

Análisis morfométrico de branquia de Tilapia *Oreochromis niloticus* de la Laguna de Sonso (Valle del Cauca) mediante procesamiento digital de imágenes

Manuel Castrillón-Fernández¹, Gerardo A. Torres-Rodríguez¹, Paolín Cáceres¹, Enrique Peña²

¹ Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad del Cauca
Carrera 2 # 1A-25. Barrio Caldas. Vicerrectoría de Investigaciones. Popayán, Cauca (Colombia)
e-mail: mcastrillon@unicauca.edu.co

² Departamento de Biología, Universidad del Valle
Cali (Colombia)

Resumen

La actividad agroindustrial puede aumentar el riesgo de contaminación por metales pesados. Se escogió la Tilapia *Oreochromis niloticus* como bioindicador para evaluar los efectos de contaminación en una laguna (Laguna de Sonso, Valle del Cauca, Colombia) puesto que es un pez sensible y de alto valor comercial. Se analizó la branquia como biomarcador histopatológico para detectar la presencia o ausencia de alteraciones celulares. Se realizaron tres muestreos (n=10 individuos por muestreo) en la laguna y dos muestreos testigo en el río Patía, Valle del Patía, abarcando las temporadas húmeda y seca. Las biopsias se incluyeron en parafina, se cortaron en micrótopo y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Se observaron las muestras en un microscopio óptico con un aumento de 10x y se tomaron fotografías de tres filamentos de la branquia de cada individuo. Se implementó una aplicación software que permite segmentar la imagen y extraer las características morfológicas de las lamelas y los filamentos por separado. Se contaron las lamelas y se midieron su ancho y longitud promedio, así como el ancho de los filamentos. Basados en los valores morfométricos de los individuos normales, la aplicación otorga un diagnóstico preliminar de apoyo al especialista, evaluando la existencia o ausencia de alteraciones adaptativas (AA) y alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE). Esta prueba diagnóstica alcanzó un valor de sensibilidad de 0,916 y especificidad de 1,000 para evaluar las AA, un valor de sensibilidad de 0,950 y especificidad de 0,692 para evaluar la ADDE, y tiene la ventaja de ser rápida, económica y objetiva.

Palabras clave: histopatología, morfometría, procesamiento digital de imágenes, tilapia, branquia.

Summary

Morphometric analysis of Tilapia *Oreochromis niloticus* gills from Sonso Lagoon (Cauca Valley) by digital image processing

Agroindustrial activity can increase the exposure of organisms to heavy metal pollution. Tilapia *Oreochromis niloticus* was chosen as a biomarker to evaluate the effects of pollution on a lagoon (Laguna de Sonso, Valle de Cauca, Colombia), due to its sensitivity and high commercial value. The gill was chosen as a histopathological biomarker to detect either presence or absence of cellular alterations. Three samples (n=10 individuals) were taken from exposed fish from the Sonso Lagoon and two control samples from the Patia River, Patía Valley, in both wet and dry seasons. Biopsies were included in paraffin, then cut by microtome and stained with both hematoxylin and eosin. Samples were observed through an optical microscope with 10x magnification then a picture was taken from the three filaments of each of individual. A software application was used to segment the image and extract the morphological features of the filaments and the lamellae separately. Lamellae were counted and width and average length were measured, as well as the width of the filaments. Based on the morphometric values of normal individuals, the application provides a preliminary diagnosis to allow specialists to determine the presence of adaptive changes (AA) and alteration of the effective diffusion distance (ADDE). This diagnostic test achieved 0,916 sensitivity and 1,000 specificity to assess the AA, a 0,950 sensitivity and 0,692 specificity to assess the ADDE, and has the advantage of being fast, cheap and objective.

Key words: histopathology, morphometry, digital image processing, tilapia, gill.

Introducción

El uso de biomarcadores histopatológicos para vigilar la polución en ecosistemas ha recibido especial atención en los últimos años, especialmente para metales pesados (Domouhtsidou y Dimitriadis, 2004; Abdallah, 2000). Poonam y Farhat (2004), entre otros, proponen el uso de biomarcadores a nivel molecular y celular como una herramienta sensible de alarma temprana para medidas en la evaluación de la calidad ambiental. La selección de los biomarcadores puede indicar que el organismo ha sido expuesto a contaminantes (biomarcadores de exposición) y la magnitud de la respuesta de los organismos a los contaminantes (biomarcadores de efecto o biomarcadores de estrés).

Hoy en día, se recomienda usar diferentes biomarcadores (Poonam y Farhat, 2004) para evaluar interdisciplinariamente cualquier tipo de daño causado en un individuo por contaminantes. De otra parte se ha comprobado que los indicadores histopatológicos muestran el efecto de cambios bioquímicos, moleculares y celulares en el organismo como resultado de la exposición al contaminante, utilizándolos como indicadores a corto plazo de efectos biológicos a largo plazo (Cajaraville y cols., 2000; Marigomez y cols., 2006; Cajaraville y cols., 2006). Estos biomarcadores histopatológicos han sido muy utilizados como indicadores de toxicidad en órganos, especialmente en hígado y branquia, de los peces, en donde, por medio de cambios morfológicos a nivel celular y tisular se pueden inferir anomalías en el metabolismo por integración de sustancias extrañas (Pacheco y Santos, 2002).

La exposición de los peces a altos niveles de contaminantes químicos induce numerosas lesiones en diferentes órganos. La branquia es considerado como marcador primario de contaminación acuática debido a que exhibe una gran superficie en permanente contacto con el contaminante potencial (Bernet, y cols.1999). El trabajo de Verján y cols. (2001), establece parámetros de normalidad histológica del sistema respiratorio y las interacciones hospedero-patógeno-ambiente en *Piaractus brachypomus* con el objetivo de obtener una línea patrón contra la que se pueden comparar posteriores estudios epidemiológicos, ambientales, de diagnóstico, de investigación en campo o experimentales. Estos autores encuentran la necesidad de realizar estudios de evaluación semicuantitativa que en parte reduzcan la imprecisión y la excesiva subjetividad implícita en el proceso de análisis de un tejido y la dificultad para tener métodos objetivos de interpretación que permitan establecer estándares sobre los cuales emitir conceptos más precisos.

En general, la inspección visual mediante el microscopio óptico para determinar una patología lamelar, depende de la exhaustiva tarea de observar el aparente engrosamiento de las lamelas y la aparición de hipertrofia e hiperplasia entre las lamelas, para así establecer un diagnóstico. Aunque en muchas ocasiones es necesario utilizar aumentos de 40x y 100x para acertar en el diagnóstico, la aplicación software presentada en este trabajo posee las ventajas de almacenar la imagen capturada en 10x, guardar sus datos morfométricos y presentar un diagnóstico preliminar del tejido analizado, teniendo la posibilidad de constituir un archivo para posteriores revisiones de dicho individuo.

En la Laguna de Sonso no existen datos sobre los efectos a nivel celular de los metales pesados en organismos como los peces. La fauna íctica de la reserva incluye *Oreochromis niloticus* (Tilapia gris), que es el pez de mayor consumo entre los pobladores de la región, representando un alto riesgo para la salud humana. El objetivo de esta investigación fue hacer una evaluación histopatológica mediante procesamiento digital de imágenes de la branquia de Tilapia *O. niloticus*, expuesta a

contaminantes ambientales en condiciones naturales, con el fin de establecer unos parámetros cuantitativos, basándose en la patología cuantitativa desarrollada para servir de apoyo al diagnóstico y con la aplicación de un programa computacional, partiendo de imágenes que se representan de una forma numérica, de este modo el valor cuantitativo se estima como objetivo y preciso (Castrillón-Fernández, 2006; Moro, 2006).

Materiales y métodos

La investigación se realizó en la Reserva Natural Laguna de Sonso en el margen derecho del Río Cauca, al suroeste del municipio de Buga, departamento del Valle del Cauca, Colombia (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007; Gischler, 2005). La Figura 1 muestra un mapa de la zona investigada.

Figura 1. Ubicación geográfica de la Laguna de Sonso ($4^{\circ} 35' 56''$ N, $77^{\circ} 4' 51''$ O; área: 2 045 ha; altitud: 935-937 msnm).

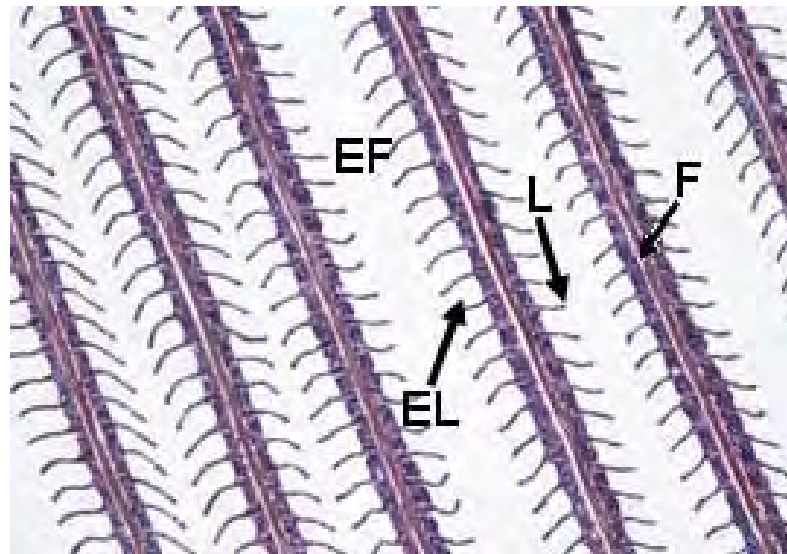


Recolección de muestras

Se realizaron tres muestreos de tilapia en la laguna de Sonso, y dos muestreos testigo en el río Patía, Cauca, que se escogió de acuerdo a características similares al lago expuesto, cubriendo los picos climáticos húmedo y seco de acuerdo a la información hidrológica y climática de la zona. Se capturaron por medio de redes de pesca, diez individuos de tilapia adultos al azar en cada uno de los muestreos y se trasladaron a un acuario. Los animales se sacrificaron y se obtuvieron biopsias de branquia. Las branquias fueron colocadas en el fijador en un lapso menor a 3 min después del sacrificio, para prevenir los artefactos de fijación *peri-mortem* (Speare y Ferguson, 1989).

Las muestras se fijaron con una solución de formol tamponado al 10% y se deshidrataron en alcoholes con concentraciones ascendentes a partir de 50%, se aclararon con xilol y se incluyeron en parafina. Posteriormente se cortaron en un micrótomó LKB con grosores de 4 a 8 μ m y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E). La Figura 2 muestra una imagen de los filamentos, con sus respectivas lamelas, de uno de los individuos procesados siguiendo el método anterior.

Figura 2. Corte longitudinal de branquia de tilapia, donde se observan los filamentos (F) y sus respectivas lamelas (L). Los filamentos y sus lamelas están separadas por el espacio interfilamentar (EF) y un espacio interlamelar (EI) respectivamente, por los cuales fluye continua y unidireccionalmente el agua. (H-E, 10x)

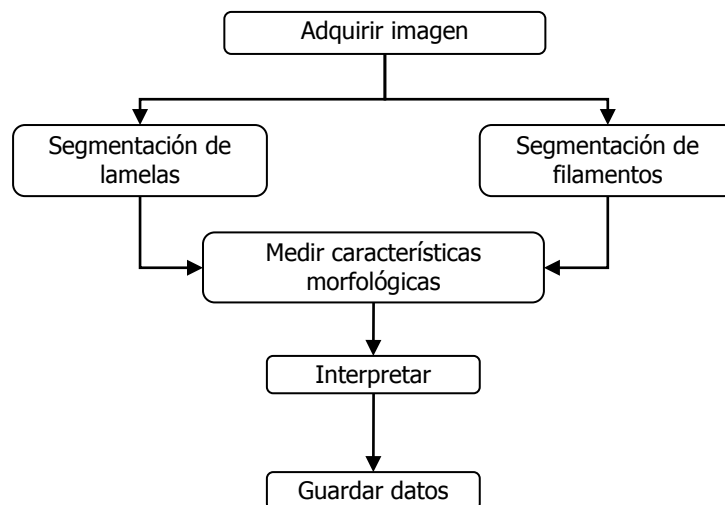


Descripción del sistema

Usamos un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i con una cámara digital Nikon DS-2Mv de 2 Mp. El computador utilizado fue una estación de procesamiento y análisis de imágenes LEICA Q550IW. La aplicación software fue desarrollada en QUIPS y QWIN, que son programas interactivos ejecutados en una plataforma PC. Las imágenes fueron capturadas a 10x de aumento, con determinadas condiciones de iluminación.

La Figura 3 muestra el flujo de información en este sistema de visión artificial, que es alimentado por una imagen digital que muestra tres filamentos de branquia de tilapia. Esta imagen es segmentada para separar las regiones correspondientes a las lamelas y a los filamentos sin lamelas, y posteriormente realizar las mediciones morfológicas de cada uno de estos objetos de la imagen. El siguiente paso es interpretar los resultados obtenidos, con base a las características medidas, permitiendo realizar comparaciones con los valores normales establecidos y arrojar un diagnóstico preliminar.

Figura 3. Diagrama de flujo del sistema implementado.



Segmentación

La segmentación consiste en dividir la imagen en regiones que son de interés, denominadas objetos, y el fondo, constituido como la región que no presenta interés particular.

Inicialmente, la imagen a color original fue descompuesta en sus tres planos RGB (rojo, verde y azul, por sus siglas en inglés), se realiza una transformación de *oscurecimiento* al plano G y luego un mejoramiento de contraste, para obtener una imagen con más detalle de la zona de interés a segmentar, es decir los filamentos con sus lamelas. Luego se realiza una transformación de *aclaración* de la imagen (Leica imaging systems, 1996), para eliminar pequeños artefactos inmersos en el espacio interlamelar que pueden causar errores en las medidas. Posteriormente se realiza una binarización con un umbral predefinido, seguido de funciones de la morfología matemática binaria, tales como apertura y relleno de huecos, para mejorar el aspecto de la imagen binarizada. Con la imagen binaria de los tres filamentos completos solo falta separar las lamelas de ellos. Para esto se realiza una *última erosión* seguida de una *transformación distancia* para reconstruir las lamelas y los filamentos por separado para ser medidos.

Morfometría y extracción de características

La composición celular y los cambios estructurales del tejido branquial fueron identificados por observación con el microscopio de luz. Para determinar el rango de las lesiones y el estado completo de la branquia, se tomaron tres filamentos completos de un arco branquial al azar y se capturaron imágenes de su parte central. Fueron utilizados algunos de los índices morfométricos basados en un método de morfometría proporcional desarrollado por Speare y Ferguson (1989) (Sánchez y cols., 1997), y para evaluar histopatológicamente el tejido se realizaron algunas modificaciones a las categorizaciones dadas por Bernet y cols. (1999) y Nero y cols. (2006). Cada filamento seleccionado fue evaluado por la aplicación software con los siguientes parámetros:

- 1) Número total de lamelas útiles para la cuantificación sobre los tres filamentos.
- 2) Pérdida lamelar: porcentaje del número de lamelas que están por debajo del promedio del primer índice.
- 3) Ancho promedio lamelar: medido desde la membrana celular más externa de un lado de la lamela hasta su lado opuesto, medido para cada lamela cuantificable en la imagen.
- 4) Longitud promedio lamelar: medida desde la punta de la lamela hasta la base de ella.
- 5) Ancho promedio del filamento: medido desde la base de la lamela hasta la base de la lamela contraria.
- 6) Alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE): una variación que surge a nivel lamelar, interviniendo en la difusión de gases como el oxígeno, medida en porcentaje del número de lamelas engrosadas.
- 7) Alteraciones adaptativas (AA): un incremento del número celular, pueden ser irreversibles dependiendo de la severidad y extensión de la lesión. Fueron clasificadas dentro de esta clase: la hipertrofia y la hiperplasia, medidas en porcentaje de engrosamiento del filamento por tejido epitelial y en porcentaje del número de lamelas con una longitud por debajo de la mínima normal.

Se analizaron 6 individuos control correspondientes a la temporada seca y 7 individuos control correspondientes a la temporada húmeda, 13 individuos expuestos correspondientes a la temporada seca y 10 individuos expuestos correspondientes a la temporada húmeda. Se compararon las alteraciones adaptativas (AA) y la alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE) con los dos sitios empleados.

Análisis estadístico

Para evaluar la dependencia entre las alteraciones estudiadas y el sitio (laguna y río Patía) y la época (seca o húmeda) se realizaron tablas de contingencia y se evaluaron los estadísticos de Fisher y Chi-cuadrado de Pearson. Para evaluar la prueba diagnóstica de la aplicación software implementado se efectuó una prueba de McNemar. Un error $\alpha=0,05$ fue utilizado para todos los análisis estadísticos. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas en SPSS 10.0.

Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra la comparación entre las AA y el sitio, y la Tabla 2 muestra la comparación entre la ADDE y el sitio. En ambas pruebas se obtuvieron estadísticos de Fisher y Chi-cuadrado de Pearson significativos $p<0,05$.

En las Tablas 1 y 2 se muestra que existen más individuos sin AA (69,2%) y sin ADDE (76,9%) en el sitio control (río Patía) que lo esperado, y existen más individuos con AA (100,0%) y con ADDE (87,0%) en el sitio expuesto (Laguna de Sonso) que lo esperado. Estos resultados permiten inferir que los niveles de contaminación observados en el ecosistema inciden en la aparición de las alteraciones histopatológicas estudiadas en la branquia de Tilapia.

Tabla 1. Tabla de contingencia de la alteración adaptativa (AA) según el sitio

		Río Patía	Laguna	Total
Sin AA	n	9	0	9
	%	69,2%	0,0%	25,0%
Con AA	n	4	23	27
	%	30,8%	100,0%	75,0%
Total	n	13	23	36
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 2. Tabla de contingencia de la alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE) según el sitio

		Río Patía	Laguna	Total
Sin ADDE	n	10	3	13
	%	76,9%	13,0%	36,1%
Con ADDE	n	3	20	23
	%	23,1%	87,0%	63,9%
Total	n	13	23	36
	%	100,0%	100,0%	100,0%

La Tabla 3 muestra la comparación entre las AA y la época, y la Tabla 4 muestra la comparación entre la ADDE y la época, en ambas pruebas se obtuvieron estadísticos de Fisher y Chi-cuadrado de Pearson no significativos $p > 0,05$. En ambas tablas se deduce que las alteraciones AA (15,8%-35,3% y 84,2%-64,7%) y ADDE (36,8%-35,3% y 63,2%-64,7%) no tienen relación con la época porque presentan una diferencia poco significativa en los porcentajes, es decir que son independientes, lo que implica que la aplicación software diseñada puede utilizarse para diagnosticar preliminarmente patologías como AA y ADDE, para individuos que hayan sido muestreados indistintamente en época, húmeda o seca.

Tabla 3. Tabla de contingencia de la alteración adaptativa (AA) según la época.

		Río Patía	Laguna	Total
Sin AA	n	3	6	9
	%	15,8%	35,3%	25,0%
Con AA	n	16	11	27
	%	84,2%	64,7%	75,0%
Total	n	19	17	36
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 4. Tabla de contingencia de la alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE) según la época.

		Río Patía	Laguna	Total
Sin ADDE	n	7	6	13
	%	36,8%	35,3%	36,1%
Con ADDE	n	12	11	23
	%	63,2%	64,7%	63,9%
Total	n	19	17	36
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Se capturaron tres imágenes por cada individuo control para un total de 39 imágenes analizadas. Estas imágenes establecieron los valores de normalidad lamelar y de filamento. La aplicación software diseñada fue alimentada con los datos morfológicos de normalidad mostrados en la Tabla 5. Con base en estos valores, esta aplicación permite concluir si existe algún tipo de alteración (AA, ADDE o ambas) o si por el contrario el individuo presenta patrones de normalidad lamelar y de filamento.

Tabla 5. Características morfológicas normales para la branquia de tilapia.

Característica morfométrica	Máximo	Mínimo	Promedio
Longitud de lamela (μm)	107,363	40,718	76,535
Ancho de lamela (μm)	9,476	5,383	7,264
Ancho de filamento (μm)	57,584	50,603	54,214
Número de lamelas	186	142	162

La segmentación realizada por la aplicación software no presenta problemas en su proceso, gracias a que se estandarizaron las condiciones de captura de la imagen y de

iluminación. La Figura 4 muestra una imagen de los tres filamentos de un individuo normal, esta imagen fue tomada del banco de 39 imágenes que tiene el sistema.

Figura 4. Imagen de los tres filamentos de una tilapia normal del río Patía (H-E, 10x).



La Figura 5 muestra la segmentación de la imagen mostrada en la Figura 4. Las zonas en rojo corresponden a las lamelas y las zonas en negro corresponden a los filamentos. Los otros filamentos que aparecen en la imagen son excluidos, así mismo las lamelas que se encuentran unidas al borde de la imagen. Luego de segmentar la imagen, se extraen las características y se proporciona el diagnóstico preliminar de apoyo al especialista.

Figura 5. Imagen segmentada de los tres filamentos de una tilapia normal del río Patía (H-E, 10x).



Para valorar los resultados de la aplicación software se realizó una prueba diagnóstica, probando la respuesta de la aplicación ante las patologías lamelares para la cual se diseñó. Se asignaron valores a las alteraciones teniendo en cuenta su presencia o

ausencia en el tejido, el cero (0) indicó ausencia y el uno (1) presencia. La aplicación se comparó con resultados ya diagnosticados de alteraciones adaptativas (AA) y de alteración de distancia de difusión efectiva (ADDE). Se tuvieron en cuenta 13 controles y 20 individuos expuestos con diagnóstico confirmado por el especialista. La Tabla 6 muestra el resultado de la prueba diagnóstica para ambas patologías y la especificidad y sensibilidad de la prueba.

Tabla 6. Fiabilidad diagnóstica de la aplicación.

		Diagnóstico verdadero		
		Patológico	Sano	
Resultado de la prueba (AA)	Positivo	22	0	Sensibilidad = 0,916
	Negativo	2	9	Especificidad = 1,000

		Diagnóstico verdadero		
		Patológico	Sano	
Resultado de la prueba (ADDE)	Positivo	19	4	Sensibilidad = 0,950
	Negativo	1	9	Especificidad = 0,692

Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica de las AA son sobresalientes comparados con los de la prueba diagnóstica de la ADDE. Esto se debe a que con un aumento de 10x es más fácil detectar patologías asociadas con aumento celular del epitelio en los filamentos tanto para la visión subjetiva del especialista como para la visión artificial objetiva de la aplicación software, mientras que para detectar la ADDE es más difícil para el especialista manejar un aumento de 10x, debido a que es necesario utilizar aumentos de 40x y en algunas ocasiones de 100x para establecer un diagnóstico acertado relacionado con la alteración de la DDE. Debido a estas diferencias para medir la presencia de la ADDE, se puede notar la aparición de cuatro falsos positivos en la prueba, lo que determina la disminución del valor de especificidad para esta.

Podemos afirmar que el uso del procesamiento digital de imágenes para cuantificar objetivamente las alteraciones de los biomarcadores histopatológicos, en este caso branquia de tilapia, y ser utilizado como herramienta de ayuda diagnóstica es muy ventajoso, aunque siempre debe ir acompañado del análisis del especialista. También es conveniente abarcar otras alteraciones histopatológicas dentro de la aplicación software, así como emplear el uso de otros aumentos para que el diagnóstico sea lo más objetivo y preciso posible. Hasta el momento no se han reportado estudios referentes a la patología cuantitativa enfocada a las alteraciones branquiales, dando así un paso para que otros investigadores empiecen a utilizar este tipo de tecnología y poder emplear una ayuda diagnóstica rápida, económica y objetiva.

Agradecimientos

El autor principal expresa su agradecimiento a Colciencias y la Universidad del Cauca por el Convenio interadministrativo especial de cooperación No. 086-2007 celebrado entre Colciencias y la Universidad del Cauca. Propuesta jóvenes investigadores año 2007- Desarrollo en aplicaciones de análisis de imágenes. ID 2278. De la misma forma, los autores expresan su agradecimiento a Colciencias por la financiación del proyecto Efectos de la contaminación por metales en la ultraestructura celular de la

biota acuática y poblaciones humanas asociadas a la Laguna de Sonso en el Valle del Cauca. Código: 1106-335-18552. Contrato RC No. 202- 2006.

Bibliografía

1. Abdallah, A.T. (2000). On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution. *Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview*. 287-296
2. Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm, T. Wahli. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34
3. Cajaraville, M.P., M. Ortiz-Zarragoitia. (2006). Specificity of peroxisome proliferation response in mussels exposed to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*. 78: 117-123
4. Castrillón-Fernández, M.J. (2006). *Estandarización de la técnica de procesamiento digital de imágenes en el análisis de biopsias renales*. Tesis Ingeniería Física, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
5. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca. (2007). *Plan de manejo ambiental integral Humedal Laguna de Sonso, municipio de Guadalajara de Buga, Asoyotoco*. Dirección Técnica Ambiental 12:13
6. Domouhtsidou, G.P., V.K. Dimitriadis. (2004). Lysosomal, tissue and cellular alterations in the gills, palps and intestine of mussels *Mytilus galloprovincialis*, in relations to pollution. *Marine Biology*. 145: 109-120
7. Gischler, C. (2005). Pathways of heavy metals and implications for stakeholders, Sonso Lagoon, Colombia. *Architecture and the Build Environment*
8. Leica Imaging Systems. (1996). *Leica QWIN Reference Guide and Leica QUIPS Reference Guide*. Cambridge, England.
9. Marigomez, I., M. Soto, I. Cancio, A. Orbea, L. Garmedia, M.P. Cajaraville. (2006). Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Camoaign 2003). *Marine Pollution Bulletin*. 53: 287-304
10. Méndez, M.F. (2003). *Diagnóstico de la acumulación de metales pesados en dos especies de anuro (Rana catesbeiana) y (Bufo marinus) en músculo y piel en los humedales del Valle del Cauca*. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
11. Moro-Rodríguez, J.E. (2006) Introducción a la patología diagnóstica cuantitativa y sus aplicaciones. *VIII Congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica*. Disponible en URL: <http://conganat.cs.urjc.es>
12. Pacheco, M., Santos, M. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53: 331-347
13. Pooman, K., Farhat, N.J. (2004). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 335-349
14. Sánchez J.G, D.J. Speare, G.J. Johnson. (1997). Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramines-T treatment. *Journal of Fish Diseases* 20: 375-381
15. Speare D.J., H.W. Ferguson. (1989). Fixation artifacts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills: a morphometric evaluation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 780-785
16. Verján, N., C.A. Iregui, A.L. Rey, P. Donado. (2001). Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. *Revista AquaTIC*, No. 15