

**CUANTIFICACIÓN Y ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS  
PRODUCIDAS POR CONCENTRACIONES SUBLETALES DE COBRE EN  
*Fundulus heteroclitus***

**QUANTIFICATION AND HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS  
PRODUCED BY SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF COPPER IN  
*Fundulus heteroclitus***

J.B. Ortiz<sup>1</sup>  
M.L. González de Canales<sup>1</sup>  
C. Sarasquete<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología  
Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Cádiz  
Polígono Río San Pedro s/n  
11510 Puerto Real, Cádiz, España

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC  
Polígono Río San Pedro  
Apartado Oficial, 11510 Puerto Real, Cádiz, España  
E-mail: carmen.sarasquete@icman.csic.es

*Recibido en junio de 1998; aceptado en octubre de 1998*

**RESUMEN**

Ejemplares de *Fundulus heteroclitus* alimentados y mantenidos en inanición fueron expuestos a concentraciones subletales de cobre ( $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ) durante un periodo de 30 días. Se estudió la acumulación de cobre, así como las alteraciones histopatológicas producidas en las branquias y en el hígado. El hígado, tanto en los organismos alimentados como en los mantenidos en ayuno, presentó acumulación progresiva hasta los 30 días, con mayores niveles en ejemplares sometidos al ayuno. Por otro lado, en las branquias se detectó también acumulación de cobre, presentando el grupo de organismos expuestos de 15 a 30 días (alimentados y sometidos a inanición) diferencias significativas ( $P < 0.005$ ) con respecto al grupo control y los tratados durante 2 días. Las principales alteraciones histopatológicas fueron: vacuolización del parénquima hepático, descamación del epitelio branquial, telangiectasia lamelar, así como necrosis branquial y hepática. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la importancia del estado nutricional de peces, como modificador de la respuesta de los mismos a los efectos subletales producidos por la exposición a cobre.

*Palabras clave:* cobre, acumulación, ayuno, efectos histopatológicos, *Fundulus heteroclitus*.

**ABSTRACT**

Fed and starved *Fundulus heteroclitus* specimens were exposed for 30 days to sublethal copper concentrations ( $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ). The accumulation of copper and histopathological effects on the liver and gills were studied. In both fed and starved specimens, the liver showed a progressive copper

accumulation during the experimental period (from 2 to 30 days), with higher levels of copper in the liver of starved fish. Copper accumulation was also detected in the gills, and the specimens exposed to copper for 15 to 30 days (both fed and starved) showed significant differences ( $P < 0.005$ ) with respect to the control group and the 2-day treated fishes. The main histopathological alterations were: vacuolization of hepatic parenchyma, desquamation of gill epithelia, lamellar telangiectasia, as well as hepatic and branchial necrosis. The results of this paper provide evidence that the nutritional status of the fish has great importance in modifying its response to sublethal copper effects.

*Key words:* copper, accumulation, starvation, histopathological effects, *Fundulus heteroclitus*.

## INTRODUCCIÓN

El medio acuático es el último receptor de las sustancias que son vertidas al océano como consecuencia de la actividad antropogénica, dando lugar a que las concentraciones de determinados contaminantes se incrementen, sobre todo en las zonas litorales y estuáricas. Los vertidos que se realizan en estas zonas son de naturaleza muy diversa: detergentes, pesticidas, fertilizantes, hidrocarburos, compuestos radioactivos, metales pesados, etc. Los metales pesados engloban a un amplio conjunto de sustancias que, en líneas generales, se caracterizan por ser no degradables, tener una elevada persistencia en el medio y por ser susceptibles de ser incorporados por los organismos (Allen-Gil *et al.*, 1997).

Los organismos marinos presentan una relación dinámica con el medio ambiente; por tanto, los metales pesados, en general, son incorporados y excretados por los organismos hasta que se logra un equilibrio. Sin embargo, los factores ambientales, las presiones fisiológicas y el metabolismo de los organismos afectan a los procesos de acumulación y excreción (Bryan, 1971). El cobre, junto con otros metales pesados, es un elemento traza esencial para la vida de los organismos, ya que forma parte de la estructura de más de 30 enzimas y de otras moléculas (oxidases, hidrolasas, metalotioneínas, etc.) (Harris, 1991). A pesar de ser un metal esencial, una cantidad excesiva de cobre resulta tóxico e irritante para los organismos vivos. Entre los efectos producidos por el cobre en peces, podemos citar: la coagulación del moco branquial e inhibición del transporte de oxígeno; destrucción de la

## INTRODUCTION

The ocean is the final recipient of discharges of anthropogenic substances, resulting in elevated concentrations of these contaminants in the littoral and estuarine zones. The nature of the discharges that occur in these areas is very diverse: detergents, pesticides, fertilizers, hydrocarbons, radioactive compounds, heavy metals, etc. Heavy metals encompass a wide range of substances that, in general, are nondegradable, highly persistent in the environment and can be incorporated by organisms (Allen-Gil *et al.*, 1997).

Marine organisms have a dynamic relationship with the environment, and heavy metals are generally incorporated and excreted by the organisms until an equilibrium is reached. However, the environmental factors, physiological pressures and metabolism of the organisms affect the processes of accumulation and excretion (Bryan, 1971). Copper, together with other heavy metals, is a trace element essential for organisms, since it forms part of the structure of more than 30 enzymes and other molecules (oxidases, hydrolases, metallothioneins, etc.) (Harris, 1991). Even though copper is an essential metal, an excessive amount is toxic and irritating to living organisms. Some of the effects produced by copper on fish are: coagulation of the branchial mucus and inhibition of oxygen transport; destruction of vitamin C, due to its role as an active oxidizing catalyst; inhibition of bacterial growth and alteration of the intestinal flora, etc. (Torres *et al.*, 1987; Bunton and Franzier, 1994).

vitamina C, debido a su papel como activo catalizador oxidante; inhibición del crecimiento bacteriano y alteración de la flora intestinal, etc. (Torres *et al.*, 1987; Bunton y Franzier, 1994).

Debido a la incorporación directa de diferentes contaminantes a través de las branquias, los peces experimentan cambios mayores y más rápidos en los niveles de cobre que los vertebrados terrestres. En la homeostasis del cobre participan las metalotioneínas, cuya síntesis, en el hígado, es inducida por diferentes metales pesados (Laurén y McDonald, 1987; Grossell *et al.*, 1998). En diferentes especies de peces, los niveles basales de cobre son superiores en el hígado que en otros órganos como el riñón y branquias (Blasco *et al.*, 1993, 1998; Capeta da Silva, 1997; Grossell *et al.*, 1998).

Según diferentes autores (Möller, 1984; Segner y Storch, 1985; Segner, 1987), la acumulación de diferentes metales pesados en el hígado de peces depende del estado nutricional de los organismos, siendo mayores sus concentraciones en los ejemplares en inanición. Por otro lado, concentraciones subletales de cobre pueden producir alteraciones histopatológicas en órganos y tejidos, como hiperplasias, hipertrofias y aneurismas a nivel branquial, necrosis pancreática y hepática, etc. (Baker, 1969; Eisler y Gardner, 1973; Sultan y Khan, 1983; Ortiz *et al.*, 1996; Capeta da Silva, 1997; Blasco *et al.*, 1993, 1998).

Las respuestas biológicas y ecológicas que se producen frente a determinados contaminantes (orgánicos e inorgánicos) varían desde cambios a nivel poblacional/comunidades, a nivel orgánico/tisular e incluso a nivel molecular (Chavin, 1973). Puesto que los cambios histológicos e histopatológicos producidos por los contaminantes, en órganos/tejidos, pueden presentarse previamente a que se produzcan efectos irreversibles en la biota, los métodos histológicos podrían usarse en combinación con otros parámetros (cuantificación de metales) y biomarcadores ecotoxicológicos (metalotioneínas, glutatión, proteínas de estrés, etc.) como un "sistema de alarma" de gran importancia para la supervivencia de las especies, así como para la protección del medio ambiente.

Due to the direct incorporation of different pollutants through the gills, fish undergo greater and quicker changes in the levels of copper than terrestrial vertebrates. The metallothioneins participate in the homeostasis of copper, the synthesis of which is induced by different heavy metals in the liver (Laurén and McDonald, 1987; Grossell *et al.*, 1998). In other fish species, the basal levels of copper are greater in the liver than in other organs, such as the kidney and gills (Blasco *et al.*, 1993, 1998; Capeta da Silva, 1997; Grossell *et al.*, 1998).

According to different authors (Möller, 1984; Segner and Storch, 1985; Segner, 1987), the accumulation of different heavy metals in the liver of fishes depends on the nutritional state of the organisms, and the highest concentrations occur in starved specimens. On the other hand, sublethal concentrations of copper can produce histopathological alterations in organs and tissues, such as hyperplasia, hypertrophy and aneurysms at the branchial level, as well as pancreatic and hepatic necrosis, etc. (Baker, 1969; Eisler and Gardner, 1973; Sultan and Khan, 1983; Ortiz *et al.*, 1996; Capeta da Silva, 1997; Blasco *et al.*, 1993, 1998).

The biological and ecological responses to certain pollutants (organic and inorganic) may vary from changes at the population/community level, organ/tissue level and even at the molecular level (Chavin, 1973). Since histological and histopathological changes produced by pollutants in organs and tissues can occur before they produce irreversible effects on the biota, histological methods can be used in conjunction with other parameters (quantification of metals) and ecotoxicological bioindicators (metallothioneins, glutathione, stress proteins, etc) as an "alarm system" for the survival of the species, as well as for environmental protection.

The objectives of this work were to describe the histopathological alterations in the liver and gills of specimens of *Fundulus heteroclitus* exposed for 30 days to sublethal concentrations of copper (800 µg Cu<sup>2+</sup>/L), and to measure the copper in these organs, taking into account the

Los objetivos de este trabajo han sido, por un lado, la descripción de las alteraciones histopatológicas en el hígado y branquias de ejemplares de *Fundulus heteroclitus* expuestos a concentraciones subletales de cobre ( $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ) durante 30 días y, por otro, la cuantificación de cobre en estos órganos, teniendo en cuenta el estado metabólico (alimentación/inanición) y el tiempo de exposición al contaminante (de 2 a 30 días).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares adultos de *F. heteroclitus* se recolectaron en la salina La Tapa (Puerto Santa María, Cádiz, España). Una vez aclimatados en el laboratorio, los peces se distribuyeron en acuarios de cristal ( $n = 20$  ejemplares por grupo): un grupo de ejemplares fue alimentado *ad libitum* con sardina, *Sardina pilchardus*, y otro grupo se mantuvo en inanición durante todo el periodo experimental. Otros dos grupos de peces (alimentados y en inanición) fueron expuestos a  $800 \mu\text{g}/\text{L}$  de cobre durante 30 días. Durante los días 2, 5, 15 y 30, se recogieron muestras de cada grupo experimental para los estudios histopatológicos y para el estudio analítico de cuantificación de cobre, siendo los peces anestesiados y diseccionados de forma inmediata. Durante todo el experimento, las condiciones del agua fueron:  $19\text{--}20^\circ\text{C}$  de temperatura, pH 8.2 y 8.3, y 33.5 y 35‰ de salinidad.

De cada individuo (control y contaminado) se extrajeron el hígado y las branquias. Las muestras para el examen histológico se fijaron en Bouin y se incluyeron en parafina. Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina/eosina y hematoxilina/VOF de Gutiérrez (1967), aplicándose también técnicas histoquímicas específicas de carbohidratos (PAS y AA pH 2.5/PAS) según Pearse (1985). Los niveles de cobre se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama (Perkin-Elmer, mod. 3110), según el procedimiento descrito por Amiard *et al.* (1987).

Para establecer los factores que afectan al comportamiento de la variable concentración de

metabolic state (fed/starved) and exposure time to the pollutant (2 to 30 days).

## MATERIAL AND METHODS

Adult specimens of *F. heteroclitus* were collected from the La Tapa saltworks (Puerto Santa María, Cádiz, Spain). Once the fish were acclimated in the laboratory, they were distributed among glass aquariums ( $n = 20$  specimens per group): one group was fed *ad libitum* with the sardine, *Sardina pilchardus*, and another group was not fed during the entire experiment. Another two groups of fish (fed and starved) were exposed to  $800 \mu\text{g}/\text{L}$  of copper for 30 days. On days 2, 5, 15 and 30, samples from each group were collected, anesthetized and immediately dissected for the histopathological studies and the analytical quantification of the copper. The water conditions throughout the experiment were: temperature of  $19\text{--}20^\circ\text{C}$ , pH 8.2 and 8.3, and salinity of 33.5 and 35‰.

The liver and gills were removed from each specimen (control and contaminated), and the samples for the histological exam were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin. The histological sections were stained with hematoxylin/eosin and hematoxylin/VOF from Gutiérrez (1967); carbohydrate-specific histochemical techniques (PAS and AA pH 2.5/PAS) were also used in accordance with Pearse (1985). The levels of copper were determined with flame atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer, model 3110), according to the procedure of Amiard *et al.* (1987).

In order to determine the factors that affect the behavior of the variable concentration of the pollutant, an analysis of variance (parametric two-way ANOVA) and the Tukey-Kramer test were applied, considering exposure time and metabolic state (with and without a daily supply of food) as factors. The Statgraphics Plus program was used, once the criteria of normality ( $\chi^2$ ), randomness and homoscedasticity of the variance were met (Bartlett's and Cochran's tests). Significant

contaminante, se aplicaron modelos de análisis de la varianza (ANOVA paramétrica de dos vías) y un test de Tukey-Kramer, considerando como factores el tiempo de exposición y estado metabólico (con y sin aporte diario de alimento). Se usó para ello el programa estadístico Statgraphics Plus, comprobando previamente que se cumplieran los criterios de normalidad ( $\chi^2$ ), aleatoriedad y homocedasticidad de la varianza (tests de Bartlett y Cochran). Se aceptaron diferencias significativas con un nivel de significación de  $P < 0.005$ .

## RESULTADOS

### Alteraciones histopatológicas en las branquias

En *F. heteroclitus*, los arcos branquiales llevan en su cara convexa un par de hileras de hojas o lamelas branquiales, cada una de ellas sostenida por una varilla cartilaginosa central (radio branquial). Las lamelas están recubiertas por laminillas branquiales, que se disponen paralelas entre sí, enfrentándose a uno y otro lado de las lamelas (fig. 1A).

La lámina branquial está constituida por tejido cartilaginoso, sistema vascular y un epitelio pluriestratificado constituido, tanto en la base de la lámina como en el espacio interlamelar, por distintos tipos de células (cloruro, mucosas y epiteliales pavimentosas).

La laminilla branquial presenta un epitelio lamelar constituido por una doble capa de células epiteliales respiratorias, presentando también células de soporte, denominadas células pilares, que son contráctiles y separan el canal capilar.

Las alteraciones histopatológicas en las branquias de *F. heteroclitus* se incrementan con el tiempo de exposición al cobre, no existiendo diferencias considerables entre los organismos contaminados que se mantienen en inanición y los contaminados que reciben aporte de alimento.

En las branquias, en general, se observa un incremento de las secreciones mucosas (PAS y diastasa-PAS positivas), relacionadas con el ácido siálico (fig. 1B, organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados), así como hipertrofia en

diferencias were accepted with a significance level of  $P < 0.005$ .

## RESULTS

### Histopathological alterations in the gills

In *F. heteroclitus*, there is a pair of gill filaments on the convex side of the gill arches, each sustained by a central cartilaginous support (gill raker). The filaments are covered with secondary lamellae that are parallel to each other and on both sides of the filaments (fig. 1A).

The gill filament consists of cartilaginous tissue, a vascular system and a pluristratified epithelium, made up of different types of cells (chloride, mucous and pavement epithelial cells) at the base of the filament and the interlamellar space.

The secondary lamellae have a lamellar epithelium, made up of a double layer of epithelial respiratory cells, as well as support cells called pillar cells that are contractile and separate the capillary channel.

The histopathological alterations in the gills of *F. heteroclitus* increase with exposure time to copper, and there are no considerable differences between the starved and contaminated organisms and the fed and contaminated organisms.

In general, there is an increase in mucus secretions (positive PAS and diastase-PAS) in the gills, related to sialic acid (fig. 1B, fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ), as well as hypertrophy in the chloride cells, with signs of blood extravasation (fig. 1C, fed organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). The secondary lamellae appear dilated and show signs of desquamation. The secondary lamellar epithelium appears detached and there are signs of hyperplasia and hypertrophy in the interlamellar area (fig. 1D, fed organisms exposed for 30 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). Lamellar fusions are frequent on the edge of the filaments, possibly due to the combined effect of inflammatory reaction and hyperplasia on the epithelial squamous cells, chloride cells and/or mucous cells (fig. 2A, starved organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ).

las células de cloruro con signos de extravasación sanguínea (fig. 1C, organismos sometidos 5 días a 800 µg/L y alimentados). Las laminillas branquiales aparecen dilatadas, observándose signos manifiestos de descamación. El epitelio lamelar secundario aparece desprendido y se observan signos evidentes de hiperplasia e hipertrofia en la zona interlamelar (fig. 1D, organismos sometidos 30 días a 800 µg/L y alimentados). Son frecuentes las fusiones lamelares en el borde de los filamentos, debido, posiblemente, al efecto combinado de la reacción inflamatoria e hiperplasia que sufren las células escamosas epiteliales, células de cloruro y/o células mucosas (fig. 2A, ejemplares sometidos 15 días a 800 µg/L y mantenidos en inanición). En ejemplares sometidos entre 5 y 15 días a 800 µg/L de cobre y alimentados se observa, respectivamente, hiperplasia e hipertrofia de células mucosas, así como zonas edematosas en la zona distal de las laminillas (fig. 2B, C). En ejemplares sometidos a periodos prolongados de exposición al cobre (30 días a 800 µg/L en inanición), se observa una fusión y acortamiento de las laminillas branquiales y, en ocasiones, una pérdida total de las mismas (fig. 2D).

Finalmente, en ejemplares sometidos durante 30 días a 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L, tanto alimentados como mantenidos en inanición, se ha observado una distensión de los capilares branquiales, producida por el posible debilitamiento de las células pilares que conducen a una acumulación de eritrocitos en la zona afectada y a la formación de una gran zona edematosa rellena de células de la sangre, a modo de maza. Esta alteración patológica (telangiectasis branquial) aparece con mucha frecuencia a nivel de la zona distal de las laminillas (fig. 2E).

#### Alteraciones histopatológicas en el hígado

La estructura del hígado de *F. heteroclitus* presenta, en general, las mismas características que las descritas para otras especies de teleósteos. Los hepatocitos se distribuyen en cordoncillos que se disponen concéntricamente alrededor de los sinusoides (fig. 3A).

Hyperplasia and hypertrophy of the mucous cells are observed in the fed specimens exposed for 5 to 15 days to 800 µg/L, respectively, as well as edematous areas in the distal region of the secondary lamellae (fig. 2B, C). In the specimens subjected to prolonged periods of copper exposure (30 days to 800 µg/L and starved), there is a fusion and shortening of the secondary lamellae and, on occasion, a total loss of the same (fig. 2D).

Lastly, in both the fed and starved specimens exposed for 30 days to 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L, there is a distention of the branchial capillaries, produced by the possible weakening of the pillar cells that lead to an accumulation of erythrocytes in the affected area and the formation of a large edematous area filled with massive blood cells. This pathological alteration (branchial telangiectasia) occurs frequently in the distal region of the secondary lamellae (fig. 2E).

#### Histopathological alterations in the liver

The structure of the liver of *F. heteroclitus* has the same general characteristics described for other teleost species. The hepatocytes are distributed in cords, concentrically placed around the sinusoids (fig. 3A).

The hepatocytes are polygonal-shaped cells that have a central or eccentric nucleus, with a clear nucleolus. In addition to these parenchymatous cells, there are connective tissue fibers that provide support and a vascular system with a clear endothelium. The exocrine pancreas is intrahepatic (hepatopancreas), and the glandular or centroacinar cells are located around the blood vessels (fig. 3B).

The histological hepatic alterations are progressive during the time of exposure to copper and the alterations observed for the starved and contaminated specimens are greater than those of the specimens that received a daily supply of food.

In general, a disorganization of the hepatic and pancreatic parenchyma is observed, as well as

Los hepatocitos son células de forma poligonal, que presentan un núcleo central o excéntrico con un evidente nucleolo. Además de estas células parenquimatosas, se observan fibras de tejido conectivo con función de armazón-soporte y un sistema vascular con un endotelio evidente. El páncreas exocrino es intrahepático (hepatopáncreas), localizándose las células glandulares o centroacinares alrededor de los vasos sanguíneos (fig. 3B).

Las alteraciones histológicas hepáticas son progresivas durante el tiempo de exposición al cobre y son mayores las alteraciones observadas en los ejemplares contaminados y en inanición que en los que recibieron aporte diario de alimento.

En general, se observa una desorganización del parénquima hepático y pancreático, zonas de necrosis y vacuolización con desorganización casi completa de toda la estructura parenquimatosas (fig. 3C, organismos mantenidos 5 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados). Los componentes endocrinos del páncreas (islotos de Langerhans) muestran una débil retracción capsular, no mostrando alteración las células adiposas (fig. 3D, organismos sometidos 5 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados). En el parénquima hepático se observa un incremento del número de capilares e infiltración de células sanguíneas, así como una desorganización general del mismo. En la superficie capsular hepática se observa una capa de exudado inflamatorio con diferentes tipos de células sanguíneas y fibras del conjuntivo, así como zonas de focos eosinófilos (fig. 3E, organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados). En algunas zonas se observa una necrosis de los hepatocitos, alrededor del páncreas exocrino (fig. 4A, organismos sometidos 5 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y mantenidos en inanición) y en otras una retracción de los pancreocitos, formándose espacios entre las células y el parénquima adyacente (fig. 4B, organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados). También se observa vacuolización del parénquima hepático y éstasis sanguínea (fig. 4B, organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y alimentados).

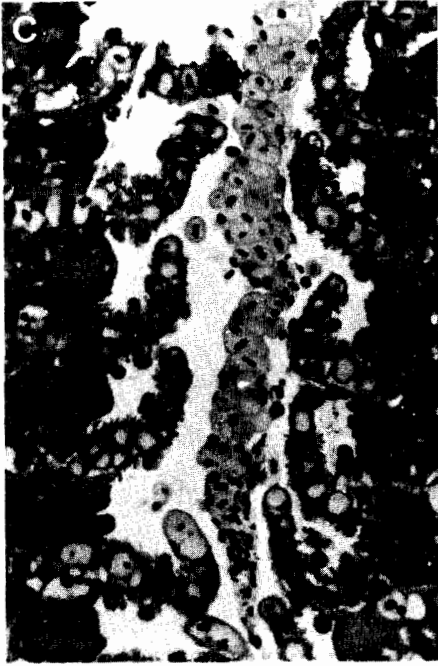
areas of necrosis and vacuolization with the almost complete disorganization of the entire parenchymatous structure (fig. 3C, fed organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). The endocrinous components of the pancreas (Islets of Langerhans) show a weak capsular retraction, but no alteration to the adipose cells (fig. 3D, fed organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). In the hepatic parenchyma, there is an increase in the number of capillaries and infiltration of blood cells, as well as a general disorganization. In the hepatic capsular surface, there is a layer of inflammatory exudate with different types of blood cells and connective fibers, as well as areas of eosinophil foci (fig. 3E, fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). In some areas, there is a necrosis of the hepatocytes around the exocrine pancreas (fig. 4A, starved organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ) and in others, a retraction of the pancreocytes, forming spaces between the cells and adjacent parenchyma (fig. 4B, fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). There is also vacuolization of the hepatic parenchyma and blood stasis (fig. 4B, fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ).

At the end of the experiment (30 days), the starved organisms exposed to sublethal levels of copper had a diffuse degeneration of the cytoplasm of the hepatocytes, as well as a hypertrophy of the nucleus and nucleolus and, in some cases, a disappearance of the nucleus (fig. 4C, starved organisms exposed for 30 days to 800  $\mu\text{g/L}$ ). On the other hand, in the organisms contaminated for 15 days with copper, there is a decrease in the glucogen grains (PAS and diastase-PAS), with a displacement towards the edge of the cytoplasm of the hepatocytes (fig. 4D, starved organisms exposed to copper for 15 days). Throughout the experiment, the starved organisms presented a decrease in the size of the hepatocytes, a greater cytoplasmic basophile and a decrease in the vacuoles (neutral lipids), which are very abundant in the fed and contaminated specimens, as well as an intense hyperemia at the level of the hepatic capillaries (fig. 4E, organisms exposed to copper for 15 days).

**Figura 1.** (A) Branquia del organismo control; se muestra la disposición de las laminillas paralelas entre sí y opuestas al eje cartilaginoso central (lámina branquial) (azul de toluidina  $\times 20$ ). (B) Branquia de organismos sometidos 15 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben alimento, donde se observa hipersecreción mucosa como defensa ante la exposición a determinados tóxicos ambientales (AA pH 2.5/PAS  $\times 20$ ). (C) Branquia de organismos sometidos 5 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben alimento, donde se muestra la célula de cloruro hipertrofiada, así como signos de extravasación sanguínea (azul de toluidina  $\times 20$ ). (D) Branquia de organismos sometidos 30 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben alimento; se muestra hiperplasia e hipertrofia del espacio interlaminillar (H/E  $\times 40$ ).

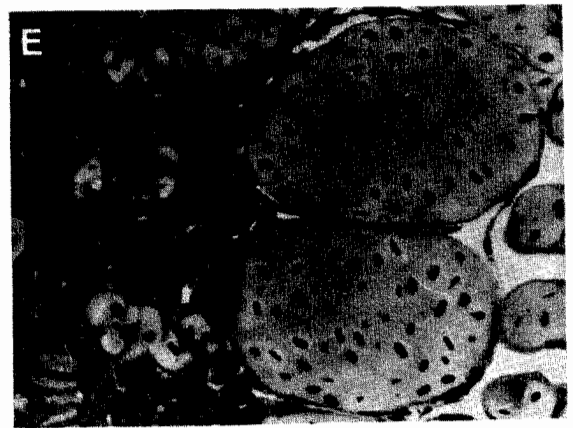
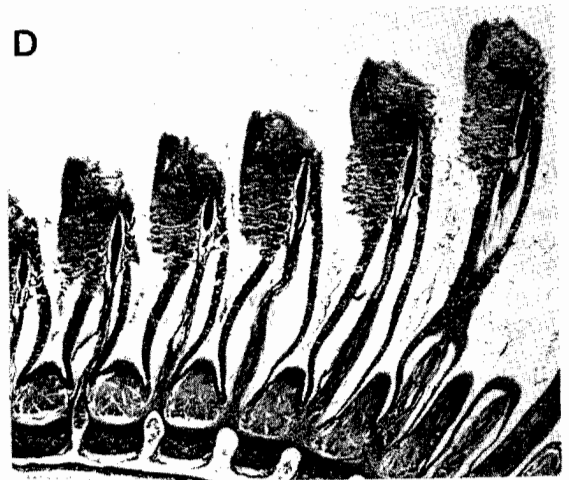
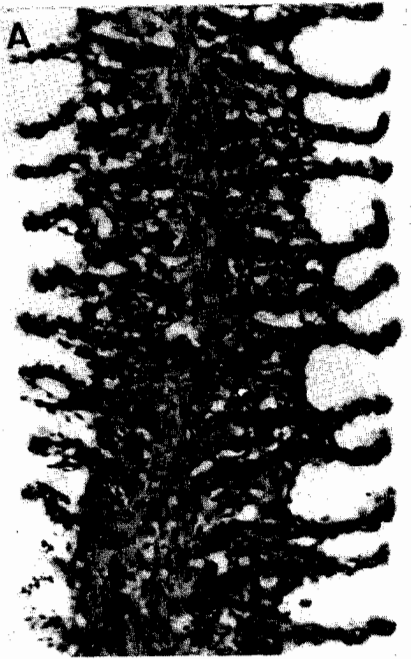
**Figure 1.** (A) Gills of the control organism, showing the position of the secondary lamellae parallel to each other and on each side of the gill filament (toluidine blue  $\times 20$ ). (B) Gills of fed organisms exposed for 15 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing mucus hypersecretion as a defense against exposure to certain environmental toxins (AA pH 2.5/PAS  $\times 20$ ). (C) Gills of fed organisms exposed for 5 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing a hypertrophied chloride cell and signs of blood extravasation (toluidine blue  $\times 20$ ). (D) Gills of fed organisms exposed for 30 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing hyperplasia and hypertrophy of the interlamellar space (H/E  $\times 40$ ).





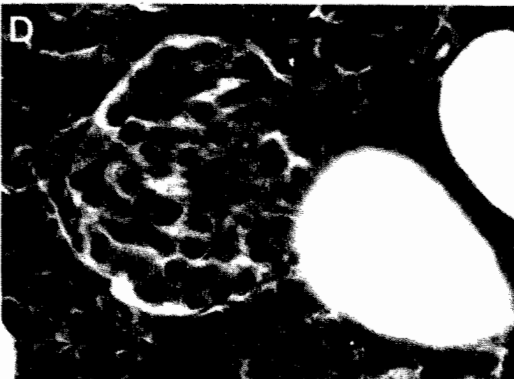
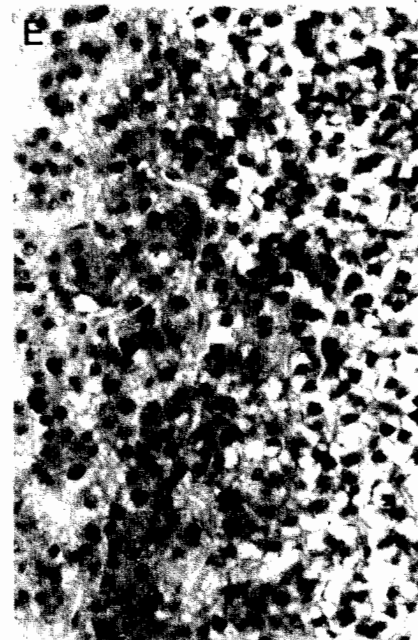
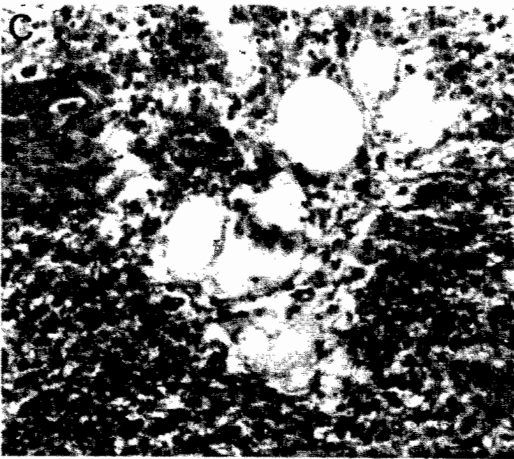
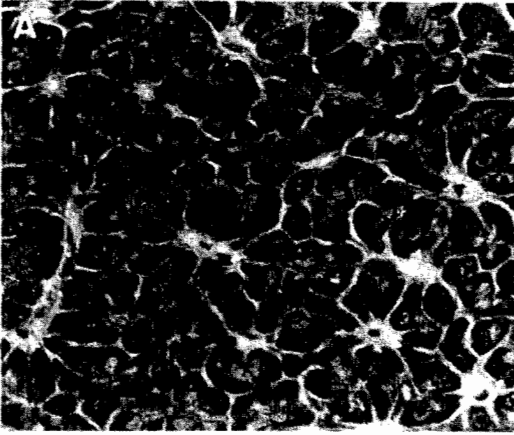
**Figura 2.** (A) Branquia de organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en inanición; se muestran signos de fusión de laminillas como consecuencia de la exposición al contaminante, con la consiguiente pérdida de superficie respiratoria (H/E  $\times 20$ ). (B) Branquia de organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  con aporte de alimento; se muestra hipertrofia e hiperplasia de células mucosas (H/E  $\times 20$ ). (C) Branquia de organismos sometidos 5 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  con aporte de alimento, donde se muestran edemas en la porción distal de las laminillas (AA pH 2.5  $\times 40$ ). (D) Branquia de organismos sometidos 30 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en inanición; terminaciones en forma de maza de láminas branquiales como consecuencia de la acción conjunta de hiperplasia, hipertrofia, fusión y acortamiento de laminillas respiratorias (H/E  $\times 40$ ). (E) Branquia de organismos sometidos 30 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  tanto alimentados como mantenidos en inanición; se muestra una alteración frecuente a nivel de la porción distal de laminillas respiratorias (telangiectasis o aneurismas) (azul de toluidina  $\times 40$ ).

**Figure 2.** (A) Gills of starved organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing signs of lamellar fusion as a result of exposure to the pollutant, with the consequent loss of the respiratory surface (H/E  $\times 20$ ). (B) Gills of fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing hypertrophy and hyperplasia of the mucous cells (H/E  $\times 20$ ). (C) Gills of fed organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing edemas in the distal portion of the secondary lamellae (AA pH 2.5  $\times 40$ ). (D) Gills of starved organisms exposed for 30 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ ; the ends of the gill filaments are mallet-shaped as a result of the combined action of hyperplasia, hypertrophy, fusion and shortening of the secondary lamellae (H/E  $\times 40$ ). (E) Gills of both fed and starved organisms exposed for 30 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing a frequent alteration at the level of the distal portion of the secondary lamellae (telangiectasia or aneurysms) (toluidine blue  $\times 40$ ).



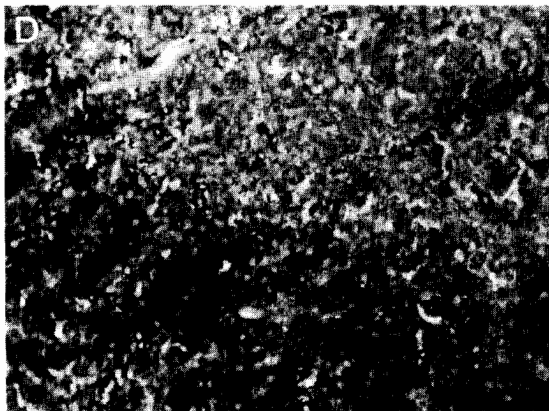
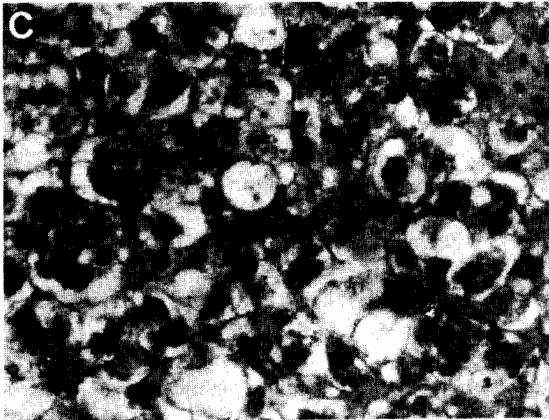
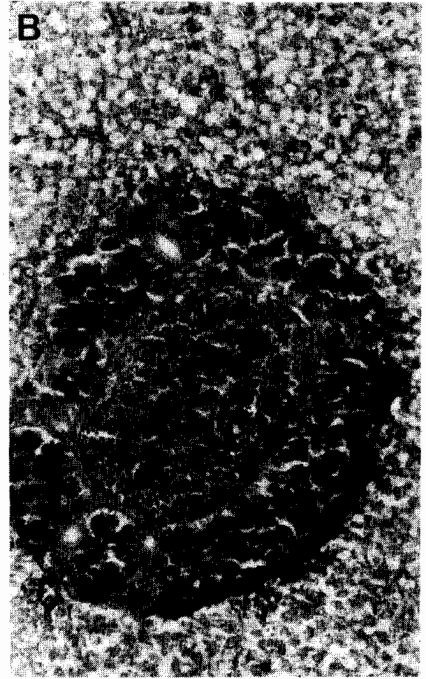
**Figura 3. (A)** Hígado control, donde se muestra la distribución parenquimatosa de los hepatocitos, distribuyéndose en cordoncillos alrededor de los sinusoides (azul de toluidina  $\times 40$ ). **(B)** Hígado control; se muestra el páncreas exocrino, que en esta especie es intrahepático, alrededor de vasos sanguíneos (H/E  $\times 20$ ). **(C)** Hígado de organismos sometidos 5 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben aporte de alimento, donde se observa gran vacuolización del parénquima hepático con zonas de necrosis, alterando la estructura general del mismo (H/E  $\times 40$ ). **(D)** Hígado de organismos sometidos durante 15 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben aporte de alimento; se muestra la porción endocrina (islotos de Langrehans), presentando débil retracción capsular y no mostrando alteración las células adiposas (H/VOF  $\times 10$ ). **(E)** Hígado de organismos sometidos 15 días a  $800 \mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben aporte de alimento, donde se muestra un foco eosinófilo con proliferación de fibras del conjuntivo e infiltración de células de la sangre (H/E  $\times 40$ ).

**Figure 3. (A)** Control liver, showing the parenchymatous distribution of the hepatocytes, distributed in cords around the sinusoids (toluidine blue  $\times 40$ ). **(B)** Control liver, showing the exocrine pancreas, which in this species is intrahepatic, around the blood vessels (H/E  $\times 20$ ). **(C)** Liver of fed organisms exposed for 5 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing great vacuolization of the hepatic parenchyma with areas of necrosis, which alters its general structure (H/E  $\times 40$ ). **(D)** Liver of fed organisms exposed for 15 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing the endocrine portion (Islets of Langrehans) and weak capsular retraction, but no alteration to the adipose cells (H/VOF  $\times 10$ ). **(E)** Liver of fed organisms exposed for 15 days to  $800 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing an eosinophil focus with a proliferation of connective fibers and an infiltration of blood cells (H/E  $\times 40$ ).



**Figura 4.** (A) Hígado de organismos sometidos 5 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en inanición; se observa necrosis de los hepatocitos alrededor del páncreas (H/VOF  $\times 40$ ). (B) Hígado de organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  que reciben aporte de alimento, con gran vacuolización del parénquima, éstasis sanguínea y débil retracción de los pancreocitos (H/E  $\times 40$ ). (C) Hígado de organismos sometidos 30 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en ayunas; se observa vacuolización difusa del citoplasma de los hepatocitos, desapareciendo los núcleos en algunos casos (H/E  $\times 40$ ). (D) Hígado de organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en ayunas; se observa desplazamiento de glucógeno hacia la periferia (diastasa/PAS  $\times 20$ ). (E) Hígado de organismos sometidos 15 días a 800  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  mantenidos en inanición, con aumento de basofilia del citoplasma de los hepatocitos e hiperemia de los capilares (H/E  $\times 40$ ).

**Figure 4.** (A) Liver of starved organisms exposed for 5 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing necrosis of the hepatocytes around the pancreas (H/VOF  $\times 40$ ). (B) Liver of fed organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing great vacuolization of the parenchyma, blood stasis and a weak retraction of the pancreocytes (H/E  $\times 40$ ). (C) Liver of starved organisms exposed for 30 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing diffuse vacuolization of the cytoplasm of the hepatocytes, and the occasional disappearance of the nuclei (H/E  $\times 40$ ). (D) Liver of starved organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing a displacement of the glucogen towards the edge (diastase/PAS  $\times 20$ ). (E) Liver of starved organisms exposed for 15 days to 800  $\mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ , showing an increase in the basophile of the cytoplasm of the hepatocytes and hyperemia of the capillaries (H/E  $\times 40$ ).



Los organismos sometidos a exposiciones subletales de cobre y mantenidos en inanición presentan, al final del periodo experimental (30 días), una degeneración difusa del citoplasma de los hepatocitos, observándose una hipertrofia del núcleo y nucleolo y desapareciendo el núcleo en algunos casos (fig. 4C, organismos sometidos 30 días a 800  $\mu\text{g/L}$  y mantenidos en inanición). Por otro lado, en organismos tratados durante 15 días con cobre, se observa una disminución de los granos de glucógeno (PAS y diastasa-PAS), con un desplazamiento preferentemente hacia la periferia del citoplasma de los hepatocitos (fig. 4D, organismos mantenidos 15 días en inanición y sometidos a cobre). En general, en organismos mantenidos en inanición se observa, a lo largo del periodo experimental, una disminución del tamaño de los hepatocitos, una mayor basofilia citoplasmática y una disminución de vacuolas (lípidos neutros), las cuales son muy abundantes en los ejemplares alimentados y contaminados, así como una intensa hiperemia a nivel de los capilares hepáticos (fig. 4E, organismos sometidos 15 días a cobre).

#### Acumulación de cobre en branquias e hígado

En las figuras 5 y 6 se presentan los niveles de cobre en las branquias e hígado de ejemplares de *F. heteroclitus* sometidos a 800  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ , expresados como valores medios y error estándar.

##### Branquias

En la tabla 1 aparecen las diferencias estadísticas observadas entre los distintos grupos. Tras realizar un análisis estadístico de la varianza (ANOVA), se observa que tanto el tiempo de exposición como el estado metabólico influyen significativamente ( $P < 0.005$ ) en las variaciones observadas.

Las diferencias significativas en la concentración de cobre entre los organismos alimentados y mantenidos en inanición se presentan, para un mismo tiempo de exposición (tabla 1), sólo en los

#### Copper accumulation in the gills and liver

Figures 5 and 6 show the copper levels in the gills and liver of *F. heteroclitus* specimens exposed to 800  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ , expressed as mean values and standard error.

##### Gills

Table 1 shows the statistical differences observed among the different groups. The statistical analysis of variance (ANOVA) indicated that both exposure time and metabolic state significantly influence ( $P < 0.005$ ) the variations observed.

Significant differences in copper concentration between the fed and starved organisms occur, for the same exposure time (table 1), only in the organisms subjected to prolonged exposures (15 and 30 days), while the levels of copper are always higher in the organisms starved throughout the study period (2 to 30 days).

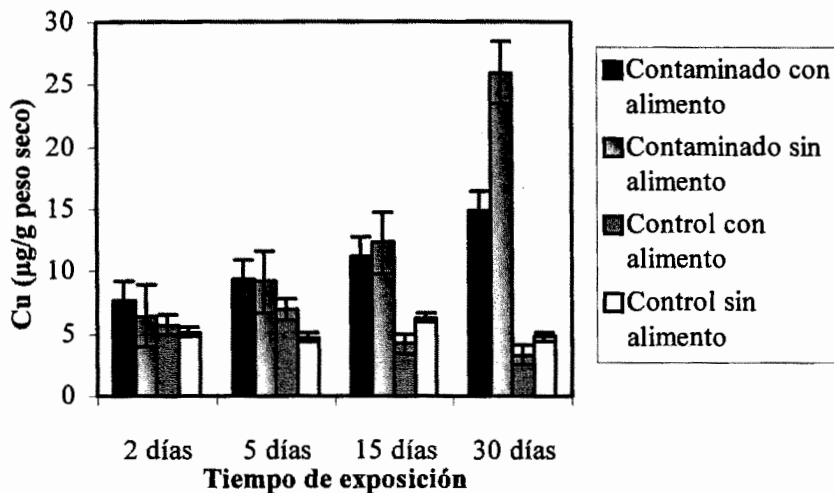
With respect to exposure time, the significant differences observed occur in the 15- to 30-day interval, and the levels of copper in this interval are higher than in the 2- to 5-day and 5- to 15-day intervals.

The copper concentration is significantly higher in the gills of the contaminated and starved specimens, in relation to those exposed to copper but that received a daily supply of food. This behavior is observed in the 15- to 30-day interval, which is when significant differences, with respect to exposure time, are observed.

##### Liver

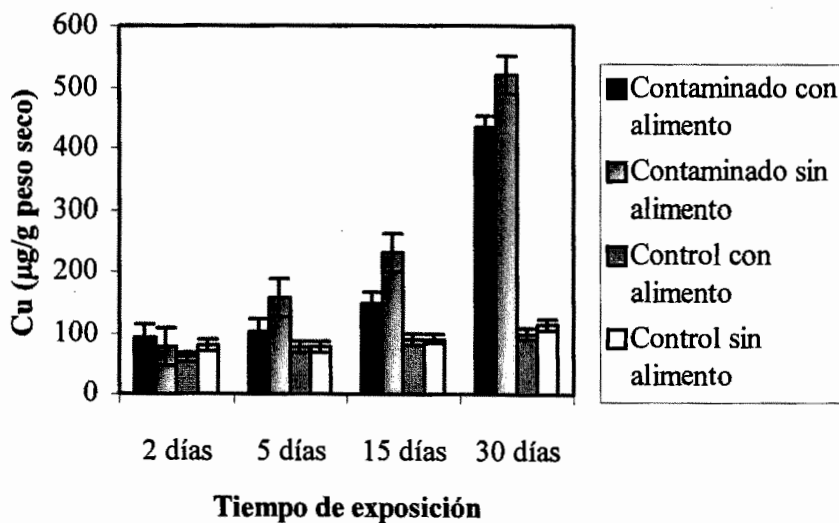
In general and according to the results observed, the liver is the organ where the highest levels of copper occur. There is a significant correlation between copper concentration and exposure time ( $r = 0.952$ ). The levels of copper ( $\mu\text{g/g}$  of dry weight) in the liver of both fed and starved specimens increase as exposure time to the pollutant increases, and the greater





**Figura 5.** Concentración de cobre ( $\mu\text{g/g}$ ) en las branquias de *Fundulus heteroclitus* expuestos a  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  en distintas condiciones metabólicas.

**Figure 5.** Copper concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) in the gills of *Fundulus heteroclitus* exposed to  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  under different metabolic conditions.



**Figura 6.** Concentración de cobre ( $\mu\text{g/g}$ ) en el hígado de *Fundulus heteroclitus* expuesto a  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  en distintas condiciones metabólicas.

**Figure 6.** Copper concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) in the liver of *Fundulus heteroclitus* exposed to  $800 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  under different metabolic conditions.

organismos sometidos a periodos prolongados de exposición al contaminante (15 y 30 días), mientras que los niveles de cobre son siempre superiores en los organismos no alimentados durante todo el periodo experimental (de 2 a 30 días).

Con respecto al tiempo de exposición, las diferencias significativas observadas aparecen en el intervalo de 15 a 30 días, presentando en este intervalo niveles de cobre superiores que en los intervalos de 2 a 5 días y de 5 a 15 días.

Por tanto, la concentración de cobre es significativamente superior en las branquias de los ejemplares contaminados y en inanición con relación a los tratados con cobre pero recibiendo un aporte diario de alimento. Este comportamiento aparece en el intervalo comprendido entre 15 y 30 días, siendo éste el mismo en el que se observan diferencias significativas con respecto al tiempo de exposición.

#### Hígado

En general y según los resultados observados, el hígado es el órgano donde los niveles de cobre son más elevados. Se observa una correlación significativa entre la concentración de cobre y el tiempo de exposición ( $r = 0.952$ ). Los niveles de cobre en el hígado ( $\mu\text{g/g}$  de peso seco) aumentan conforme avanza el tiempo de exposición al contaminante, tanto en individuos alimentados como en los que se mantienen en inanición, observándose concentraciones superiores en el hígado de los ejemplares en inanición (tabla 2).

Para una probabilidad  $P < 0.005$ , tras realizar un ANOVA, se observa, al igual que en las branquias, que tanto el tiempo de exposición como el estado metabólico influyen significativamente en las variaciones de concentración observadas.

A diferencia de lo observado en branquias, en el hígado se observan diferencias significativas entre los ejemplares contaminados y alimentados con respecto a los ejemplares contaminados y mantenidos en inanición durante todo el periodo experimental. Asimismo, también se observan diferencias en cuanto al tiempo de exposición para todos los días de tratamiento.

concentraciones are observed in the liver of the starved specimens (table 2).

For a probability  $P < 0.005$ , the ANOVA indicates that, as with the gills, both exposure time and metabolic state significantly affect the variations in concentration observed.

Contrary to that observed in the gills, there are significant differences in the liver of the contaminated and fed specimens, with respect to those contaminated and starved throughout the study period. There are also differences with respect to exposure time for all the days of treatment.

#### DISCUSSION

Copper is an essential trace metal, but it is highly toxic to marine organisms at elevated concentrations, and its range of toxicity is very wide (Chapman, 1978; Howarth and Sprague, 1978; Grossell *et al.*, 1998). In specimens of *F. heteroclitus*, as in other species (Blasco *et al.*, 1993, 1998; Capeta da Silva, 1997; Grossell *et al.*, 1998), the copper concentrations are higher in the liver than in the gills, and the copper accumulation in both organs progresses with exposure time to the pollutant. The high concentration of copper in the liver seems to reflect its multifunctional role in the processes of detoxification and storage/deposit, associating copper and other metals with some proteins (metallothioneins), whose synthesis is induced by different heavy metals (Carpené and Vasák, 1989; Grossell *et al.*, 1998).

The exposure of fish to sublethal concentrations of heavy metals is generally correlated with a linear accumulation in the major target organs: liver and gills. According to different authors, there is a direct relationship between the gills and liver (Buckley *et al.*, 1984). However, the mechanisms of accumulation and detoxification appear to be more complex. Stokes (1979) detected lower copper concentrations in the tissues of fish exposed to high concentrations than in tissues exposed to intermediate concentrations. Segner (1987) observed an increase in copper in the liver

**Tabla 1.** Diferencias significativas (test de Tukey-Kramer,  $P < 0.005$ ) en las branquias. CA: con alimento; SA: sin alimento.

**Table 1.** Significant differences (Tukey-Kramer test,  $P < 0.005$ ) in the gills. CA: with food; SA: without food.

|         |    | Control | 2 días | 5 días | 15 días | 30 días |
|---------|----|---------|--------|--------|---------|---------|
|         |    | CA/SA   | CA/SA  | CA/SA  | CA/SA   | CA/SA   |
| Control | CA |         | * / *  | * / *  | * / *   | * / *   |
|         | SA |         | * / *  | * / *  | * / *   | * / *   |
| 2 días  | CA |         |        |        | * / *   | * / *   |
|         | SA |         |        |        | * / *   | * / *   |
| 5 días  | CA |         |        |        |         | * / *   |
|         | SA |         |        |        | *       | * / *   |
| 15 días | CA |         |        |        | *       | * / *   |
|         | SA |         |        |        |         | *       |
| 30 días | CA |         |        |        |         | *       |
|         | SA |         |        |        |         |         |

**Tabla 2.** Diferencias significativas (test de Tukey-Kramer,  $P < 0.005$ ) en el hígado. CA: con alimento; SA: sin alimento.

**Table 2.** Significant differences (Tukey-Kramer test,  $P < 0.005$ ) in the liver. CA: with food; SA: without food.

|         |    | Control | 2 días | 5 días | 15 días | 30 días |
|---------|----|---------|--------|--------|---------|---------|
|         |    | CA/SA   | CA/SA  | CA/SA  | CA/SA   | CA/SA   |
| Control | CA |         | * / *  | * / *  | * / *   | * / *   |
|         | SA |         | * / *  | * / *  | * / *   | * / *   |
| 2 días  | CA |         | *      | * / *  | * / *   | * / *   |
|         | SA |         |        | * / *  | * / *   | * / *   |
| 5 días  | CA |         |        | *      | * / *   | * / *   |
|         | SA |         |        |        | * / *   | * / *   |
| 15 días | CA |         |        |        | *       | * / *   |
|         | SA |         |        |        |         | * / *   |
| 30 días | CA |         |        |        |         | *       |
|         | SA |         |        |        |         |         |

## DISCUSIÓN

El cobre es un metal traza esencial, pero a concentraciones elevadas es un contaminante altamente tóxico para los organismos marinos, siendo muy amplio su rango de toxicidad (Chapman, 1978; Howarth y Sprague, 1978; Grossell *et al.*, 1998). En ejemplares de *F. heteroclitus*, como en otras especies (Blasco *et al.*, 1993, 1998; Capeta da Silva, 1997; Grossell *et al.*, 1998), las concentraciones de cobre son superiores en el hígado que en las branquias, siendo la acumulación de cobre, en ambos órganos, progresiva durante el tiempo de exposición al contaminante. La elevada concentración de cobre en el hígado parece reflejar su papel multifuncional, tanto en los procesos de desintoxicación como en los procesos de almacén/depósito, pudiendo asociarse el cobre y otros metales a unas proteínas (metalotioneínas), cuya síntesis es inducida por diferentes metales pesados (Carpené y Vasák, 1989; Grossell *et al.*, 1998).

La exposición de los peces a concentraciones subletales de metales pesados se correlaciona, en general, con una acumulación lineal en los principales órganos diana: hígado y branquias. Según diferentes autores, hay una relación directa entre la concentración de cobre en el medio acuático y las concentraciones que se registran en las branquias e hígado (Buckley *et al.*, 1984). Sin embargo, los mecanismos de acumulación y desintoxicación parecen ser más complejos. Así, Stokes (1979) detectó concentraciones de cobre menores en los tejidos de peces expuestos a concentraciones altas que a concentraciones intermedias de cobre. Segner (1987) observó un incremento de cobre en el hígado de los peces cuando éstos no recibían alimento y Pelgrom *et al.* (1994) pusieron de manifiesto que la tasa de acumulación de cobre era mayor en los peces no alimentados, al menos al añadir al agua bajas concentraciones de dicho metal. En *F. heteroclitus* se observa una acumulación progresiva de cobre durante el tiempo de exposición, en el hígado y branquias, siendo mayores, en general, los niveles de cobre en los ejemplares que no reciben

of fish when they were starved, and Pelgrom *et al.* (1994) found that the accumulation rate of copper increased in starved fish, even when low concentrations of this metal were added to the water. In the liver and gills of *F. heteroclitus*, copper accumulation progresses with exposure time, and the levels of copper are generally higher in the specimens that did not receive food.

The results from this work and from the literature reviewed indicate that copper accumulation in the liver is affected by the nutritional state of the fish and the type of food used. Dixon and Hilton (1981) reported differences in copper tolerance and accumulation for trout that were fed diets with distinct carbohydrate contents. Möller (1984) observed higher copper concentrations in the liver of different species during winter when food is less abundant. Segner and Storch (1985), in *Poecilia reticulata* specimens treated with iron, observed an accumulation of this metal in the starved organisms, but not in the fed organisms. Collvin (1985) established the amount and quality of food required by the perch, *Perca fluviatilis*, to maintain homeostasis during copper exposure. Segner (1987), in *Rutilus rutilus*, observed that only the starved fish accumulated copper in the liver on the seventh day of exposure, whereas the fed and contaminated fish showed no statistically significant differences. However, in both fed and starved specimens of *F. heteroclitus*, there is a gradual increase in copper accumulation in the liver throughout the entire study period (2 to 30 days), but the copper concentrations are statistically higher in the starved specimens. According to Segner (1987), fish require a metabolic energy budget to regulate copper, and that the additional energy budget required by starved fish, due to stress, may inhibit them from regulating the amount of pollutant and maintaining homeostasis.

In the gills of *F. heteroclitus*, the copper concentration is also higher in the starved organisms, and the differences are significant only during certain days of the study period. This is contrary to that observed for the liver, where significant differences are observed in the levels of copper in the starved and fed specimens during the entire

aporte de alimento durante la exposición al contaminante.

Es evidente, como se acaba de señalar en este trabajo y en la bibliografía consultada, que la acumulación de cobre en el hígado puede ser influenciada por el estado nutricional de los peces y tipo de alimento. Así, Dixon y Hilton (1981), en truchas alimentadas con dietas de diferente contenido en carbohidratos, observaron diferencias en la tolerancia y acumulación de cobre. Möller (1984) observó mayores concentraciones de cobre en el hígado de diferentes especies durante el invierno, cuando la alimentación era menor. Segner y Storch (1985), en ejemplares de *Poecilia reticulata* contaminados con hierro, observaron una acumulación de dicho metal en los organismos en ayunas pero no en los alimentados. Collvin (1985) determinó el papel de la cantidad y calidad de la comida en la capacidad de la perca, *Perca fluviatilis*, para mantener la homeostasis durante la exposición a cobre. Segner (1987), en *Rutilus rutilus*, observó que sólo los peces mantenidos en inanición acumulaban cobre en el hígado al séptimo día de exposición al contaminante, mientras que en los alimentados y contaminados, las diferencias no eran estadísticamente significativas. Sin embargo, en *F. heteroclitus*, tanto en los ejemplares alimentados como en los sometidos a inanición, se observa un incremento gradual del cobre acumulado en el hígado durante todo el periodo estudiado (2 a 30 días), aunque las concentraciones de cobre también son estadísticamente superiores en los ejemplares en inanición. Según Segner (1987), la regulación de cobre en los peces requiere un gasto de energía metabólica, siendo posible que bajo el gasto energético adicional debido al estrés que presentan los peces sometidos al ayuno, no les sea posible regular la cantidad de contaminante y mantener la homeostasis.

En las branquias de *F. heteroclitus*, la concentración de cobre es también superior en los ejemplares en inanición, siendo significativas las diferencias sólo durante determinados días del periodo experimental, a diferencia de lo que sucede en el hígado, donde las diferencias

study (2 to 30 days). The results suggest that if exposed to copper for less than 15 days, the liver is able to maintain stable levels of copper (homeostasis) in other organs, e.g., the gills. However, as the time of exposure increases, the stress caused by both the pollutant and the nutritional deficit renders the organism incapable of maintaining homeostasis (balance between accumulation and excretion); the gills present higher levels of copper and there are significant differences between the fed and starved organisms, with respect to lower exposure times.

On the other hand, in the *F. heteroclitus* specimens treated with 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L, there is a reduction of hepatic glucogen, associated with an apparent increase of cytoplasmic basophile of the hepatocytes. In specimens of *Channos channos* treated with copper (100 µg/L), Segner and Braunbeck (1990) observed an increase in the hepatic glucogen, associated with an alteration in carbohydrate metabolism, possibly due (Peters *et al.*, 1980) to a general response to stress measured by the cortisol. Furthermore, in *F. heteroclitus* there is a vacuolization of the hepatic parenchyma and a diffuse degeneration of the hepatocytes. Similar alterations have been described by Teh *et al.* (1997) for many fresh-water fish species exposed to PCBs.

The gills of fish are a multifunctional organ, not only for respiration but for a variety of homeostatic activities, such as osmoregulation, circulating hormone metabolism, nitrogen excretion and acid-base balance (Evans, 1987; Ferguson, 1989; Olson, 1991). The gills respond quickly to pollutants (for example, heavy metals) and present morphological/cellular adaptations, which are more a defense mechanism for contaminant exposure than an irreversible toxic effect. However, these modifications can produce adverse effects on the fish's health, and may increase their susceptibility to secondary infectious diseases and even death (Hawkins *et al.*, 1984).

The histopathological alterations, such as hyperplasia with lamellar fusion, epithelial hypertrophy, telangiectasia, edemas with epithelial

observadas, entre los niveles de cobre en el hígado de ejemplares alimentados y en inanición, son significativas durante todo el periodo experimental (de 2 a 30 días). Estos resultados podrían sugerirnos que para tiempos de exposición al cobre inferiores a 15 días, el hígado es capaz de mantener estables los niveles de cobre (homeostasis) en otros órganos, por ejemplo la branquia, mientras que a medida que transcurre el tiempo de exposición al contaminante, el estrés impuesto tanto por el contaminante como por el déficit nutricional, hace que el organismo no sea capaz de mantener la homeostasis (balance entre acumulación y excreción), presentando las branquias mayores niveles de cobre y diferencias significativas entre los organismos alimentados y mantenidos en inanición, con respecto a tiempos de exposición inferiores.

Por otro lado, en ejemplares de *F. heteroclitus* tratados con 800 µg Cu<sup>2+</sup>/L se observó una reducción del glucógeno hepático asociado con un aparente incremento de basofilia citoplasmática de los hepatocitos. Sin embargo, en ejemplares de *Channos channos* tratados con cobre (100 µg/L), Segner y Braunbeck (1990) observaron un aumento del glucógeno hepático, que asociaron con una alteración en el metabolismo de carbohidratos, debido posiblemente (Peters *et al.*, 1980) a una respuesta general del estrés mediada por el cortisol. Asimismo, en *F. heteroclitus* se observa una vacuolización del parénquima hepático y una degeneración difusa de los hepatocitos. Alteraciones similares han sido descritas por Teh *et al.* (1997) en varias especies de peces de agua dulce expuestos a PCBs.

Las branquias de los peces son un órgano multifuncional, implicado no sólo en la respiración, sino también en una variedad de actividades homeostáticas, tales como la osmorregulación, metabolismo de hormonas circulantes, excreción de nitrógeno y balance ácido/base (Evans, 1987; Ferguson, 1989; Olson, 1991). Las branquias responden de forma rápida a los contaminantes (por ejemplo, metales pesados), presentando adaptaciones morfológicas/celulares, las cuales

separación de las membranas basales, necrosis generalizada y/o desquamación epitelial observada en *F. heteroclitus* han sido descritos para otras especies contaminadas con metales pesados (Meyer and Hendricks, 1985; Haaparanta *et al.*, 1997). La hipertrofia de las células cloradas puede ser un mecanismo adaptativo a estrés osmorregulatorio, y la regulación del número de estas células es un mecanismo esencial que es de particular importancia durante alteraciones respiratorias producidas por exposición a diferentes toxinas (Laurent and Dunel, 1980; Goss *et al.*, 1992).

En las branquias de los ejemplares de *F. heteroclitus* tratados con cobre, se observa hipersecreción de mucus branquial, que parece ser un mecanismo de defensa contra la exposición a contaminantes (Benedetti *et al.*, 1989). De hecho, la hipersecreción de ácido siálico, secretado por las células epiteliales mucosas y/o células branquiales, ha sido considerada una medida de estrés ambiental producido por metales pesados (Arillo *et al.*, 1979). Según Torres *et al.* (1987), en ejemplares de *Scyliorhinus canalicula* tratados con cobre, se observa un aumento en la secreción de células mucosas inmaduras, y el exceso de mucus puede quelatar el metal y formar una barrera aislante que inhibiría la incorporación de metales pesados al sistema circulatorio a través de las células epiteliales branquiales. Según Lichtenfels *et al.* (1996), el aumento en la capa de mucus que cubre el cuerpo y la superficie de las branquias de los peces es una barrera efectiva, así como un mecanismo importante de protección contra agentes tóxicos.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work forms part of project C-138, subsidized by the Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (Spain). Special thanks to Julián Blasco, Carmen Piñuela, Juana Arellano, Dinora Capeta, Isabel Viaña and Agustín Santos for the scientific and technical assistance.

English translation by Jennifer Davis.

están más relacionadas con un mecanismo defensivo ante la exposición al contaminante que con un efecto tóxico irreversible. Sin embargo, estas modificaciones pueden producir un efecto adverso en la salud de los peces, pudiendo aumentar su susceptibilidad a enfermedades infecciosas secundarias e incluso a la muerte de los ejemplares (Hawkins *et al.*, 1984).

Alteraciones histopatológicas como hiperplasia con fusión lamelar, hipertrofia epitelial, telangiectasia, edemas con separación epitelial de membranas basales, necrosis generalizada y/o descamación epitelial, observadas en *F. heteroclitus*, han sido descritas en diferentes especies tratadas con metales pesados (Meyer y Hendricks, 1985; Haaparanta *et al.*, 1997). La hipertrofia de las células de cloruro puede ser, en parte, un mecanismo adaptativo ante el estrés osmorregulatorio, siendo la regulación del número de dichas células un mecanismo esencial, especialmente importante durante el transcurso de alteraciones respiratorias ácido/base producidas por la exposición a distintos tóxicos (Laurent y Dunel, 1980; Goss *et al.*, 1992).

En las branquias de los ejemplares de *F. heteroclitus* tratados con cobre se observa una hipersecreción de moco branquial. Este hecho parece estar asociado con un mecanismo defensivo ante la exposición al contaminante (Benedetti *et al.*, 1989). De hecho, la hipersecreción de ácido siálico secretado por las células mucosas epidérmicas y/o branquiales, ha sido considerado como una medida del estrés ambiental producido por metales (Arillo *et al.*, 1979). Según Torres *et al.* (1987), en ejemplares de *Scyliorhinus canalicula* tratados con cobre, se produce un aumento de la secreción de células mucosas inmaduras, pudiendo el exceso de moco quelar el metal y formar una barrera aislante, que evitaría así la incorporación de los metales al torrente circulatorio a través de células epiteliales branquiales. Según Lichtenfels *et al.* (1996), el aumento de la capa de moco que envuelve la superficie corporal y branquial de peces es una barrera efectiva, siendo un mecanismo de protección importante para los organismos contra agentes nocivos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto C-138 subvencionado por la Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (España). Gracias especiales a Julián Blasco, Carmen Piñuela, Juana Arellano, Dinora Capeta, Isabel Viaña y Agustín Santos por la ayuda científica y técnica en la realización del trabajo.

## REFERENCIAS

- Allen-Gil, S.M, Gubala, C.P., Dixon, H.L. and Lasorsa, B.K. (1997). Heavy metal accumulation in sediment and freshwater fish in US Arctic lakes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(4): 733-741.
- Amiard, J.C., Pineau, A., Boiteau, H.L., Metayer, C. y Amiard-Triquet, C. (1987). Application de la spectrometric d'absorption atomique Zeeman aux dosages de huit elements traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans des matrices biologiques solides. *Water Res.*, 21(6): 693-697.
- Arillo, A., Margiocco, C. and Medina, F. (1979). The gill sialic acid as an index of environmental stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, (R). *J. Fish Biol.*, 15: 405-410.
- Baker, J.T.P. (1969). Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26: 2785-2973.
- Benedetti, I., Albano, A.G. and Mola, L. (1989). Histomorphological changes in some organs of the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* LeSueur, following short and long term exposure to copper. *J. Fish Biol.*, 34: 273-280.
- Blasco, J., Puppo, J., González de Canales, M.L. y Sarasquete, M.C. (1993). Acumulación y efectos histopatológicos del Cu en *Liza aurata* L. y *Sparus aurata* L. Ser. Química Oceanográfica, Ser. II, Vol. 2/3: 159-174.
- Blasco, J., Arellano, J., Navarro, A., Sánchez del Pino, M.J. and Sarasquete, C. (1998). Copper accumulation and oxidative stress in *Solea senegalensis*. Interfaces in Environmental Chemistry and Toxicology. 8th Annual Meeting of SETAC-Europe. April, Bordeaux, France.
- Bryan, G.W. (1971). The effects of heavy metals in marine and estuarine organisms. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Bo*, pp. 177-389.

- Buckley, J.A., Yosida, G.A. and Wells, N.R. (1984). A cupric ion-copper bioaccumulation relationship in coho salmon exposed to copper-containing treated sewage. *Com. Biochem. Physiol.*, 78C: 105-110.
- Bunton, T.E. and Franzier, J.M. (1994). Extrahepatic tissue copper concentrations in white perch with hepatic copper storage. *J. Fish Biol.*, 45: 627-640.
- Capeta da Silva, D. (1997). Efeito do cobre em peixes (*Halobatrachus didactylus*) e moluscos (*Crassostrea angulata*): quantificação e efeitos histopatológicos. Tesis de licenciatura, Universidade do Faro, Unidade de Ciências e Tecnologias do Recursos Aquáticos, Portugal, 73 pp.
- Carpené, E. and Vasák (1989). Hepatic metallothionein from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B: 463-468.
- Chapman, G.A. (1978). Toxicities of cadmium, copper and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 841-847.
- Chavin, W. (1973). Teleostean endocrine and para-endocrine alterations of utility in environmental studies. In: W. Chavin (ed.), *Responses of Fish to Environmental Change*. Thomas, Springfield, IL, pp. 199-238.
- Collvin (1985). Effects of copper on growth and starvation in perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Biol.*, 27: 735-764.
- Dixon, D.G. and Hilton, J.W. (1981). Influence of available dietary carbohydrate content on tolerance of waterborne copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 19: 509-517.
- Eisler, R.E. and Gardner, G.R. (1973). Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts. *J. Fish Biol.*, 5: 131-142.
- Evans, D.H. (1987). The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Persp.*, 71: 47-58.
- Ferguson, H.W. (1989). *Systemic Pathology of Fish. A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts*. Iowa State Univ. Press, Ames, 263 pp.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Wood, C.M. and Laurent, P. (1992). Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, 263: 143-159.
- Grossell, M.H., Hogstrand, C. and Wood, C. (1998). Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 40: 275-291.
- Gutiérrez, M. (1967). Coloración histológica para ovarios de peces crustáceos y moluscos. *Inv. Pesq.*, 31(2): 265-271.
- Haaparanta, A., Valtoven, E.T. and Hoffmann, R.W. (1997). Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *J. Fish Biol.*, 50: 575-591.
- Harris, E.D. (1991). Copper transport: an overview. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 192: 130-140.
- Hawkins, W.E., Overstreet, R.M. and Provancha, J.M. (1984). Effects of space shuttle exhaust plumes on gills of some estuarine fishes: a light and electron microscopic study. *Gulf Res. Rep.*, 7(4): 297-309.
- Howarth, R.S. and Sprague, J.B. (1978). Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res.*, 12: 455-462.
- Laurén, D.J. and McDonald, D.G. (1987). Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 105-111.
- Laurent, P. and Dunel, S. (1980). Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.*, 238: R147-R159.
- Lichtenfels, A.J.F.C., Lorenzi-Filho, G., Guimaraes, E.T., Macchione, M. and Saldiva, P.H.N. (1996). Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. *J. Comp. Path.*, 115: 47-60.
- Meyers, T.R. and Hendricks, J.D. (1985). Histo-pathology. In: G.M. Rand and S.R. Petrocelli (eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corp., Washington, DC, pp. 283-331.
- Möller, H. (1984). *Daten zur Biologie der Elbfische*. Kiel: Verlag Heino Möller, 10: 467-472.
- Olson, K.R. (1991). Vasculature of the fish gill: Anatomical correlates of physiological functions. *J. Electron Microscopy Tech.*, 19: 389-405.
- Ortiz, J.B., Arellano, J., Blasco, J., Sarasquete, C. y González de Canales, M.L. (1996). *Fundulus heteroclitus* como bioindicador del impacto ambiental producido por la contaminación de cobre en el medio marino. Primera Reunión Nacional de Inmunología y Patología de Peces. Badajoz, España, noviembre de 1996.
- Pearse, A.G.E. (1985). *Histochemistry: Theoretical and Applied*. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London & New York, 1055 pp.



- Pelgrom, S.M.G.J., Lamers, L.P.M., Garritsen, J.A.M., Pels, B.M., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M. and Wenderlaar Bonga, S.E. (1994). Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*. Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of metals on tissue water and ion content. *Aquat. Toxicol.*, 30: 117–135.
- Peters, G., Delventhal, H. and Klinger, H. (1980). Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Arch. Fish. Wiss.*, 30: 157–180.
- Segner, H. (1987). Response of fed and starved roach, *Rutilus rutilus*, to sublethal copper contamination. *J. Fish Biol.*, 30: 423–437.
- Segner, H. and Braunbeck, T. (1990). Qualitative and quantitative assessment of the response of milkfish, *Chanos chanos*, fry to low-level copper exposure. *Patol. Mar. Sci.*, 30: 347–368.
- Segner, H. and Storch, V. (1985). Influence of water-borne iron on the liver of *Poecilia reticulata*. *Sonderdruck Z. Angew. Ichthyol.*, Bd. 1, H.1, S: 39–47.
- Stokes, P.M. (1979). Copper accumulation in freshwater biota. In: J.O. Nigrau (ed.), *Copper in the Environment. Part I. Ecological Cycling*. Wiley, New York, pp. 358–381.
- Sultan, S. and Khan, S.M. (1983). Histopathological studies on the liver and gills in *Carassius auratus* exposed to copper sulphate. *Indian J. Fish.*, 30: 96–98.
- Teh, S.J., Adams, S.M. and Hinton, D.E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37: 51–70.
- Torres, P., Tort, LL. and Flos, R. (1987). Acute toxicity of copper to Mediterranean dogfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C(1): 169–171.