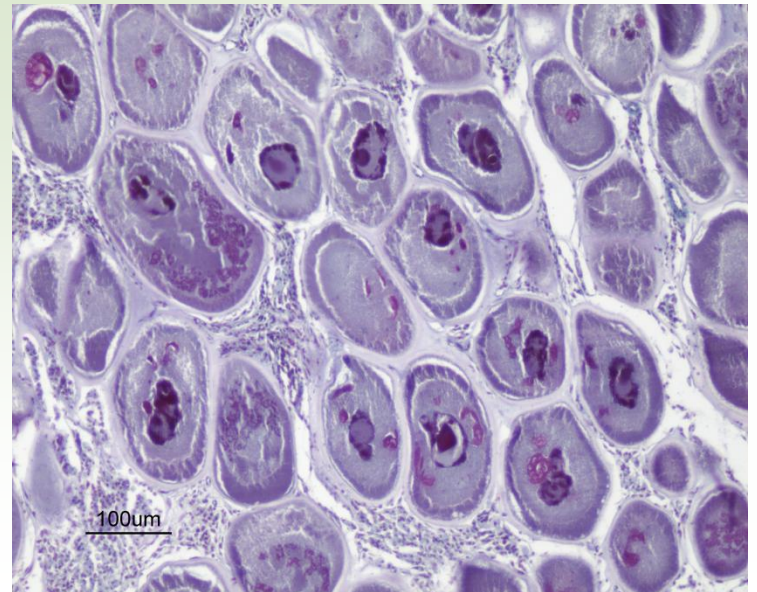
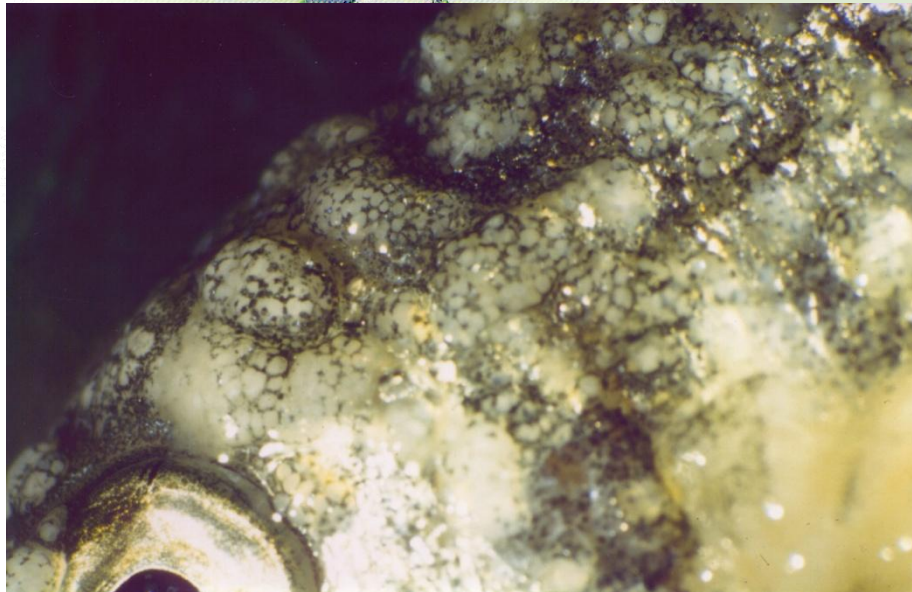
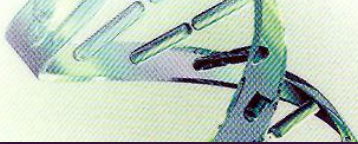
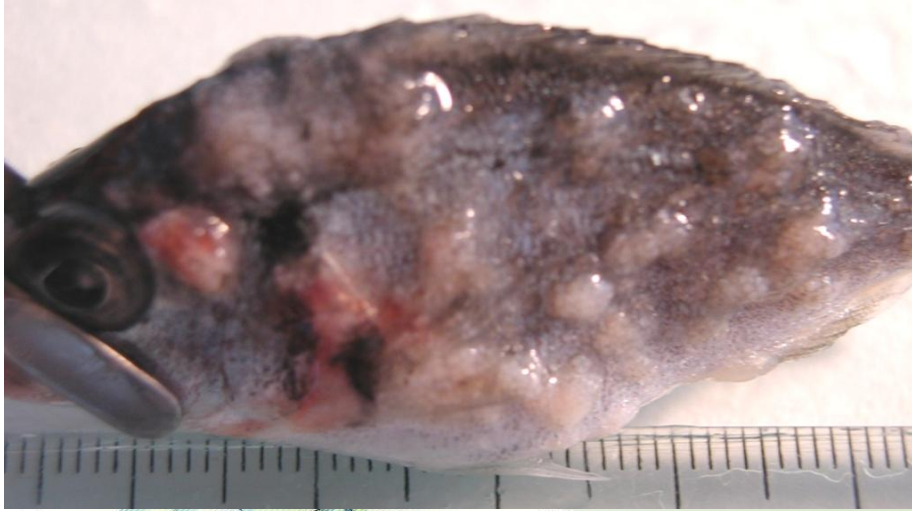


Esporangio maduro, con esporas en el interior

La enfermedad de linfocistis



La enfermedad de linfocistis se caracteriza por la aparición de pequeños nódulos en la piel y aletas de los peces, constituidos por células hipertrofiadas del tejido conectivo intersticial. Ha sido descrita en más de 125 especies distintas de teleósteos, tanto peces marinos como de agua dulce. En las costas mediterráneas aparece como una enfermedad habitual en las piscifactorías de dorada (*Sparus aurata*) y lenguado (*Solea senegalensis*) co-cultivado.



Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

1.- Obtención de anticuerpos monoespecíficos

Aislados del virus de linfocistis (LCDV)

Patrón electroforético anti-LCDV-2

Proteínas A, B y C

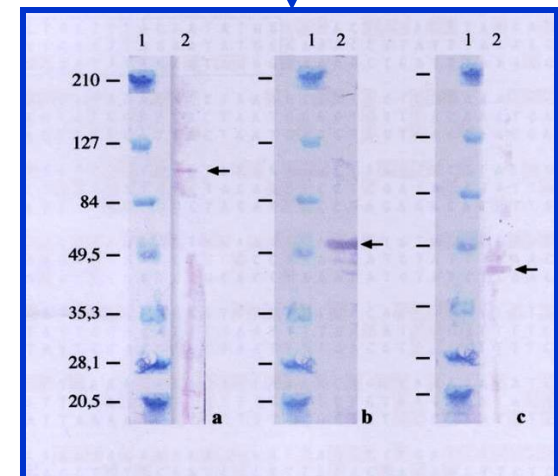
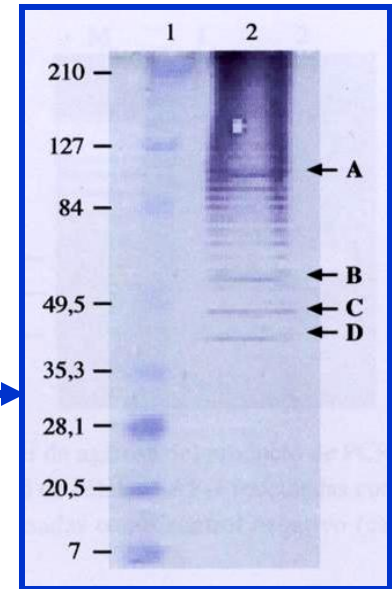
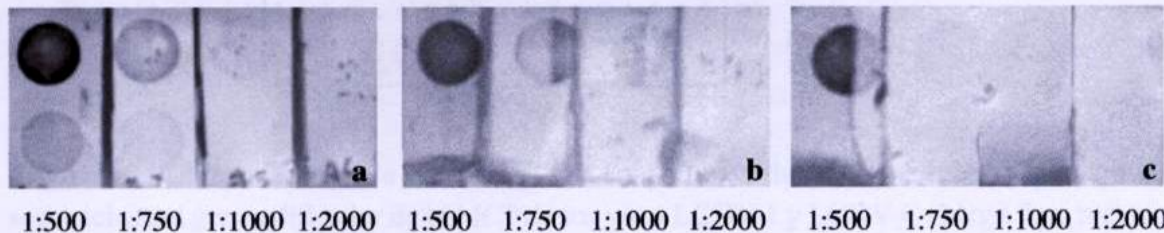
Proteínas:

A (Pm 108 Kda.)
B (Pm 60,1 Kda.)
C (Pm 49,3Kda.)
D (Pm 42,6 Kda.)

Producción de anticuerpos

Especificidad de Antisueros:

- Diluciones: 1:500, 1:750, 1:1000, 1:2000.
- Control (-): extractos celulares sin inocular.



Diagnóstico Molecular de Linfquistis

2.- Obtención de sonda ADN específica para el LCDV

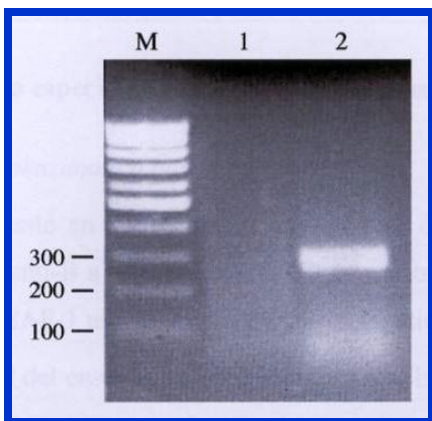
Sonda

Fragmento del gen codificador de la proteína mayoritaria de la cápside (MCP) del aislado 2 de LCDV.

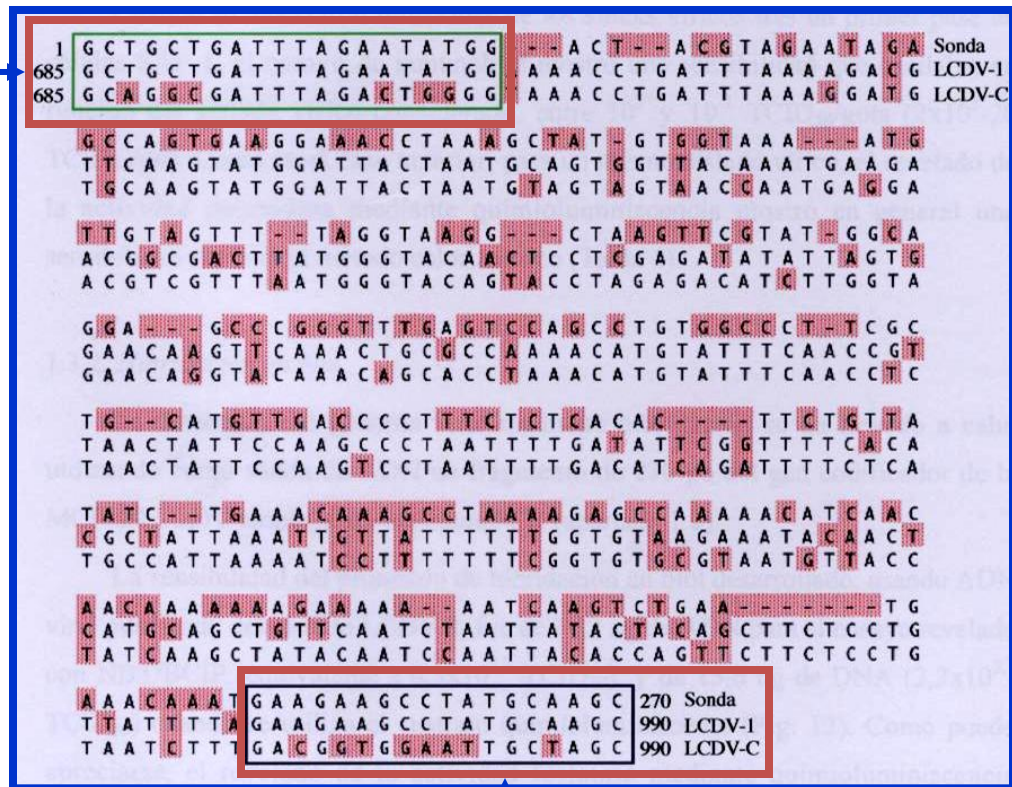
Cebadores diseñados a partir de la secuencia de MCP de LCDV-1

Clonado en pGEM-T Easy y secuenciado con un tamaño de 270 pb.

PCR



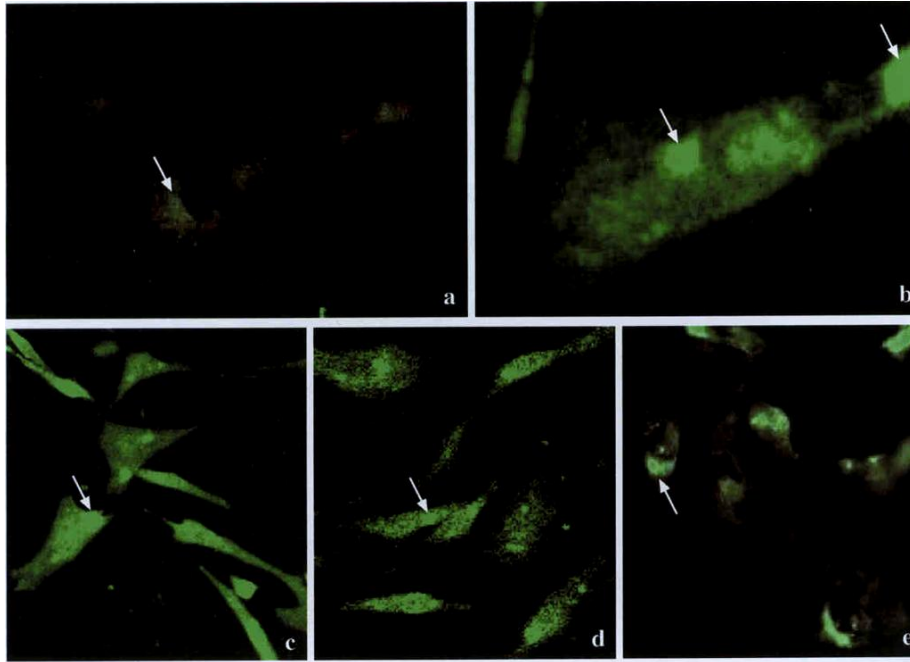
Fragmento <300 pb.



Cálculo divergencia: alineamiento múltiple entre la sonda y la MCP de LCDV-1 y LCDV-C:
 - Sonda/LCDV-1, 34.1%; Sonda/LCDV-C, 23.7%; LCDV-1/LCDV-C, 71.6%.

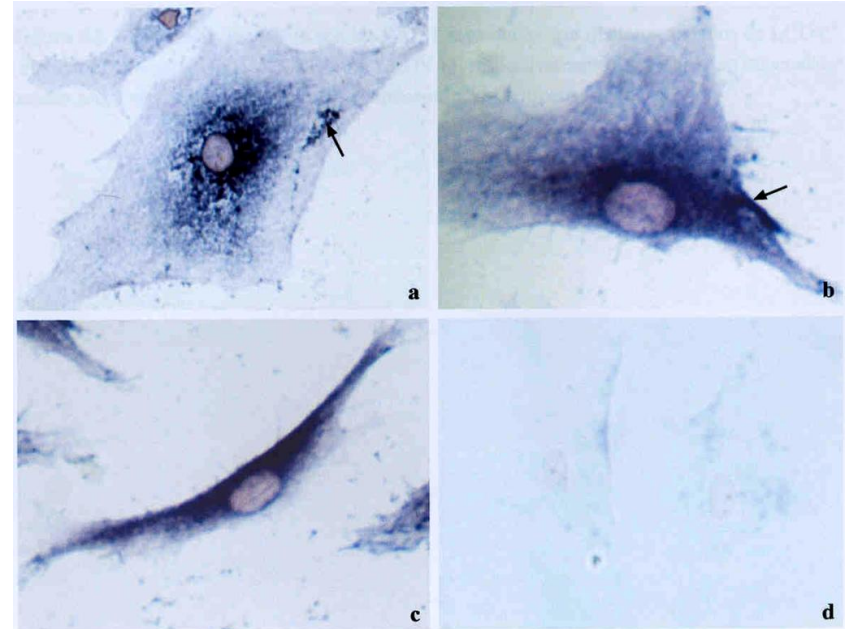
Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

6.- Técnicas de detección *in situ*



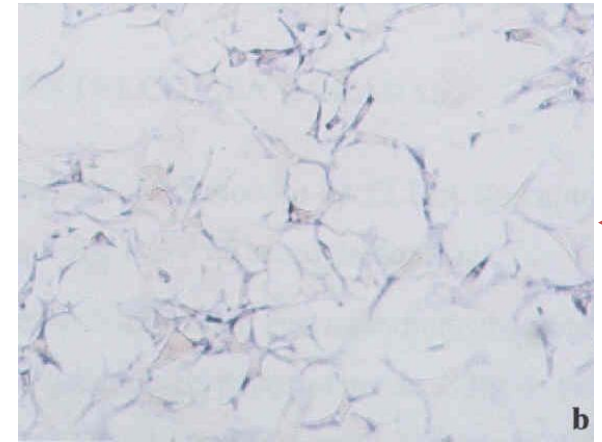
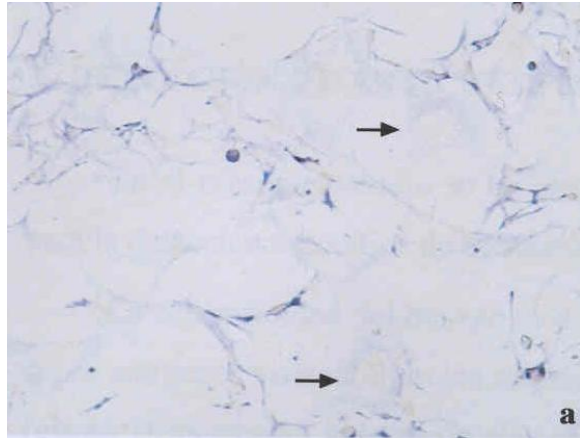
Detección del antígeno de la LCDV en células SAF-1 mediante inmunofluorescencia. Señal localizada en torno al núcleo o en forma de inclusiones citoplasmáticas.

Detección de antígenos víricos en células SAF-1 inoculadas con distintos aislados del virus LCDV en forma de inclusiones citoplasmáticas. (d) células no inoculadas.

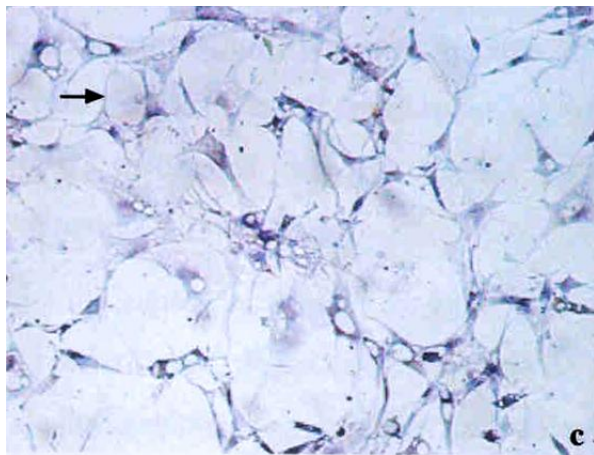


Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

6.- Técnicas de detección *in situ*



Hibridación *in situ* de células SAF-1 inoculadas con aislados de LCDV. (d) células no infectadas, control negativo.



Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

8.- Patogénesis de LCDV en doradas

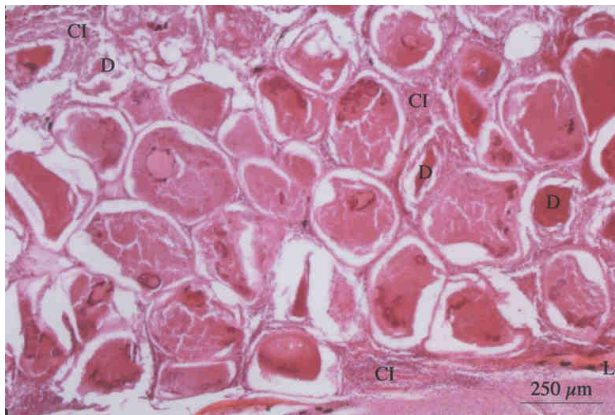
8.1.- Detección del virus en homogeneizados de tejidos

| Órgano | Peces asintomáticos | | | Peces enfermos | | | Peces recuperados | | |
|------------|---------------------|------|-------|----------------|------|-------|-------------------|------|-------|
| | PCR | nPCR | nPCR+ | PCR | nPCR | nPCR+ | PCR | nPCR | nPCR+ |
| Piel/Aleta | - | + | ++ | + | +++ | +++ | - | + | ++ |
| Branquias | - | - | - | + | ++ | +++ | - | - | - |
| Intestino | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Hígado | - | - | + | + | ++ | +++ | - | + | NE |
| Bazo | - | ++ | +++ | + | +++ | +++ | - | +++ | NE |
| Riñón | - | +++ | +++ | + | ++ | +++ | - | ++ | NE |

nPCR: nested-PCR; nPCR+: nested-PCR seguido de hibridación en blot.
 -: reacción negativa.
 + / ++ / +++: reacción positiva débil, moderada o fuerte, respectivamente.
 NE: No ensayado.

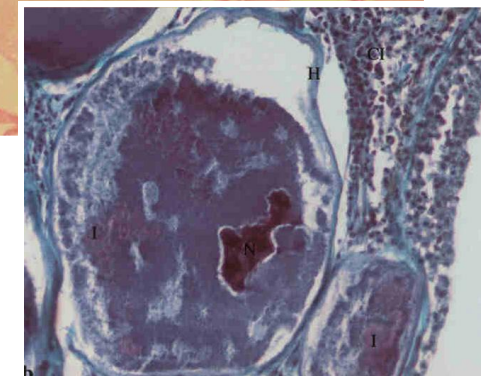
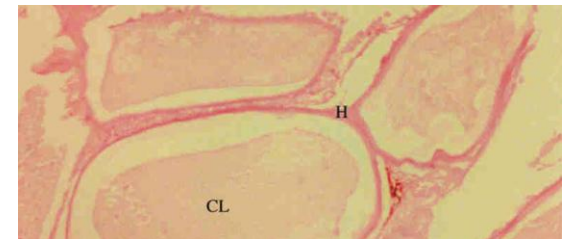
ADN viral en peces enfermos mediante PCR y nested-PCR. Detección en **Piel/Aleta, Bazo y Riñón** en peces asintomáticos/recuperados y enfermos además de **Branquias, Intestino e Hígado** en peces enfermos.

8.2.- Estudios histopatológicos



Piel de aleta caudal con nódulos de linfocistis.

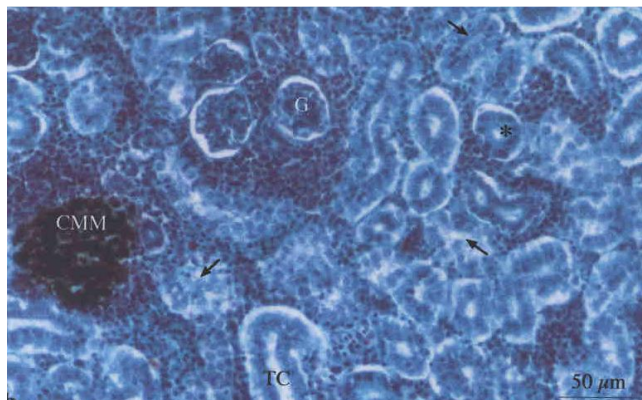
Detalle de linfocistes mostrando la cápsula hialina PAS-positiva, núcleo e inclusiones intracitoplasmáticas.



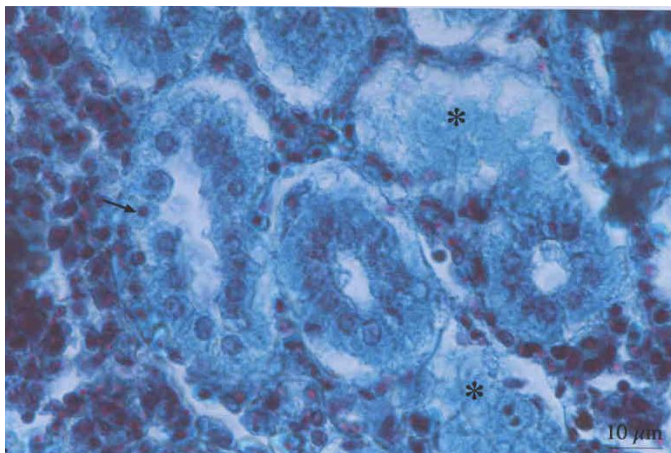
Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

8.- Patogénesis de LCDV en doradas

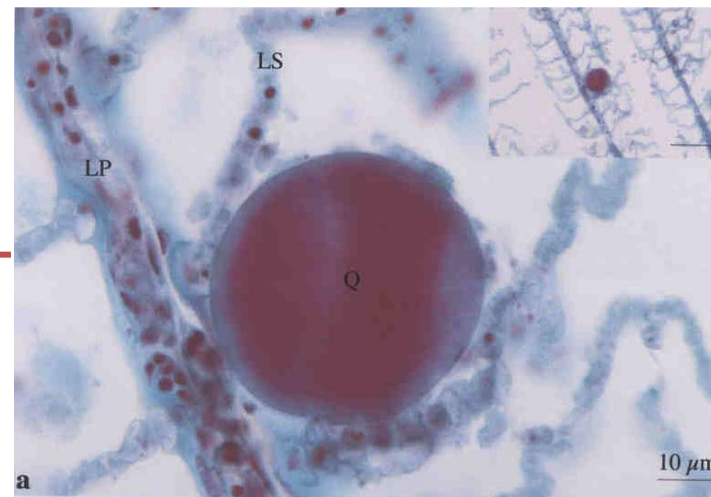
8.2.- Estudios histopatológicos



Necrosis en túbulos renales y obstrucción de los mismos.



Quiste en epitelio branquial

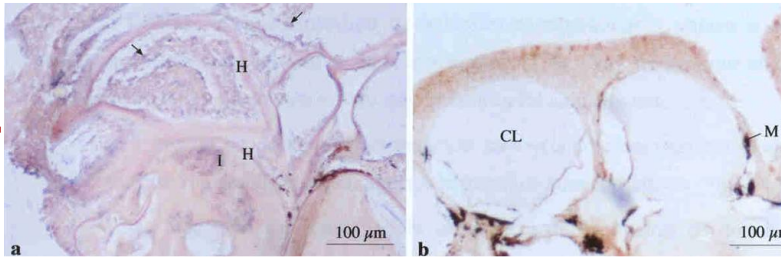


Núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática y necrosis hialina a nivel de túbulos renales.

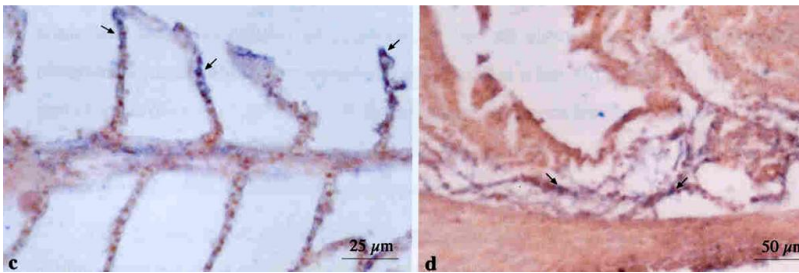
Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

8.- Patogénesis de LCDV en doradas

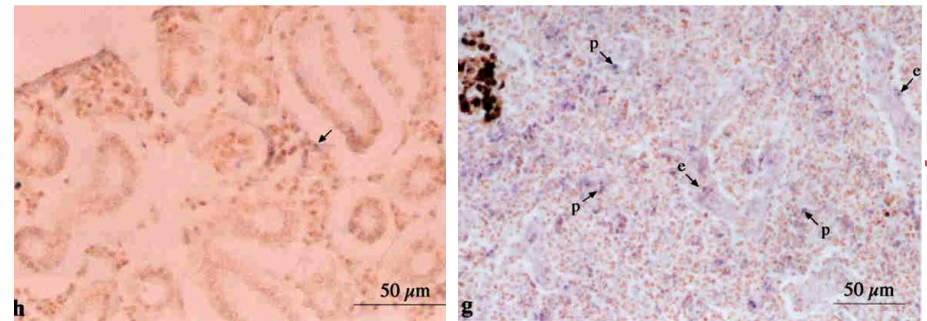
8.3.- Detección del virus en secciones histológicas



Immunolocalización del virus en linfocitos (a) de ejemplares asintomáticos en forma de inclusiones intracitoplasmáticas y células inflamatorias. Ejemplares enfermos no mostraron inmunoreactividad (b).



Immunolocalización del virus en células de laminillas secundarias branquiales (a) y lámina propia intestinal (b).



Immunotinción en células intersticiales renales (a) y en elipsoides y pulpa esplénicos (b).

Immunolocalización del virus en hígado de dorada asintomática (a). Obsérvese inmunotinción negativa en hígado de dorada enferma (b).

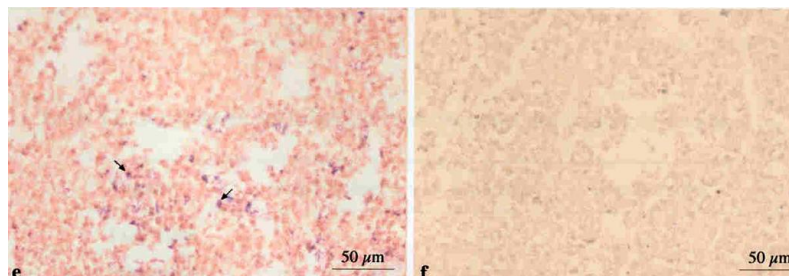
| Órgano | Asintomáticos | Enfermos | Recuperados |
|------------|---------------|----------|-------------|
| Piel/Aleta | ++ | +++ | + |
| Branquias | +/- | ++ | + |
| Intestino | + | ++ | NE |
| Hígado | + | - | (+/-) |
| Bazo | ++ | ++ | (+) |
| Riñón | +/- | NE | - |

-: inmunotinción negativa.

+/-, +, ++, +++: grados de intensidad de la inmunotinción.

Entre paréntesis, señal localizada en acúmulos.

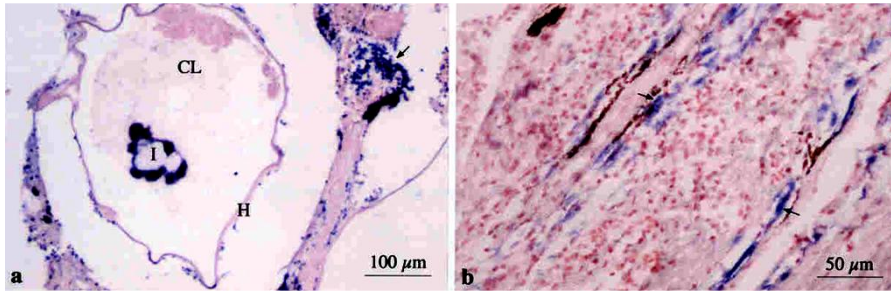
NE: No ensayado.



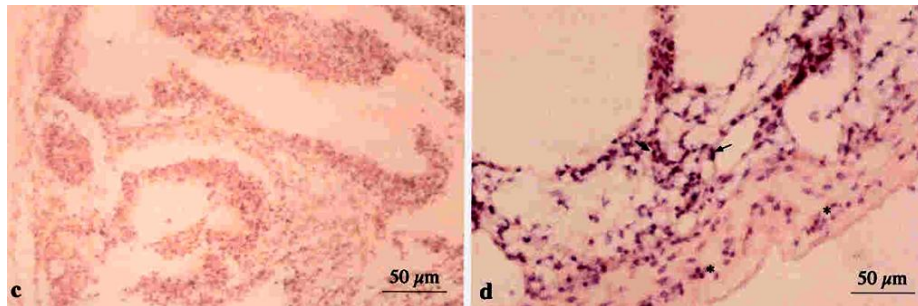
Diagnóstico Molecular de Linfoquistis

8.- Patogénesis de LCDV en doradas

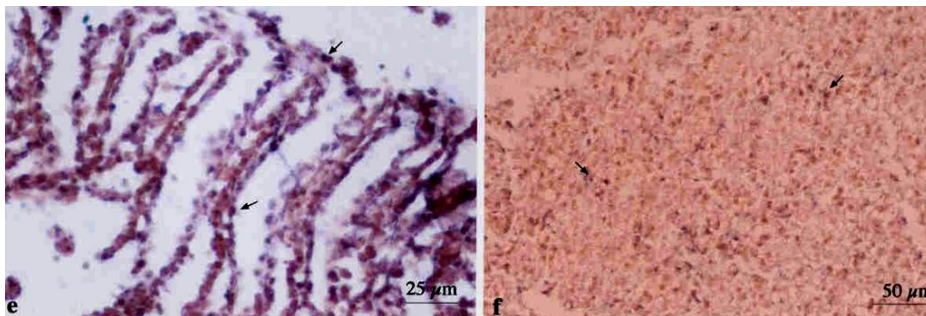
8.4.- Hibridación *in situ*



Piel: Genoma viral en linfocistis (a) y fibroblastos (b).



Intestino: asintomático negativo (a) y enfermo en muscularis mucosae (b).



En pulpa esplénica (a) y células intersticiales renales (b).

Células positivas en laminillas secundarias branquiales y en hígado (b).

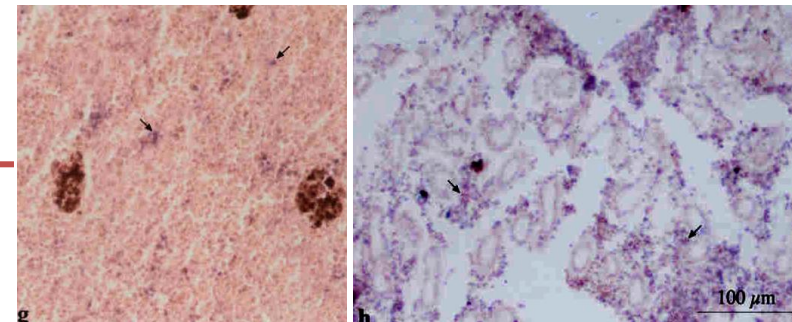
| Órgano | Asintomáticos | Enfermos | Recuperados |
|------------|---------------|----------|-------------|
| Piel/Aleta | NE | +++ | NE |
| Branquias | - | ++ | NE |
| Intestino | - | +++ | - |
| Hígado | - | (+/-) | ++ |
| Bazo | + | + | ++ |
| Riñón | ++ | ++ | + |

-: señal de hibridación negativa.

+/-, +, ++, +++: grados de intensidad de la señal de hibridación.

Entre paréntesis, señal localizada en acúmulos.

NE: No ensayado.







Gracias Por Su Atención