

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo e implementación de un canal para evaluar el
comportamiento natatorio de peces en etapas tempranas de
desarrollo aplicado a estudios de ecotoxicología**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

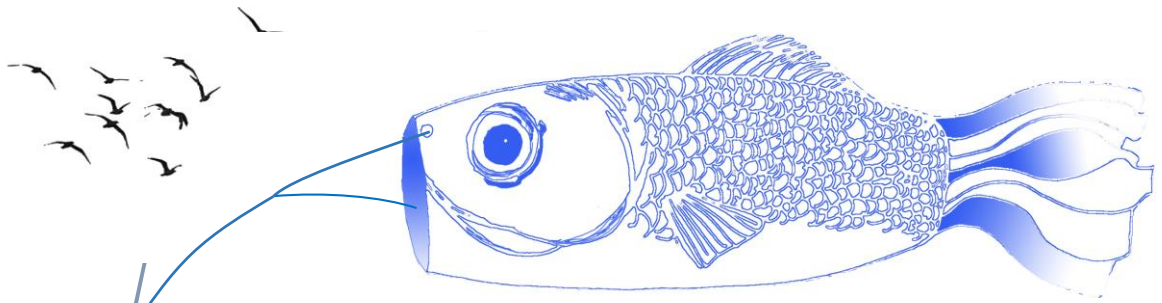
PRESENTADA POR

Salvador Sastre López

Director

Miguel González-Doncel

Madrid
Ed. electrónica 2019



**DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CANAL
PARA EVALUAR EL COMPORTAMIENTO NATATORIO
DE PECES EN ETAPAS TEMPRANAS DE
DESARROLLO APLICADO A ESTUDIOS DE
ECOTOXICOLOGÍA**



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Ángel Salvador Sastre López

Director: Miguel González-Doncel



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Angel Salvador Sastre López
con número de DNI/NIE/Pasaporte 47015126K, estudiante en el Programa
de Doctorado Biología,
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CANAL PARA EVALUAR EL COMPORTAMIENTO NATATORIO
DE PECES EN ETAPAS TEMPRANAS DE DESARROLLO APLICADO A ESTUDIOS DE ECOTOXICOLOGÍA

y dirigida por: Dr. Miguel González-Doncel
Investigador Titular en el Departamento de Medio Ambiente y Agronomía
del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a _____ de junio _____ de 2019

Fdo.: _____

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CANAL PARA EVALUAR EL COMPORTAMIENTO NATATORIO DE PECES EN ETAPAS TEMPRANAS DE DESARROLLO APLICADO A ESTUDIOS DE ECOTOXICOLOGÍA

Memoria presentada por **Ángel Salvador Sastre López** para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Director de la Tesis: Dr. Miguel González-Doncel, Investigador Titular en el Departamento de Medio Ambiente y Agronomía del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Tutor académico: Dr. José Vicente Rovira Sanroque, Profesor Docente e Investigador en el Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución de La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

EL DOCTORANDO

VºBº DIRECTOR

VºBº TUTOR

Miguel González-Doncel Investigador titular en el Departamento de Medio Ambiente y Agronomía del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: “Desarrollo e implementación de un canal para evaluar el comportamiento natatorio de peces en etapas tempranas de desarrollo aplicado a estudios de ecotoxicología”, ha sido realizada bajo mi dirección por Ángel Salvador Sastre López, Licenciado en Ciencias Químicas. El presente trabajo ha sido revisado y es considerado apto para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

Madrid, Junio 2019

Fdo. Miguel González-Doncel

A Domingo Perea Unceta

Haz con cabeza

lo que te pide el corazón

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al desarrollo y conclusión de este trabajo.

Miguel González-Doncel, mi director de tesis, mi amigo. Por su ímpetu en hacer las cosas bien y su generosidad.

José Vicente Rovira, se ofreció a tutelar mi tesis doctoral y, sin conocerme, me dedicó tiempo y me abrió las puertas de su casa. Me ofreció ayuda y apoyo en momentos de gran confusión cuando numerosas variables se escapaban de mis manos.

Mi agradecimiento infinito también a las siguientes personas sin las cuales hubiera sido imposible la consecución de todos los trabajos que conforman esta tesis doctoral:

Carlos Fernández Torija y **Gregoria Carbonell** (Goya), en algunos momentos, co-lideraron con mi director de tesis esta complicada y arriesgada empresa. Por su iniciativa y ayuda en la toma de decisiones en los momentos más complicados del desarrollo del canal y todos los procedimientos experimentales; por transmitir optimismo y ganas de salir adelante en los momentos más difíciles. Por sus conocimientos, experiencia y su fe cuando partíamos de nada más que una hipótesis de trabajo.

Laura San Segundo, como co-responsable de ideas y de la construcción de los diferentes prototipos hasta el diseño definitivo del canal miniaturizado de natación. Colaboró igualmente en la redacción de los documentos de solicitud de la patente.

A **Rosa Rodríguez**, por su implicación los casi dos años del proceso de solicitud de patente. Sin ti no lo habríamos conseguido.

Carlos y **Eulalia María Beltrán** (Laly), lideraron toda la química analítica, una parte indispensable para poder entender el significado de todos los estudios presentados. Pacientes hasta el infinito, nunca dijeron “no” a todos los “ya que” míos y de mi director de tesis.

Verónica Serrano Cabezas y **Pilar García Hortigüela** y **Carmen del Río**, responsables del mantenimiento de la colonia de medakas. Participaron en el desarrollo de todos los procedimientos experimentales descritos. También colaboraron en los cientos de horas de grabación de vídeos y, por qué no, tomas falsas.

A lo largo de estos años han ido pasando por este laboratorio numerosos estudiantes en prácticas: **Cristina González Anaya** e **Irene Aiténzar Pertusa**, estudiantes de fin de máster de la Universidad Politécnica, no sólo realizaron sus prácticas, también aportaron sus ideas, compromiso y trabajo en equipo, aparte de tiempo grabando videos de peces en el canal.

Las aportaciones de **José Antonio Rodríguez Martín** fueron críticas en esos momentos de duda en la interpretación del movimiento de los peces, colaborando en el desarrollo de los mapas de gradiente.

Victoria Pablos (Vicky), ha aportado una visión crítica de todo el trabajo, comentarios y sugerencias que han ayudado a mejorar el desarrollo de esta tesis. Vicky, cómo no, también ha tenido que estar detrás del canal, grabando peces.

Mi recuerdo y agradecimiento a **Luis Zazo**, allá donde estés, por tu disposición y ayuda, entre muchas otras, en diferentes tareas de adaptación del canal al sistema de recirculación cerrado.

I would also like to thank **Dao Nguyen** and **Karl Von Lentz** for proof-reading and critical review of the abstract.

Lucía Muñoz, estuvo al principio de esta tesis aguantando mi locura y la de mi director.

André Kraaijkamp, representante de Noldus, con tus consejos ideas y visitas optimizamos el programa para utilizarlo en el canal.

Sergio Campo aquí estas por escucharme atentamente en Polvorosa

Esther Pérez Corona, la ayuda que me prestaste durante mi estancia en el programa de doctorado ha sido siempre mayor que la que solicité.

Miriam Gurpegui, todos esos correos para ponerme al día de los tejes y manejes de la comisión de doctorado me solucionaron varios quebraderos de cabeza.

África, Tu ayuda con los trámites para presentar esta tesis ha sido crucial para no volverme más loco.

Edu López, Guille Madrigal y José Manuel Gálvez, compañeros transitorios de laboratorio, en el caos está la creatividad.

María Martínez Jáuregui y Mario Soliño, personas claves junto a Guille, Edu y Fernando Montes en mis comienzos en estadística y mapas de calor.

Diana, Mar y Fabián, han estado a mi lado durante todos los cambios que han ocurrido en este proceso de metamorfosis.

Iván Rascon Peña, compañero de la facultad, siempre te has preocupado por mantener nuestra amistad, estos últimos cinco años te lo he puesto difícil.

Gaiz, compañero de FP también me has ayudado.

A mi padre y a mi madre también gracias, ellos porque me han permitido tener todo tipo de fauna y flora en su casa. Mi padre hizo una charca, una jaula para conejos, un

invernadero, un laboratorio secreto. Me dejaron tener hámsteres, gusanos de seda, mariposas, mariquitas, caracoles, peces, cangrejos, periquitos, palomas mirlos, pollos de engorde, ratones, lagartos, tortugas, culebras, renacuajos, sapos, ranas, tritones salamandras, gallipatos etc. Todo ello amplió mi pasión por la Biología.

A mis hermanos, que aunque no les apasiona tanto como a mí la biología, sí que han tenido que sufrir sus consecuencias, han tenido que cavar en la huerta, buscar hámsteres escapados por casa, despertarse al amanecer con los gallos, recoger lombrices, ir a pescar, y mucho más.

Rakel, gracias por tu paciencia, por leer esta tesis, ayudarme en las correcciones y por cuidar de Libe y de mí durante este intenso y laborioso proceso.

Libe, gracias por venir a tiempo.

Domingo Perea, profesor de Ciencias de la Naturaleza en el R.C. Alfonso XII, él ha sido mi profesor de Biología y maestro desde la EGB hasta ahora. Gran parte de lo que soy se lo debo a él, no solo por enseñarme si no por inculcarme esta pasión que tengo por la Biología.

Finalmente, quiero agradecer a quien esté leyendo este apartado y el resto de la información que presento en esta tesis, por dar una oportunidad a que mi experiencia investigadora pueda ser de utilidad a sus conocimientos y futuros trabajos de investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE

TABLAS	vii
ILUSTRACIONES	ix
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xxiii

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Antecedentes	3
Contaminación en los ecosistemas acuáticos	4
Ecotoxicología y ecosistemas de agua dulce.....	5
Los peces como modelos experimentales en ecotoxicología	6
El medaka (<i>Oryzias latipes</i>) como modelo experimental.....	8
Biomarcadores en peces e implicaciones ambientales.....	11
El comportamiento como biomarcador	13
La natación.....	16
Los canales de natación en ecotoxicología.....	18

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS	23
-----------------	----

CAPÍTULO 3

DISEÑO Y CONFIGURACIÓN PARAMETRICA DEL CANAL DE NATACIÓN	27
Introducción	27
Materiales y métodos	30
Diseño y montaje	30
Mantenimiento de la colonia reproductora de peces	32
Configuración del espacio de natación.....	33
Cálculo de las velocidades del agua con relación al caudal.....	33
Visualización de la laminaridad de los caudales	35

Resultados	36
Espacio de natación	36
Velocidad del agua con relación al caudal	36
Velocidades de fatiga	37
Laminaridades de los caudales	38
Sistema de grabación	40
Discusión.....	40
 <u>CAPÍTULO 4</u>	
VALIDACIÓN DEL CANAL MEDIANTE UN ENSAYO NEUROTÓXICO CON CLORPIRIFOS	47
Introducción	47
Materiales y métodos	48
Reactivos y análisis químicos.....	48
Exposiciones.....	49
Obtención de los datos cinemáticos.....	51
Procesamiento de los datos cinemáticos	53
Análisis estadístico de los datos cinemáticos.....	54
Resultados.	55
Estabilidad de CPF en agua	55
Distancias relativas recorridas.....	56
Mapas de gradiente	57
Áreas de residencia.....	63
Discusión.....	67
 <u>CAPÍTULO 5</u>	
EFFECTOS DE BDE-47 EN LA NATACIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO DEL MEDAKA	73
Introducción	73
Materiales y métodos	78
Reactivos y preparación de dietas con BDE-47	78

Exposiciones a BDE-47	79
Evaluación del crecimiento	82
Cuantificación de BDE-47 en dieta y peces	83
Obtención, procesamiento y análisis estadístico de los datos cinemáticos	85
Resultados	86
Crecimiento.....	86
Cuantificación de BDE-47 en dietas.....	87
Cuantificación de BBDE-47 en peces.....	88
Distancias relativas recorridas.....	89
Mapas de gradiente	90
Áreas de residencia	94
Discusión.....	98
<u>CAPÍTULO 6</u>	
EFFECTOS EN LA NATACIÓN DE ELEUTEROEMBRIONES DE MEDAKA POR TRANSFERENCIA MATERNA DE BDE-47	
	111
Introducción	111
Materiales y métodos	112
Reactivos y preparación de dietas con BDE-47	112
Exposición de parentales a BDE-47	113
Cuantificación de BDE-47 en parentales y eleuteroembriones	114
Obtención, procesamiento y análisis estadístico de datos cinemáticos	115
Resultados	116
Cuantificación de BDE-47 en parentales y eleuteroembriones	116
Distancias relativas recorridas.....	117
Mapas de gradiente	118
Áreas de residencia	119
Discusión.....	121
CONCLUSIONES.....	129

BIBLIOGRAFIA.....	133
ANEXOS.....	147
ANEXO I.....	
ANEXO II.....	
ANEXO III.....	
ANEXO IV.....	

TABLAS

Tabla 3.1. Condiciones del caudal de agua para cada etapa de desarrollo evaluada	36
Tabla 5.1. Composición nutricional del alimento base empleado para las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta	78
Tabla 5.2. Longitud y ancho de los peces según el tratamiento y etapa de desarrollo	87
Tabla 5.3. Concentraciones de BDE-47 analizadas en las dietas previamente fortificadas	87
Tabla 5.4. Trabajos experimentales publicados sobre los efectos de BDE-47 en etapas tempranas de peces tras exposiciones acuosas.	100
Tabla 5.5. Trabajos experimentales publicados sobre los efectos de BDE-47 en peces tras exposiciones a través de la dieta	103
Tabla 5.6. Datos disponibles en la literatura sobre la bioacumulación de BDE-47 en peces procedentes de entornos naturales con presencia de BDE-47 y de otros PBDEs	107

ILUSTRACIONES

Figura 1.1. Diferenciación morfológica del pez japonés medaka según la etapa de desarrollo.....	11
Figura 1.2. Relevancia según la respuesta de diferentes biomarcadores de acuerdo con el nivel de organización biológico.	13
Figura 1.3. Dimorfismo sexual del pez medaka (<i>Oryzias latipes</i>).....	19
Figura 3.1. Túnel de natación tipo Brett.....	27
Figura 3.2. Sistemas comerciales para estudio de comportamiento.	29
Figura 3.3. Sistema de evaluación.....	32
Figura 3.4. Relación polinómica entre el caudal y su velocidad en el canal de natación.	37
Figura 3.5. Resultados obtenidos del cálculo de las velocidades de fatiga para las etapas de desarrollo correspondientes a 0-2, 20-27 y 40-47 dde.	38
Figura 3.6. Fotogramas representativos de los vídeos del comportamiento del caudal de agua en el espacio de natación para las diferentes velocidades de fatiga seleccionadas en cada etapa de crecimiento.....	39
Figura 3.7. Fotogramas tipo correspondientes a los videos de grabación digital del comportamiento de los peces.	
Figura 4.1. Estructura molecular del CPF (O,O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosfotionato).....	48
Figura 4.2. Esquema que muestra las tres etapas del crecimiento del pez que fueron seleccionadas para su exposición a CPF.....	51
Figura 4.3. Representación de las superficies bidimensionales de las arenas que delimitan el espacio de natación para las etapas de desarrollo de “0 dde”, “20 dde” y “40 dde”.....	52
Figura 4.4. Concentraciones de CPF medidas en los intervalos de tiempo seleccionados en volúmenes agua de 50 ml con CPF y 5 peces de 20 y 40 dde	56
Figura 4.5. Distancias relativas recorridas por los peces tratados en etapas tempranas del desarrollo correspondientes a “0 dde”, “20 dde” y “40 dde”.....	57
Figura 4.6. Mapas de gradiente de los peces de 2 dde.....	60
Figura 4.7. Mapas de gradiente de los peces de 20-22 dde.....	61

Figura 4.8. Mapas de gradiente de los peces de 40-42 dde.....	62
Figura 4.9. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 2 dde.	64
Figura 4.10. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 20- 22 dde.....	65
Figura 4.11. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 40- 42 dde.....	66
Figura 5.1. Estructura química genérica de los cuatro tipos de retardadores de llama orgánicos bromados: a) TBBPA, b) HBCD, c) PBB y c) PBDE..	74
Figura 5.2. El PBDE probablemente más representativo: 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47).....	76
Figura 5.3. Diseño experimental de las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta a lo largo del crecimiento de los peces	81
Figura 5.4. Bioacumulación de BDE-47 en peces expuestos a tres dietas fortificadas con 10, 100 y 1000 ng/g de BDE-47.....	88
Figura 5.5. Distancias relativas recorridas por los peces en los tiempos de muestreo de 20 y 40 días expuestos a tres dietas fortificadas con 10, 100 y 100 ng/g de BDE-47. Los grupos "0a", "0b" y "CPF".....	89
Figura 5.6. Mapas de gradiente del día 20 de muestreo.	92
Figura 5.7 Mapas de gradiente del día 40 de muestreo.	93
Figura 5.8. Representación de los mapas de áreas de residencia del día 20 de muestreo de las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta.	96
Figura 5.9 Representación de los mapas de áreas de residencia del día 40 de muestreo	97
Figura 6.1 Diseño experimental de las exposiciones a BDE-47 de eleuteroembriones mediante transferencia materna.....	113
Figura 6.2. Bioacumulación de BDE-47 en medakas parentales y eleuteroembriones de ≤ 1 dde tras 40 días de exposición de los parentales.....	117
Figura 6.3. Distancias relativas recorridas por los eleuteroembriones de 2 dde..	117

Figura 6.4. Mapas de gradiente de eleuteroembriones de 2 dde procedentes de parentales expuestos a BDE-47 a través de la dieta durante 40 días..... 119

Figura 6.5. Representación de los mapas de áreas de residencia de eleuteroembriones de 2 dde procedentes de e parentales expuestos a BDE-47 a través de la dieta durante 40 días..... 120

ABREVIATURAS

ASTM. (*American Standards for Testing and Materials*)

BDE: Bromo difenil éter

BDE-47: 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter

BFR *Retardador de llama bromado (Bromo Fire retardant)*

bw: Peso corporal (*Body Weight*)

CE: Contaminante Emergente

CMPT: Concentración media ponderada en el tiempo

CPF: O,O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosfotionato. Clorpirifos

dde: Días después de la eclosión

DMSO: Dimetil sulfóxido

ECHA: Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (*European Chemicals Agency*)

GC: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)

HBCD: hexabromociclododecano

Kow: Coeficiente de reparto Octanol Agua (*Coefficient octanol water*)

lw: Peso lípidos (*Lipid weight*)

MS: Espectrometría de masas (*Mass spectrometry*)

NASA: Administración Norteamericana de Aeronáutica y Espacio (*National Aeronautics and Space Administration*)

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

PBB: Polibromo bifenilo

PCB: Policloro bifenilo

PBDE: Polibromodifenil éter

Q: Caudal

REACH: Registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos (*Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*)

Rs: Remplazo Reducción y Refinamiento (*Replacement, Reduction and Refinement*)

SD: Desviación estandar (*Standar desviation*)

Secc: Sección del volumen de agua que fluye por el canal

SEM: Error Estandar de la Media (*Stantard Error of the Median*)

TBBPA: Tetrabromobisfenol-A (*Tetrabromobisphenol-A*)

U_{crit}: Velocidad Crítica

Vel: Velocidad

ww Peso húmedo (*Weight wet*)

RESUMEN

RESUMEN

El progreso de nuestra sociedad se debe en gran medida a la generación de una ingente cantidad de sustancias químicas, muchas de las cuales tiene su destino final en los ecosistemas acuáticos continentales con el consiguiente impacto sobre su estructura y funcionamiento. En este escenario, los bioensayos ecotoxicológicos se presentan como unas herramientas esenciales para la evaluación del riesgo de sustancias químicas y donde los peces debido a su posición trófica y valor ecológico son bioindicadores ideales. Los bioensayos con peces se basan en el desarrollo de biomarcadores sensibles y ecológicamente relevantes entre los que la natación es, posiblemente, la cualidad más básica sobre la que se sostienen todos los demás tipos de comportamiento. Cualquier alteración en el comportamiento de la natación puede reflejar cambios sobre niveles de organización ecológicamente relevantes. La importancia de este tipo de biomarcador radica en la existencia de una gran cantidad de sustancias químicas capaces de ejercer efectos de tipo neuroconductual. Actualmente la mayoría de los estudios desarrollados en este campo con modelos experimentales de peces han recurrido a configuraciones experimentales consistentes en entornos estáticos y restringidos sobre los que se aplican estímulos externos.

Recurriendo como modelo al pez medaka (*Oryzias latipes*), esta tesis tuvo como objetivo el desarrollo e implementación de un canal para evaluar el comportamiento natatorio de peces en etapas tempranas de desarrollo aplicado a estudios de ecotoxicología, y su implementación como biomarcador del comportamiento natatorio. El sistema, patentado, permite velocidades de agua y espacio de natación variables de acuerdo con el periodo de desarrollo del pez, ofreciendo un amplio espacio para el movimiento y la adopción de estrategias de natación de modelos pequeños de peces experimentales. Su integración en un sistema de captura y análisis de imágenes permite llevar a cabo un seguimiento del movimiento del pez al modelizar su posicionamiento a través de mapas de gradiente a lo largo del canal. Una vez diseñado y configurado, el

Resumen

canal se validó mediante la evaluación de la natación forzada tras exposiciones de 48 h a una sustancia neurotóxica, O,O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosfotionato, clorpirifos (CPF: 12,5, 25, 50 y 100 µg/L) en tres etapas del crecimiento del medaka. Se escogió el CPF por ser un plaguicida con mecanismos de acción conocidos que afectan el desarrollo neuroconductual. Los análisis de los mapas de gradiente y el estadístico revelaron efectos significativos del CPF sobre la natación forzada para las tres etapas y con una clara relación de concentración-respuesta. En general las concentraciones de CPF estudiadas estuvieron por debajo de las publicadas en otros trabajos mostrando efectos en el comportamiento en modelos de peces pequeños. Una vez validado el canal, se valoraron los efectos de 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47: el congénere más abundante de los éteres bifenílicos polibromados) tras dos estrategias de exposición ambientalmente realistas: a través de dieta contaminada durante el crecimiento, y por la transferencia materna como resultado de la exposición de los parentales por dieta contaminada. En la primera estrategia se administró una dieta fortificada con BDE-47 (0, 10, 100 y 1000 ng/g) durante 40 días a medakas de 4-7 días de edad con el objeto de analizar la bioacumulación y los efectos en la natación al alcanzar los días 20 y 40. En general, se observó una bioacumulación del BDE-47 en el tiempo y en una relación dosis-dependiente. Sin embargo, los patrones de natación resultantes de los mapas de gradiente y el análisis estadístico no permitieron concluir efectos del BDE-47 en la natación forzada en ninguna de las dos etapas de 20 y 40 días. En la segunda estrategia se administró una dieta fortificada con BDE-47 (1000 ng/g) durante 40 días a medakas parentales para analizar la bioacumulación por transferencia materna y los efectos en la natación en eleuteroembriones procedentes de huevos recolectados tras los 40 días de tratamiento. Los niveles de BDE-47 detectados en los parentales fueron inferiores a los detectados en la progenie en la etapa de eleuteroembrión indicando una transferencia del contaminante desde la hembra al huevo, Aún así los patrones de natación de los eleuteroembriones del grupo control y

los que contenían a BDE-47 por transferencia materna, mostraron similitud en los patrones de natación

A pesar de la preocupación por la presencia de BDE-47 en los ecosistemas acuáticos, los resultados de nuestros estudios y de otros anteriores recurriendo también a modelos *in vivo* junto con las concentraciones de BDE-47 detectadas en peces procedentes de entornos naturales no parecen ser concluyentes acerca de las implicaciones ambientales de BDE-47 y del riesgo real sobre la condición neuroconductual de peces procedentes de entornos naturales.

La investigación presentada en esta tesis ha desarrollado, validado y aplicado un canal de natación miniaturizado para el análisis cuantitativo del comportamiento de la natación en etapas de crecimiento del medaka. Los resultados apoyaron la validez del canal de natación y su implementación en estudios ecotoxicológicos que se podría utilizar en modelos de peces de pequeño tamaño, de 1 a 40 mm, ofreciendo un escenario ambientalmente más realista para la evaluación de efectos de tipo neuroconductual con modelos de este tipo de peces.

La presente tesis ha sido financiada de forma conjunta por los Proyectos del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad CTM2013-44986-R, CTM2014-52388-R y RTI2018-096046-B-C21.

Los peces utilizados en los experimentos se manipularon de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), y la Directiva 86/609/EEC sobre la protección de animales para experimentación y otros fines científicos dentro del Marco de la Unión Europea.

ABSTRACT

ABSTRACT

This thesis is titled “Development and implementation of a miniaturized swimming flume to evaluate the swimming activity in growing stages of small fish models applied to ecotoxicological studies”.

The progress of human society is largely due to the generation of a myriad of chemical substances, most of them irremediably end-up finding their way into continental aquatic bodies through different processes with consequent harm to ecosystems and humans. In this scenario, the ecotoxicological bioassays are essential tools for the ecological risk assessment of chemical substances and fish are effective bioindicators due to their trophic position and ecological role. Fish bioassays rely on the development of sensitive and ecologically relevant biomarkers and swimming is, arguably, the most basic and demanding quality upon which all other types of behavior are sustained. Any change in swimming behavior may reflect changes on ecologically relevant levels of organization. The importance of this type of biomarker lies in the existence of a large number of chemicals that exert -or are suspect of- neurobehavioral effects. To date, the vast majority of the investigations carried in this field with small fish models have relied on experimental set-ups generally consisting of static and constrained environments to which external artificial stimuli were applied.

Resorting to the medaka fish (*Oryzias latipes*) as model, this thesis aimed to develop a miniaturized swimming flume adapted to a closed recirculating system to evaluate swimming activity in stages during its growing period for its implementation as biomarker of fish behavior in ecotoxicity studies. The patented apparatus, assisted by variable flow rates and arena lengths according to developmental period, allows ample movement and swimming strategies of small fish models. Once integrated into an image capture and analysis system, fish movement can be tracked to model surface gradients (*i.e.* gradient maps) of its positioning along the flume. We sought to evaluate the validity and sensitivity of the dynamic apparatus by considering chlorpyrifos (CPF), a pesticide

Abstract

with known mechanisms of action that affect neurobehavioral development. medaka fish in three developmental periods were exposed to waterborne CPF (12.5, 25, 50 and 100 µg/L) for 48 h to subsequently perform the swimming trials for each corresponding stage. The integrative analysis of the gradient maps and the numerical statistics revealed stage-specific effects and a concentration-response relationship between CPF and alterations on forced medaka swimming. The CPF concentrations assayed were comparable or well below those in the literature reported to have induced behavioral effects in small fish models. Once validated, the miniaturized swimming flume was used to evaluate the effects on swimming activity of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), acknowledged as the most abundant congener of all polybrominated diphenyl ethers, by two environmentally realistic exposures approaches. Firstly, a diet fortified with BDE-47 (0, 10, 100, and 1000 ng/g) was dosed to 4-7-day-old post-hatch medaka fish for 40 days to analytically quantify the bioaccumulation and effects on the forced swimming on days 20 and 40. Altogether, BDE-47 resulted in steady accumulation with time and dose-dependently. The swimming patterns seen on time points 20 and 40 indicated that a dietary exposure did not affect swimming behavior at growing stages in the medaka. Secondly, breeding medakas were fed a diet fortified with BDE-47 (1000 ng/g) for 40 days to collect pools of embryos in order to analytically quantify the BDE-47 in parents and in the ≤ 1-day-old post-hatch offspring and to evaluate the active swimming behavior of the 2-day-old post-hatch eleutheroembryos. The BDE-47 levels detected in parents were comparatively lower than those detected in the offspring in the eleutheroembryonic stage revealing the effective contaminant transfer from gravid females to eggs. The comparable swimming patterns seen in the reference control with those in the maternally-exposed eleutheroembryos were supported by the absence of numerical differences. Overall, these data indicated that the active swimming behavior in eleutheroembryos was not affected by parental BDE-47 dietary exposure. Previous research works relying on diet as exposure route to BDE-47 revealed bioaccumulation values in fish generally higher than those detected in our experimental approaches.

However, the presence of BDE-47 documented in wild fish species has shown to be lower than the accumulation and maternal transfer levels observed in our two exposure approaches. Despite current concern about the environmental risk of BDE-47 on fish, our studies and previous studies available to date that have also used *in vivo* models, in addition to the presence of BDE-47 documented in wild fish species, are not conclusive as to whether the environmental concentrations of this substance may pose a real risk to the neurobehavioral condition of fish in natural environments.

The research presented in this thesis has developed, validated and applied a miniaturized swim flume for a quantitative behavioral analysis of the swimming behavior of small-sized fish models at growing stages. Overall, the results indicated the validity of this swim flume toward a more environmentally realistic scenario for the evaluation of neurodevelopmental and behavioral toxicity in small fish models in ecotoxicological studies.

This thesis has been jointly supported by the Spanish Government Grants Program Oriented to the Challenges of the Society CTM2013-44986-R, CTM2014-52388-R and RTI2018-096046-B-C21.

The medaka fish used in the experiments were manipulated in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), and Directive 86/609/EEC on the protection of animals for experimental and other scientific purposes in the European Union."

INTRODUCCIÓN GENERAL



INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes

El progreso del ser humano y de las sociedades que este forma ha avanzado de la mano de la ciencia, la tecnología y el descubrimiento de nuevos materiales, sustancias y productos. Este progreso está siendo posible por el uso constante de los recursos que nos vienen ofreciendo los diferentes ecosistemas que conforman nuestro planeta, utilizados de manera abusiva hasta el punto de haber modificado el 80% de la superficie de la tierra disponible y estar destruyendo su biodiversidad a un ritmo alarmante (Ceballos *et al.*, 2015; De Vos *et al.*, 2015). Los factores siempre humanos, responsables de la deforestación, pérdida y reemplazamiento de hábitats naturales, sobrecaza y sobrepesca, contribuyen a esta degradación (Zalasiewicz *et al.*, 2010; Vince, 2011).

Aunque de un modo mucho más silencioso y difuso, la contaminación por productos químicos de origen humano es otro factor adicional responsable del deterioro ambiental. Entre los contaminantes químicos más relevantes y de preocupación general se incluyen fitosanitarios, metales pesados, productos químicos derivados del petróleo, y en los últimos años, todas aquellas sustancias empleadas para el cuidado personal, fármacos, además de hidrocarburos halogenados y compuestos organobromados (EC, 2006). Se ha estimado que la industria química durante el siglo XX ha venido produciendo anualmente cerca de 1000 sustancias químicas de nueva síntesis, liberando al ambiente por diferentes vías unos 100 millones de toneladas anuales (Vitousek *et al.*, 1997). Muchas de estas sustancias son peligrosas, potencialmente peligrosas, o se desconoce el riesgo que pueden tener para la salud humana y el medio natural. A principios de este siglo la producción se ha incrementado hasta el punto que solo Europa genera al año unos trescientos millones de sustancias químicas y nuevos productos químicos (Eurostat, 2017). Esta situación de producción imparable de sustancias químicas, unida al desconocimiento de los efectos de muchas de ellas,

originó la creación de diferentes organismos internacionales con el objeto de establecer un control y generar un conocimiento en cuanto a sus peligros y riesgos. A pesar de la gran cantidad de información disponible actualmente, el número de productos nuevos comercializados y su volumen de producción obligan al desarrollo permanente de estudios que generen información acerca de los peligros y riesgos potenciales de cada uno, de esos compuestos químicos.

La Agencia Europea de sustancias y mezclas químicas (ECHA, *European Chemicals Agency*) creada el 1 de junio de 2007, es el organismo encargado del cumplimiento del Reglamento relativo al registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH, *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), siendo así responsable de regular la producción y el uso de sustancias químicas en la Unión Europea (EC, 2006). La ECHA actúa coordinadamente con otras organizaciones responsables del desarrollo de guías de ensayos toxicológicos y su normalización (e.g. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, OCDE y la *American Standards for Testing and Materials*, ASTM), con la finalidad doble de proteger la salud humana y el medio natural. De todos estos compartimentos, la contaminación del medio acuático en general, y del agua dulce en particular, ha sido históricamente y viene siendo objeto de gran preocupación en el ámbito regulatorio. Sin duda esta preocupación se debe a la enorme limitación y la progresiva pérdida de recursos de agua dulce disponible, un agua que representa únicamente el 0,007% del agua total del planeta (Shiklomanov, 1993; National Geographic, 2019).

Contaminación en los ecosistemas acuáticos

El agua ha dado lugar a medios complejos y mucho más diversos que los terrestres. Más allá de que el agua sea considerada disolvente universal e independientemente de sus propiedades físico-químicas, las sustancias químicas terminan asociadas y

movilizadas por el agua tendiendo a formar parte de diferentes compartimentos ambientales, llegando estas a destinos finales como cauces de ríos, lagos u otros medios acuáticos. Es en estos destinos donde se encuentran tanto en disolución como en suspensión, unidos a partículas o precipitados en sedimentos. Muchas de esas sustancias químicas tienen el potencial de bioacumularse en tejidos y órganos, pueden transferirse y biomagnificarse a través de los diferentes niveles en la escala trófica, e incluso pueden llegar a transferirse desde los padres a la progenie (Dell’Omo, 2002).

Ecotoxicología y ecosistemas de agua dulce

En cuanto al marco legislativo referente a todo el proceso de evaluación y valoración del riesgo ambiental de las sustancias químicas, este se cimienta sobre el conocimiento de la peligrosidad que presentan estas sustancias sobre modelos biológicos representativos de estos medios y sobre la exposición a la que se pueden encontrar sometidos (EC 2006). El peligro de que una sustancia cause efectos adversos sobre un ecosistema es inherente a las propiedades físico-químicas de la misma. Sin embargo, el riesgo que presenta esa sustancia para un ecosistema está asociado a la probabilidad de que esos efectos adversos sobre los organismos se produzcan. Por lo tanto, el riesgo se puede controlar en la medida que se controle la liberación al medio y la exposición en los diferentes ecosistemas.

Para la determinación del peligro de una sustancia se utilizan los experimentos comúnmente denominados bioensayos ecotoxicológicos. La ecotoxicología aborda el estudio de los efectos que los contaminantes químicos ejercen sobre la estructura y función de los ecosistemas (Rand, 1985). Bajo esta premisa nos enfrentamos entonces al desafío de abordar la gran cantidad de especies para las cuales se necesitarían datos de efectos (Snape *et al.*, 2004) y qué efectos son los que queremos evaluar y cuantificar. Tal cantidad de información únicamente se puede alcanzar mediante datos obtenidos de diferentes especies o modelos experimentales de laboratorio como bioindicadores

representativos de varios niveles de organización, desde unidades biológicas básicas (*i.e.* cultivos celulares) hasta organismos complejos (*e.g.* algas, micro y macro-invertebrados y vertebrados), junto con datos derivados de estudios en campo (Rice *et al.*, 2000). Esta complejidad hace que la tendencia sea la de concentrar sus estudios en un grupo limitado de modelos experimentales sobre los que poder aplicar y desarrollar diferentes biomarcadores¹ como señales de respuesta y que, por mecanismos de acción conocidos, muchas veces conservados en el tiempo a través de la filogenia de las especies, permitan un cierto grado de extrapolación de los hallazgos entre diferentes organismos (Munns *et al.*, 2003). Por un lado la presión social y los requerimientos de la normativa REACH sugieren una disminución del número de animales en los bioensayos ecotoxicológicos siguiendo el concepto de las tres “Rs”, *replacement, reduction y refinement* ” (Russell y Burch, 1959), mientras que por el otro lado, los mismos requerimientos regulatorios vienen demandando estudios más precisos encaminados al conocimiento de la toxicidad de las sustancias químicas y sus potenciales implicaciones ambientales. Ante este dilema, el uso de organismos vivos representativos del medio acuático enmarcados en lo que vienen a ser los estudios ecotoxicológicos, no puede ser obviado por el momento (Law, 2003).

Los peces como modelos experimentales en ecotoxicología

De todos los modelos experimentales considerados dentro de la ecotoxicología, el grupo de los peces “modernos”, o teleósteos se puede considerar como paradigmático. Los peces, posicionados en niveles superiores en la cadena trófica desempeñan una importante función en cualquier ecosistema acuático, principalmente como depredadores, de tal manera que, independientemente de la exposición directa, los

¹ En ésta tesis doctoral se propone ajustar el término de “biomarcador” al propuesto por Depledge, (1994): “Cualquier variación bioquímica, celular, fisiológica o de comportamiento que se puede medir en muestras de tejido o fluidos corporales, o en el organismo completo y que proporciona evidencia de exposición y/o efectos de uno o más contaminantes químicos y/o radiaciones”.

procesos de bioacumulación de sustancias químicas presentes en el compartimento acuático se pueden ver magnificados al llegar a ellos (Solbé, 1993). Si observamos la gran variedad de especies de peces existentes, se aprecia una situación única en la naturaleza en la el número de especies vivas supera el de especies fósiles hasta ahora identificadas. Esto se debe a la gran divergencia a lo largo de los últimos 350 millones de años que ha dado lugar a cerca de 25000 especies. Algo menos de la mitad de éstas viven en ese menos del 1% que comprenden las aguas continentales, lo que pone de manifiesto la extraordinaria capacidad de especialización a los variados ecosistemas acuáticos (Moyle y Cech, 1996). Esta variedad ha posibilitado, entre otras facultades, mecanismos de determinación sexual ambientales o genéticos según la especie, abarcando diferentes estrategias de reproducción que van desde el hermafroditismo simultáneo (órganos reproductivos asociados con ambos sexos masculinos y femeninos) o secuencial (el individuo cambia de sexo en algún momento de su vida), hasta el gonocorismo (*i.e.* presencia de macho y hembra genéticamente separados en una especie) (Nakamura et al., 1998; Powers, 1989).

Se puede afirmar que los peces son un punto de referencia para otros estudios con vertebrados sin que, lógicamente, reemplacen a los mamíferos, aunque se están considerando como modelos alternativos y más económicos en aquellos estudios relacionados con mecanismos de acción moleculares (bioquímicos), fisiológicos e individuales como respuesta a la presencia de contaminantes ambientales.

El medaka (*Oryzias latipes*) como modelo experimental

El medaka, (*Oryzias latipes*) es un pequeño teleósteo (3-4 cm) de agua dulce ovíparo con fertilización y embriogénesis externa. Es nativo de Asia y se encuentra principalmente en Japón, Korea y zonas del este de China, siendo los campos de arroz y lagunas permanentes someras con aguas lénticas sus hábitats preferidos (Shima y Mitani, 2004). Debido a la transparencia del corion, el desarrollo embrionario se puede visualizar con detalle a través de un microscopio de disección con no más de 50 aumentos. El desarrollo embrionario hasta la eclosión viene a durar unos 8-10 días a una temperatura ambiente normal (*i.e.* 24-25 °C) (Yamamoto, 1975; Iwamatsu, 2004). El embrión, aunque eclosiona con un saco vitelino de un tamaño significativo, ya es plenamente autónomo con una organogénesis muy avanzada y capacidad de tomar alimento exógeno (Figura 1.1). En esta etapa de la vida, el pez se denomina eleuteroembrión. Transcurridos unos 3-4 días dependiendo de las condiciones ambientales, el eleuteroembrión agota las reservas energéticas del saco vitelino y, macroscópicamente, su morfología evoluciona progresivamente culminando con la osificación del esqueleto axial y la diferenciación inicial de radios en la aleta caudal, continuando por la ventral para mostrarse como un individuo en etapa larvaria. Hasta este el momento, el pez apenas ha adquirido algún tipo de experiencia con el entorno por lo que sus movimientos son poco predecibles frente a condicionantes externos, aunque muestra respuestas innatas relacionadas con su supervivencia. La etapa de alevín se suele alcanzar pasados unos 20 días después de la eclosión (dde) con el proceso de diferenciación progresiva de las aletas ventrales junto con la aparición de radios en todas ellas hasta alcanzar el periodo juvenil, transcurridos ya aproximadamente 40 dde. Es en esta etapa, el pez ya ha tenido suficiente tiempo para adquirir un conocimiento del entorno y orientación, pudiendo adoptar comportamientos más predecibles. La madurez sexual junto con la diferenciación fenotípica o caracteres sexuales secundarios (*i.e.* protuberancia urogenital, procesos papilares en los radios de

la aleta ventral y radios discontinuos en la aleta dorsal) suele alcanzarse pasados los 100 dde. Aun siendo un pez habituado a ambientes lénticos, el medaka presenta la capacidad innata o habilidad de nadar contra la corriente en medios lóuticos, donde el agua fluye. Esta propiedad, denominada reotaxia positiva, usa el sistema de la línea lateral que le permite un mayor aporte de oxígeno y una orientación y posicionamiento ante una corriente estable (Lyon, 1904).

Frente a la variedad de especies de peces, más que a aquellas representativas de un determinado ecosistema, la ecotoxicología, viene recurriendo a modelos o especies comunes y de fácil cultivo teniendo en cuenta diferentes factores como el espacio disponible, la duración del ciclo de vida y la posibilidad de contar con un número elevado de individuos para poder dar robustez estadística a los bioensayos. Estas variables facilitan el diseño y desarrollo experimental de los estudios reduciendo los costes sin comprometer la significación de los resultados, a la vez que facilita la reproducibilidad y las comparaciones experimentales entre diferentes laboratorios (Powers, 1989; Hinton *et al.*, 2005). De las especies reconocidas actualmente y con mayor aceptación como modelos experimentales en ecotoxicología y otras áreas de las ciencias destacan la carpita cabezona (*Pimephales promelas*), el fúndulo (*Fundulus heteroclitus*), el pez cebra (*Danio rerio*), y el pez Japonés medaka (*Oryzias latipes*). Un análisis filogenético y biogeográfico comparativo de estas especies y sobre su versatilidad en las diferentes áreas de las ciencias puede ser motivo de una larga disertación, y nada más lejos de la intención de esta Introducción el hacerlo, aunque existe gran cantidad de literatura científica que ahonda en este asunto (e.g. Wittbrodt *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Furutani-Seiki y Wittbrodt, 2004; Signore *et al.*, 2009).

Todos los trabajos realizados en esta tesis doctoral han recurrido al medaka como modelo de pez. Durante los últimos 100 años se han venido estudiando multitud de aspectos relacionados con su fisiología, embriología, organogénesis y genética (Yamamoto, 1975). Históricamente, el medaka se caracteriza por ser el primer

Introducción General

vertebrado en el que se han validado las leyes Mendelianas (Ishikawa, 1913; Toyama, 1916). Es también el primer vertebrado no mamífero en el que se ha demostrado la existencia de cruces entre cromosomas sexuales (Aida, 1921), y en el que se ha podido realizar una inducción de la reversión del sexo mediante la administración de hormonas (Yamamoto, 1955). De este modo, se ha demostrado que la determinación sexual del medaka viene condicionada por factores genéticos, identificando la región del cromosoma Y como responsable de la diferenciación del primordio gonadal en tejido testicular (Matsuda *et al.*, 2002). Este pez ha sido también el primer modelo de vertebrado objeto de estudios sobre el desarrollo, el comportamiento y la reproducción en condiciones de micro-gravedad e ingravidez en diferentes programas coordinados con la Administración Nacional Norteamericana de Aeronáutica y Espacio, NASA (Ijiri, 1994,1998; Niihori *et al.*, 2004). Todos estos estudios dan una idea de su versatilidad como modelo experimental en numerosas áreas de las ciencias básicas y aplicadas.

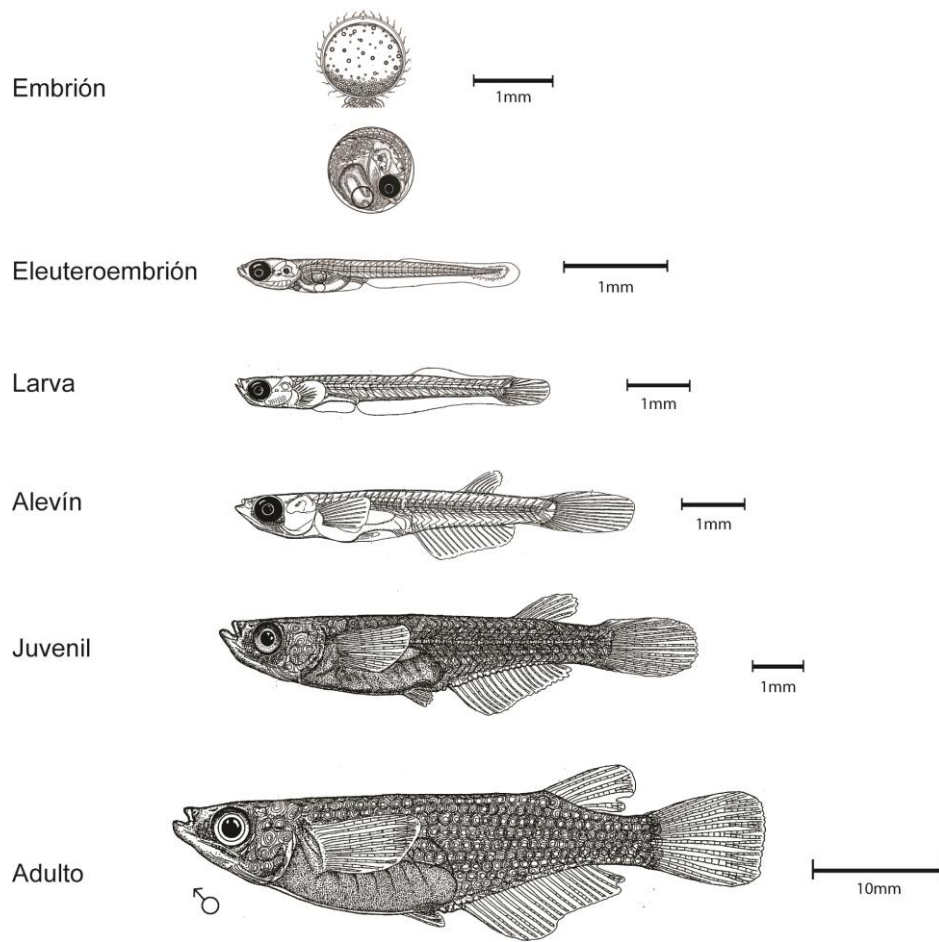


Figura 1.1. Diferenciación morfológica del pez japonés medaka según la etapa de desarrollo. Dibujos de Iwamatsu (2004).

Biomarcadores en peces e implicaciones ambientales

En los bioensayos con organismos acuáticos, y más concretamente con peces pequeños como el Japonés medaka, se han desarrollado biomarcadores relacionados con procesos y señales de tipo bioquímico dentro del organismo. Estos biomarcadores facilitan la agrupación e identificación de los contaminantes en función de su conformación molecular en base a una posible extrapolación de ese mecanismo de acción a otros compuestos químicos de conformación similar o del mismo grupo. La señal de un biomarcador bioquímico implica una respuesta del organismo muy temprana y que puede ser interpretada como señal de aviso al darse con concentraciones del contaminante muy inferiores a las que suelen originar una respuesta con otros

biomarcadores destinados a niveles de organización superiores, e.g. fisiológico o individual (Fairbrother *et al.*, 1999; McLoughlin *et al.*, 2009). Ante esta situación la ecotoxicología, como parte del marco regulatorio actual para la evaluación del riesgo ambiental de las sustancias químicas, se enfrenta a otro problema intrínseco en el que una respuesta básica como puede ser un mecanismo de acción sobre un nivel molecular (e.g. bioquímico) o celular, necesariamente no tiene por qué producir ni una respuesta fisiológica ni, por extensión, comprometer la viabilidad del individuo (Fossi *et al.*, 1994; Peakall, 1994).

Conscientes del valor de esta información, la relevancia “ecológica” de estos biomarcadores puede ser cuestionada (Forbes *et al.*, 2006). La idea actualmente reconocida es la de integrar los diferentes niveles de biomarcadores con el objeto de lograr un compromiso entre el conocimiento, o una aproximación a éste, de los mecanismos de acción y la viabilidad real del organismo (Dell’Omo, 2002; Hinton *et al.*, 2005). De hecho, numerosas líneas de investigación dentro de la ecotoxicología, tratan de abordar la relevancia o el “valor ecológico” de biomarcadores de tipo bioquímico mediante su posible extrapolación con una respuesta de tipo fisiológica e individual puesto que es esta la que verdaderamente puede comprometer la viabilidad del individuo y ser ecotoxicológicamente relevante (Figura 1.2). De hecho, son aquellos aspectos relacionados directamente con el desarrollo general, crecimiento y la reproducción del individuo, los que pueden ofrecer un escenario más realista y próximo a las implicaciones sobre las consecuencias ambientales de las sustancias químicas presentes en los ecosistemas (Little y Brewer, 2001; Weis *et al.*, 2001; Scott y Sloman, 2004).

El comportamiento como biomarcador

A lo largo de las últimas décadas, el comportamiento animal, como parámetro experimental de respuesta del individuo frente a la exposición de sustancias químicas, ha ido adquiriendo un creciente interés. El comportamiento y sus diferentes patrones son una secuencia de acciones que operan a través del sistema nervioso central y periférico (Keenleyside, 1979). Estos surgen a partir de la interacción conjunta de factores bióticos y abióticos, y representan el mecanismo principal por el cual los organismos, mediante la modulación de estos factores, se adaptan a los cambios en su entorno incluyendo la exposición a contaminantes (Evans, 1994). Al ser el resultado de una variedad de procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos, son susceptibles de cualquier tipo de perturbación externa (Warner *et al.*, 1966). Por este motivo, el comportamiento como biomarcador de respuesta posibilita su integración con otros biomarcadores “sub-organísmicos” de tipo bioquímico y fisiológico como pueden ser determinadas actividades enzimáticas relacionadas con procesos fisiológicos que pueden correlacionarse así con una respuesta del animal frente a un condicionante ambiental (Amiard-Triquet, 2009; Weis *et al.*, 2009; Hook *et al.*, 2014).



Figura 1.2. Relevancia según la respuesta de diferentes biomarcadores de acuerdo con el nivel de organización biológico.

Introducción General

De este modo, el comportamiento es un aspecto coordinado que tiene como fin asegurar la viabilidad de la especie que trasciende hasta niveles mucho más allá del individual, siendo un nexo de unión con procesos bioquímicos y fisiológicos responsables, en su conjunto, de ese comportamiento (Warner *et al.*, 1966; Little y Brewer, 2001).

Una exposición a un agente externo y la consiguiente perturbación en el individuo puede afectar a diferentes tipos de comportamiento tales como la sensibilidad y la percepción, la cognición y la coordinación de los diferentes movimientos además de la función motora. Por consiguiente, una modificación de cualquiera de éstos puede originar cambios en el comportamiento entre individuos de la misma especie (*e.g.* social, reproductivo) o en su interacción con diferentes especies (*e.g.* predador/presa), comprometiendo la supervivencia del individuo y por lo tanto el éxito de la población (Dell'Omo, 2002; Gerhardt, 2007; Brodin *et al.*, 2014).

El comportamiento, en ecotoxicología, se considera por lo tanto una herramienta integradora de respuesta del organismo que puede reflejar cambios sobre niveles de organización ecológicamente relevantes (Bridges, 1997; Hellou, 2011). El estudio del comportamiento o etología ahonda sus raíces en los trabajos de Chales Darwin acerca de los aspectos biológicos de la vida emocional incluidos en lo que fue por entonces su tercer trabajo sobre la hipótesis evolutiva, *The Expression of the Emotions in Man and Animals*, en 1872, y que supuso la base de lo que es hoy la genética conductual o del comportamiento. Sin embargo, se considera que la etología moderna comenzó en la década de 1930 con el trabajo del biólogo holandés Nikolaas Tinbergen y de los biólogos austríacos Konrad Lorenz y Karl von Frisch.

Los primeros estudios empleando parámetros relacionados con el comportamiento como respuesta frente a la presencia de agentes xenobióticos se atribuyen a Warner *et al.* (1966). Desde entonces, se viene recurriendo a diferentes métodos para la interpretación de datos relacionados con el comportamiento en sus

diferentes tipos y en diferentes especies acuáticas representativas, con el objeto de conferirles un valor dentro de unos parámetros comprensibles.

De acuerdo con Bayley (2002), el uso del comportamiento en ecotoxicología se viene enfrentando a dos problemas, el primero es la complejidad en cuanto al tipo de comportamientos posibles a analizar y que aumentan con el nivel de organización de la especie animal, siendo muchos de ellos específicos para una u otra especie determinada y por consiguiente difícilmente comparables. El segundo problema a la hora de considerar el comportamiento como indicador de una respuesta a un estrés ambiental está relacionado con las dificultades que surgen en la cuantificación de la respuesta relacionada con el comportamiento y en cómo delimitar esta cuantificación, e.g. decidir cuándo comienza ese patrón de comportamiento y cuándo finaliza. A estos dos inconvenientes se han venido uniendo la falta de metodologías fiables y ambientalmente representativas (Melvin y Wilson, 2013).

A lo largo de los últimos años, el desarrollo de herramientas basadas en captación de imágenes de alta resolución junto con programas informáticos especializados, está posibilitando la obtención de datos cuantificables y repetibles sobre un número elevado de animales o exposiciones, lo que posibilita una comparación visual y numérica simultánea de posibles patrones de comportamiento (Kane *et al.*, 2005; Eddins *et al.*, 2010). En cualquier caso, y como ocurre con otros biomarcadores, el comportamiento como respuesta tras la exposición a una sustancia química no es un indicador de exposición universal, por lo que no tiene por qué ser válido o aportar información de interés ya que no todas las sustancias químicas son susceptibles de ejercer efectos sobre cualquier tipo de comportamiento. Por este motivo, la aplicación de biomarcadores dentro del comportamiento en ensayos ecotoxicológicos debe considerar inicialmente las características químicas del compuesto o grupo de compuestos que pretenden evaluarse, además de las posibles rutas de absorción en las especies acuáticas en cuestión. Factores como el mecanismo de acción de la sustancia, la etapa de la vida, el

modo de captación en el organismo y el destino del compuesto de interés en el medio acuático son aspectos críticos para entender y considerar el comportamiento, o un aspecto de éste, como parámetro indicativo de exposición/toxicidad. En los peces adultos, por ejemplo, mientras que el epitelio branquial y el intestino son las principales rutas absorción, en las etapas más tempranas, la piel es, junto con las branquias, el principal órgano responsable del intercambio y absorción de compuestos (Kane *et al.*, 2005). Todo este panorama da una idea del valor del comportamiento como parámetro en ecotoxicología, pero también de la enorme complejidad implícita a la hora de interpretar sus consecuencias sobre el individuo y su representatividad e impacto ambiental.

La natación

Muchas de las sustancias químicas que se vienen detectando en numerosos compartimentos acuáticos tienen la particularidad de ejercer efectos sobre el sistema neuromotor y por lo tanto, muestran el potencial de alterar el movimiento normal de un organismo. Entre estos contaminantes destacan numerosos metales pesados y plaguicidas además de contaminantes orgánicos dentro del grupo de los denominados emergentes¹ (CE) como los polibromodifenil éteres (PBDEs) y diversas sustancias químicas presentes en productos de higiene personal y fármacos, entre otros.

De las diferentes formas de comportamiento, la capacidad de movimiento es la cualidad más básica e indicativa del estado de salud de cualquier ser vivo, además de un componente sobre el que se sostienen todos los demás tipos de comportamiento como pueden ser la reproducción, la alimentación o la actividad social. En peces, el movimiento más básico se corresponde con la natación, un aspecto único ya que al

¹ Como “contaminantes emergentes” se conocen aquellas sustancias cuya presencia ambiental no es necesariamente nueva, pero que sin embargo no se encuentran incluidas en las listas prioritarias al no existir una regulación ni información armonizada sobre los niveles y efectos reconocidos en los ecosistemas.

realizarse en el agua, se presentan fuerzas gravitacionales y restrictivas de fricción que difieren en gran medida de las que ocurren en el movimiento fuera de este medio. La natación es, del mismo modo que el movimiento en un medio terrestre o aéreo, el indicador del comportamiento más básico de entre todos los comportamientos posibles en el agua, numéricamente definible y que ofrece diferentes grados de complejidad; desde la natación espontánea a la inducida en función de si se consideran variables ambientales externas. La natación puede ser además un factor determinante en la capacidad del pez de entrar en contacto con un contaminante o xenobiótico (Bayley, 2002). Así, cualquier factor que influya en la natación puede tener consecuencias sobre aspectos individuales del pez con implicaciones ecológicas de la especie y de las que conviven con esta. De acuerdo con Scherer (1992), la natación en peces puede dividirse en tres tipos o estrategias; 1) De reacción: Se produce como respuesta a condicionantes ambientales abióticos o bióticos. Es el más complejo de los tres tipos al implicar interacciones muy diversas con un estímulo ambiental tanto abiótico (ruidos o cambios de intensidad lumínica), como con organismos de la misma (social y reproductivo) u otra especie (depredación y escape). Quizás es por ello que ofrece el repertorio de posibles respuestas más amplio, y de mayor dificultad, a la hora de cuantificar e interpretar esas respuestas, y en particular, aquellas motivadas por condicionantes bióticos. Con el objeto de simplificar, cuantificar numéricamente e interpretar la respuesta de natación del pez, como se verá en los siguientes capítulos, la mayor parte de los estudios ecotoxicológicos publicados actualmente recurren al uso de condicionantes abióticos y bióticos en condiciones estáticas basados en estímulos externos tanto naturales como artificiales, *e.g.* ofrecimiento de alimento, ciclos de luz y oscuridad y vibraciones en el medio. 2) Espontánea: Bajo estas condiciones, donde los condicionantes ambientales son mínimos de un modo deliberado, se pueden evaluar movimientos básicos como distancias, velocidades o aceleraciones. En los bioensayos en los que se viene considerando esta estrategia como indicador de exposición se suele recurrir a sistemas o ambientes donde se valora la natación bajo condiciones estáticas o con un flujo de

agua que no afecta el posicionamiento del pez. El movimiento del organismo en estas circunstancias, y en especial en etapas muy tempranas, es poco predecible, siendo, en cierta medida, errático y ajustándose a variables no controlables. 3) Forzada: Mientras que los dos primeros pueden evaluarse en ambientes estáticos, el movimiento forzado requiere condiciones dinámicas en el que el pez debe de realizar una actividad continua adoptando estrategias para mantener la posición. Realizar este tipo de movimiento y poder mantenerlo en el tiempo denota esta capacidad reconocida como un aspecto crítico dentro de la supervivencia en la naturaleza de la especie (Rand, 1985; Scherer, 1992) y que abarca aspectos como duración, rendimiento y posicionamiento, entre otros.

Los canales de natación en ecotoxicología

Independientemente del tipo de natación que se quiere evaluar, los estudios se enfrentan a unos condicionantes experimentales en los que todos los procesos fisiológicos que originan estos movimientos son evaluados y cuantificados en compartimentos muy restrictivos en cuanto a disponibilidad de espacio del pez para moverse.

Tradicionalmente, los túneles o canales con flujos de agua se han desarrollado para estudiar aspectos relacionados con la fisiología y biomecánica, y donde el espacio o longitud disponible suele ser muy limitado (Cook y Coughlin, 2010; Tudorache *et al.*, 2011; Fiaz *et al.*, 2012). Prácticamente todos los avances en nuestra comprensión acerca de cómo se mueven los peces en el agua, su rendimiento muscular, el metabolismo energético y la hidrodinámica durante la natación constante se han logrado mediante el uso de estos túneles de natación. Sin embargo, hasta el momento hay muy pocos trabajos donde se haya recurrido a estos sistemas para evaluar la natación de peces como biomarcador de respuesta tras la exposición a un xenobiótico. Factores como el coste, la implementación de metodologías comprensibles y fáciles de usar, además de las dificultades intrínsecas en la miniaturización dentro de bioensayos con

modelos de especies pequeñas como el medaka, y más aún en etapas tempranas de la vida, han relegado estos túneles y canales al considerarse herramientas poco prácticas y eficientes en estudios ecotoxicológicos (Weichert *et al.*, 2017).

Existen diferentes aparatos para valorar el comportamiento y la fisiología de la natación en peces con tamaños superiores a los 2 cm y con una clara pigmentación del cuerpo (Baba *et al.*, 1989; Pippy, 1993; Lin *et al.*, 2007). Sin embargo, estos sistemas no logran las condiciones experimentales que permiten establecer valoraciones cuantitativas del movimiento de peces de pequeño tamaño. De hecho, el medaka, al igual que las otras especies de peces pequeñas reconocidas como modelos experimentales, no suele alcanzar más de 4 cm en su fase adulta. Esta característica es el principal factor limitante a la hora de cuestionar la utilidad de los túneles disponibles actualmente en el ámbito de la ecotoxicología del comportamiento. La limitación es mayor aun cuando lo que se pretende es valorar el movimiento en etapas tempranas de la vida en las que los peces presentan longitudes mucho menores (e.g. 6 mm), una pigmentación muy escasa, y además, efectúan movimientos poco predecibles y de gran velocidad y aceleración en relación a su tamaño, si los comparamos con los realizados en su edad adulta.

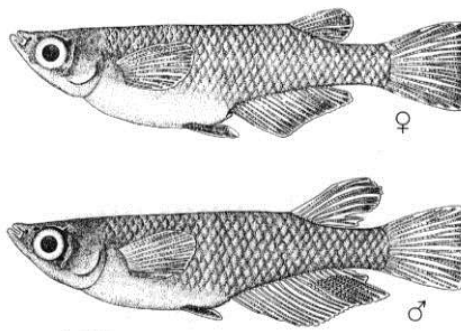


Figura 1.3. Dimorfismo sexual del pez medaka (*Oryzias latipes*). Dibujos de Yamamoto (1955).

Introducción General

De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que la implementación del reglamento REACH exige el desarrollo de ensayos ecotoxicológicos más sensibles, realistas y ecológicamente más relevantes. Al ser el agua el medio receptor inicial y final de la mayoría de los compuestos xenobióticos, el desarrollo de ensayos en este medio es de especial relevancia, puesto que dentro de los organismos acuáticos, los peces ocupan una posición crítica en dicho ecosistema. Los ensayos han de ser capaces de mostrar efectos subletales de respuesta temprana a la presencia de xenobióticos, y el comportamiento natatorio es uno de los más básicos en los peces y por tanto, de especial importancia frente a sustancias químicas con determinadas propiedades tóxicas. La necesidad del desarrollo de estos ensayos junto con la inexistencia de diseños experimentales que cuantifiquen el comportamiento natatorio de especies pequeñas de peces de laboratorio han dado lugar a plantear los objetivos de esta tesis doctoral y que se pasan a describir en el siguiente capítulo.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Considerando los antecedentes expuestos anteriormente y el estado de la técnica en cuanto al comportamiento como parámetro de estudio en ecotoxicología, se propuso la siguiente cuestión de trabajo: *¿Es posible diseñar un sistema dinámico, lo suficientemente enriquecedor desde una perspectiva del movimiento, que permita utilizar la natación en etapas tempranas de peces como biomarcador de efectos sobre el comportamiento natatorio?*

Para la validación de esta cuestión, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Diseñar un canal de natación como sistema de evaluación del movimiento de peces en sus etapas tempranas de la vida. Configurar el sistema de natación de modo que permita capturar el movimiento.
2. Conocer la sensibilidad del sistema de evaluación para utilizarlo en el estudio del comportamiento en la natación de peces (*Oryzias latipes*), tras exponerlos a un contaminante con propiedades neurotóxicas reconocidas.
3. Evaluar utilizando el sistema, los efectos que produce un contaminante emergente. en el comportamiento de *Oryzias latipes*., utilizando la dieta como vector de exposición ambientalmente realista
4. Evaluar utilizando el sistema, los efectos que produce un contaminante emergente en el comportamiento de eleuteroembriones de *Oryzias latipes* utilizando la transferencia materna como vector exposición ambientalmente realista.

Los capítulos que se presentan a continuación abordan cada uno de los objetivos planteados.

Objetivo 1

DISEÑO Y CONFIGURACIÓN PARAMÉTRICA DEL CANAL DE NATACIÓN



El trabajo mostrado en este capítulo dio lugar a la patente europea "Sistema dinámico para analizar un organismo acuático". 2016. ES2 547960 B2. ANEXO I.

DISEÑO Y CONFIGURACIÓN PARAMÉTRICA DEL CANAL DE NATACIÓN

Introducción

El estudio de la biomecánica y fisiología de la natación en peces ha dado lugar a diferentes sistemas, prototipos, e instrumentos. Estos equipos evalúan factores que intervienen en el movimiento del pez induciendo esta respuesta motora al someterlo a un flujo de agua que le obliga a nadar contracorriente (Brett, 1964; Müller *et al.*, 2000 ; Muller *et al.*, 2008; Chun *et al.*, 2011; Fiaz *et al.*, 2012; Beecham *et al.*, 2014). Todos estos sistemas suelen estar diseñados a partir de compartimentos o tubos cerrados con espacios muy restringidos donde el pez es forzado a nadar mediante la aplicación de una corriente de agua (Figura 3.1).

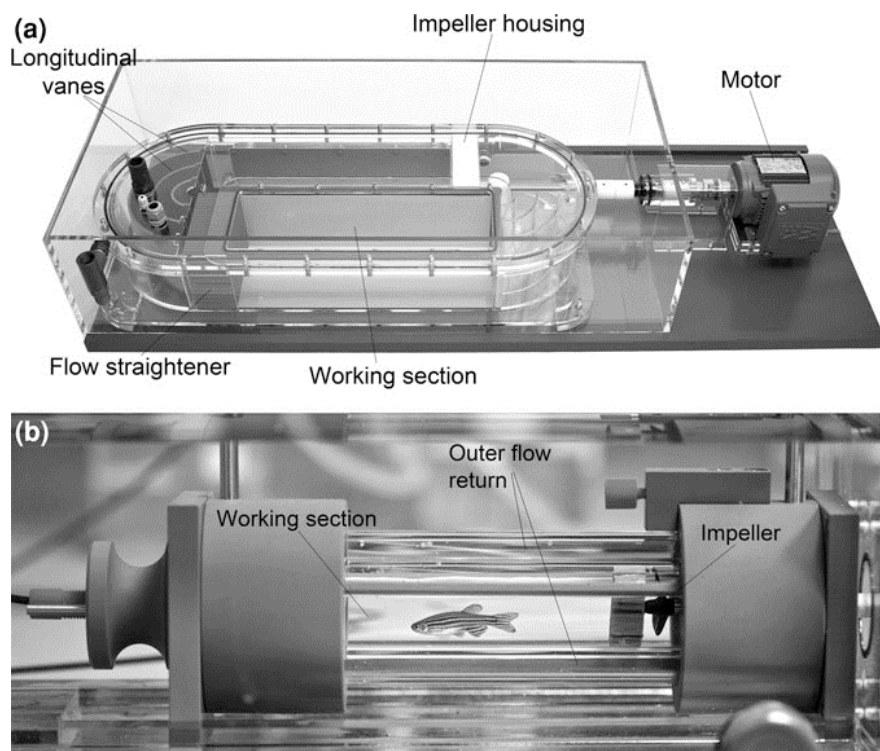


Figura 3.1. Túnel de natación tipo Brett. (a) Perspectiva axonométrica del túnel “Working section” situado en el lateral del recipiente que lo contiene “Flow straightener”. El agua dirigida hacia el túnel mediante láminas de material plástico es impulsada dentro de este a través de la hélice conectada al motor externo. (b) Vista en planta del túnel “working section” donde el pez es sometido a la natación forzada (imágenes obtenidas de Loligo Systems. (<https://www.loligosystems.com/swimtunnels>)

En el área de la ecotoxicología, el uso de peces como bioindicadores dentro del medio acuático ha recurrido a este tipo de sistemas que, junto con equipos de

Diseño

procesamiento y toma de datos digitales, han posibilitado la implementación de la natación como biomarcador en la valoración del comportamiento y el rendimiento de la natación (Bierbach *et al.*, 2017; Carlsson *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Sin embargo, la limitación del espacio, el movimiento y la dificultad de usar estos túneles con diferentes tamaños del pez (*i.e.* edades) limitan su potencial a la hora de valorar la natación forzada como aspecto básico del comportamiento. Aún así, existen ensayos de este tipo donde se han desarrollado sistemas específicos que han permitido evaluar la capacidad de los peces para mantener su posición dentro de un flujo de agua (Gravato y Guilhermino, 2009; Vieira *et al.*, 2009).

Hasta donde se pudo encontrar en la literatura científica y bases de datos, no existía un canal de natación específico para estudios ecotoxicológicos que permitiera evaluar el movimiento forzado en etapas tempranas de la vida de modelos experimentales de peces como el cebrá o el medaka. El mínimo tamaño durante estas etapas de la vida, así como la alta velocidad espontánea (movimiento no predecible o más errático que en etapas más avanzadas) que muestran, dificulta el seguimiento y cuantificación de la natación, tanto en eleuteroembriones como en etapas larvarias. Estas dificultades han motivado que los ensayos destinados a valorar el comportamiento en etapas tempranas hayan derivado a sistemas más sencillos, en detrimento del espacio de natación disponible, y a recurrir a estimulaciones artificiales para inducir el comportamiento natatorio) (Chen *et al.*, 2011, 2012; MacPhail *et al.*, 2009; Legradi *et al.*, 2015; Nüßer *et al.*, 2016), (Figura 3.2).

Actualmente, la evaluación del movimiento dentro del ámbito de la ecotoxicología se viene realizando mediante la obtención de datos cinéticos obtenidos a partir del movimiento, registrado por sistemas digitales de grabación implementados con programas informáticos de cálculo de seguimiento y trayectorias. Esta evaluación y cuantificación está condicionada por dos variables, la resolución de las imágenes de video y la potencia de cálculo de los algoritmos utilizados por los programas.

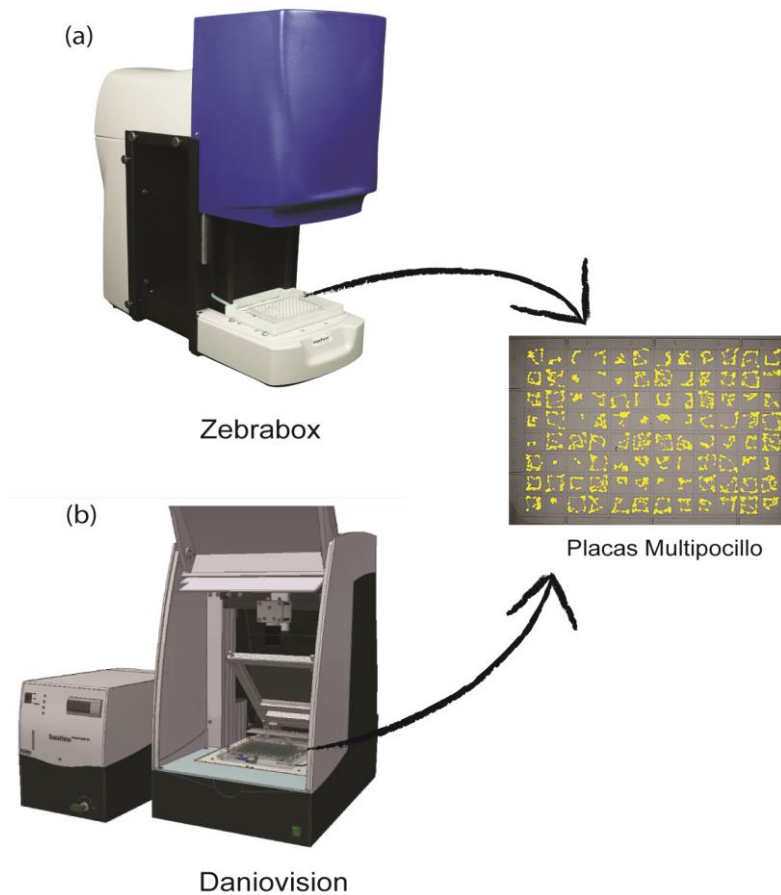


Figura 3.2. Sistemas comerciales para estudio de comportamiento. (a) Zebrabox, sistema comercial para el estudio del comportamiento de eleuterioembriones diseñado y comercializado por Viewpoint. Imagen obtenida de <https://www.viewpoint.fr/en/p/equipment/zebrabox>. (b) Daniovision, sistema comercial para el estudio de comportamiento de eleuterioembriones, diseñado y comercializado por Noldus, Imagen obtenida de https://www.nolduszebrafish.com/research-tool/danio_vision. El espacio de natación en ambos sistemas consisten placas multipocillo.

Existen numerosos programas con gran potencia de cálculo que permiten la obtención de datos cinéticos (e.g. Bemovi, Ctrax, Daniobox, Ethovision XT, Idtracker, Mediamflow, Tracker, Panlab, Toxtrack, SMART, Tracktor). Sin embargo, su funcionalidad está limitada por la resolución y la calidad de la imagen de video de modo que una restricción del espacio disponible para nadar y el uso de un ambiente estático, que evite posibles interferencias, ayudan a minimizar esas limitaciones en la funcionalidad de los programas.

Diseño

En este capítulo se describe una herramienta consistente en un canal³ que ofrece un amplio espacio respecto al tamaño del pez para nadar contracorriente. El movimiento forzado a lo largo y ancho del canal permite al pez adoptar estrategias en la natación a través la respuesta natural e innata de reotaxia. Esta herramienta está configurada de tal modo que posibilita la grabación del movimiento del pez con la resolución y calidad de imagen de video necesarias aún en etapas tempranas cuando el tamaño es muy pequeño y la pigmentación escasa, permitiendo la obtención de datos a través de programas de cálculo de trayectorias. Otros sistemas dinámicos permiten observar y cuantificar el comportamiento (Ward *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2009; Fiaz *et al.*, 2012) pero ninguno ofrece el espacio suficiente para que el pez se mueva libremente y pueda adoptar estrategias de comportamiento en cuanto a la natación y posicionamiento a lo largo del espacio disponible para desplazarse.

Materiales y métodos

Diseño y montaje

Un canal de natación se adaptó a un sistema de recirculación. El canal consistió en una tubería de teflón de 25 mm de diámetro interno y 1,5 mm de espesor. Se realizó una apertura longitudinal de 38 cm dejando 6 cm a cada extremo sin abrir (Figura 3.3). Para mantener la apertura longitudinal, los laterales abiertos se anclaron a lo largo de su longitud por los lados a dos estructuras rígidas. Esta unidad se acopló a una base rígida hueca con espacio suficiente en su interior para introducir una fuente de iluminación longitudinal junto con una lámina difusora de luz y dos placas reflectantes longitudinales, colocadas diagonalmente a los dos lados de la fuente de luz (Figura 3.3). Estas láminas posibilitaron que la luz reflejada sobre su superficie, incidiese con la misma intensidad sobre los laterales y la parte inferior del canal curvo. La distancia entre el canal y la

³ Por canal se entiende un *túnel* abierto longitudinalmente donde el agua que fluye tiene contacto con el ambiente exterior y, por tanto, está sometida a la presión atmosférica.

fuentes de iluminación fue tal, que la luz transmitida por el canal no produjo sobreexposición lumínica de la imagen procedente del interior del canal.

Para mantener constante el flujo de agua, se colocó un depósito “de cabecera” de 20 L de capacidad a un altura aproximada de 30 cm por encima del nivel del canal. Un calentador termostatzado permitió mantener el agua dentro del depósito a una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Dos válvulas de precisión conectaron el depósito de cabecera con el canal. Un caudalímetro (“Blue White Industries”, Huntington Beach, CA, EE.UU.) permitió regular el caudal del agua desde el depósito de cabecera hasta el canal de natación (Figura 3.3). La salida de agua del canal se conectó con un depósito de 700 ml que a su vez alimentaba una bomba de agua. Esta bomba se accionó mediante un interruptor de flotación acoplado a este depósito, enviando al depósito de cabecera pequeñas pero continuas cantidades de agua que mantenían constante el nivel de agua.

El espacio de natación de los peces dentro del canal se delimitó con dos mallas de polietileno con una luz de 500 μm montadas en dos anillos de vinilo de 500 μm de espesor. Estos anillos con sus mallas se pueden insertar mediante presión en diferentes lugares del canal permitiendo delimitar diferentes longitudes de acuerdo con el tamaño o la etapa de desarrollo del pez.

Al sistema se le incorporó un equipo de grabación digital adaptado a un mono-pie regulable en altura permitiéndole colocar el equipo de grabación de video a diferentes distancias sobre el canal en función del tamaño del pez y de la longitud de canal disponible (Figura 3.3). El equipo de grabación consistió en una cámara de vídeo digital con una resolución máxima de 1920 x 1080 píxeles y una velocidad de captura de 25 fps (Canon Legria HF R36, Tokio, Japón).

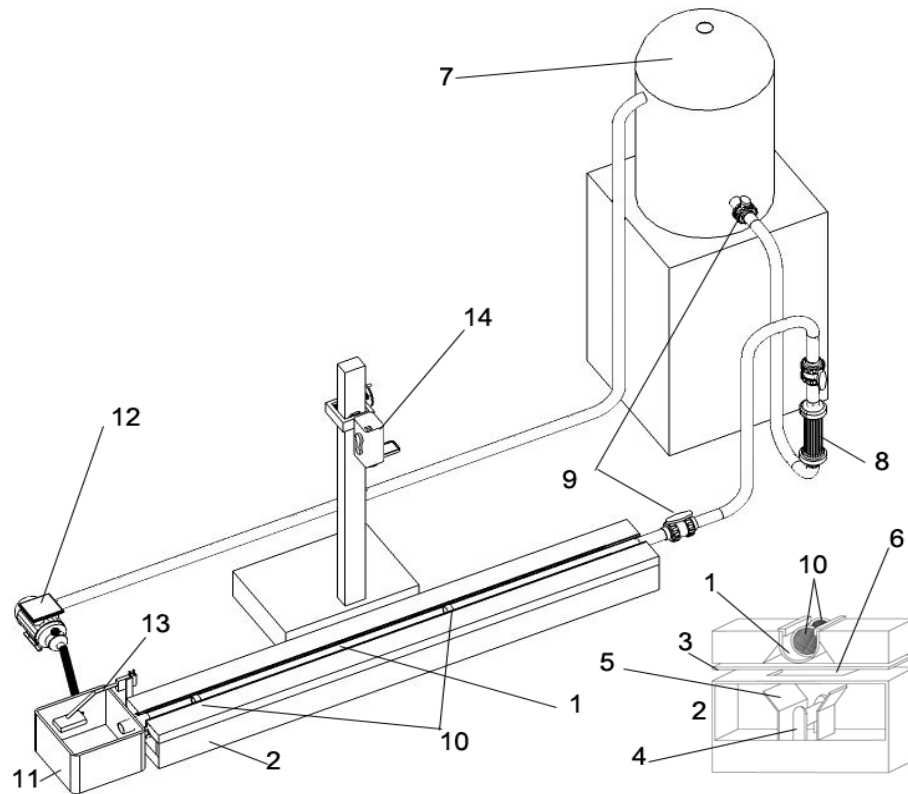


Figura 3.3. Sistema de evaluación, 1 canal de teflón, 2 base rígida, 3 lamina difusora, 4 fuente de luz, 5 pletinas reflectantes, 6 hueco transmisor de luz, 7 depósito de cabecera, 9 válvulas de precisión; 10 mallas de polietileno; 11 deposito, 12 bomba, 13 flotador, 14 sistema de grabación con mono-pie. La imagen inferior derecha muestra en detalle un corte de sección de la base 2, donde se sustenta el canal.

Mantenimiento de la colonia reproductora de peces

Los individuos utilizados para la puesta a punto del canal de natación se obtuvieron de una colonia reproductora de medakas (variedad dorada), ubicada en el Laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Medio Ambiente y Agronomía (INIA). El mantenimiento de estos reproductores se llevó a cabo en un circuito cerrado con agua reconstruida dentro de una cámara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 15 L, 9 O, 500-800 lux). Los registros ambientales históricos de agua del circuito mostraban valores de alcalinidad entre 80 y 90 ppm de CaCO_3 , pH entre 7 y 8 y oxígeno disuelto entorno a 7 mg/L. Los niveles de amoníaco (NH_3) y nitritos (NO_2^-) fueron inferiores a 0.1 mg/L y los de nitratos inferiores a 20 mg/L. Esta colonia se alimentó con cianobacterias liofilizadas de tipo

espirulina) y alimento comercial en copos (Sera Vipar, Heinsberg, Alemania), además de nauplios de *Artemia salina*, *Daphnia magna* y larvas de mosquito de modo esporádico.

Configuración del espacio de natación

El espacio disponible para la natación dentro del canal se seleccionó considerando tres premisas, 1) la longitud debía ser al menos treinta veces mayor que la longitud media comprendida en peces de una edad, con el objeto de permitir el libre movimiento de estos a lo largo del espacio seleccionado; 2) la longitud, el ancho y la profundidad de canal deberían ser suficientemente amplios para que el pez pudiera desarrollar las estrategias de natación forzada necesarias para mantener un posicionamiento más o menos estable en el canal; 3) el número de píxeles que representaban los peces en el video resultante de las grabaciones debía encontrarse entre 3-5 con el objeto de que el programa de análisis de trayectorias pudiera seguir correctamente el movimiento del pez. Teniendo en cuenta estas premisas, el canal se configuró de acuerdo a las siguientes dimensiones, 25 mm de anchura, una profundidad máxima de 16,4 mm y una longitud variable conforme a la primera premisa. El equipo de grabación se situó de tal manera que la captura del movimiento fuera registrada desde una perspectiva en planta del espacio de natación, denominada arena para diferenciarlo del espacio físico donde nadan los peces, de acuerdo con las premisas anteriores.

Cálculo de las velocidades del agua con relación al caudal

El caudal se define como la cantidad de fluido que pasa a través de la sección de un conducto por unidad de tiempo. Según esta definición, el caudal, perpendicular al conducto, se puede expresar matemáticamente como la proporción directa de la velocidad del agua y la sección por donde fluye. Atendiendo a esta definición, la

Diseño

velocidad del agua se calculó dividiendo el valor del caudal indicado en el caudalímetro entre la sección del canal que queda aforada por el flujo de agua.

$$Q = Vel \times Secc \quad cm^3/s = cm/s \times cm^2$$

Donde “Q” es el caudal, “Vel” es la velocidad y “Secc” es la sección del volumen de agua que fluye por el canal (las correspondientes unidades se indican a la izquierda de la ecuación).

Para conocer la sección del canal aforado por el flujo del agua, el canal se rellenó completamente con escayola para realizar un molde que representase el aforo máximo del canal. Sobre este molde se marcaron los aforos correspondientes a diferentes caudales de agua. El área de la sección correspondiente a cada aforo indicado en el molde se fotografió y se midió mediante un programa de análisis de imagen (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EE.UU).

Cálculo de las velocidades de fatiga

Se determinaron velocidades de fatiga para peces con edades comprendidas en tres franjas o ventanas de desarrollo, *i.e.* 0-2, 20-27 y 40-47 dde (Tabla 3.1). Nuestros registros cultivando esta especie de pez, indican una gran variabilidad de las tasas medias de crecimiento entre individuos dentro de un mismo día de vida. Así pues, no se consideró crítico seleccionar espacios de natación y velocidades de fatiga específicas para cada día concreto de desarrollo al haber un solapamiento de las tasas de crecimiento entre varios días contiguos.

Para el cálculo de las velocidades críticas, se siguió una metodología similar a la velocidad crítica (U_{crit}) descrita originalmente por Brett (1964), pero con modificaciones debido a la naturaleza intrínseca de los canales donde la velocidad del caudal está limitada al aforo de estos (Figura 3.5). Una vez estabilizados los parámetros fisicoquímicos del agua del sistema y adaptado el espacio de natación en el canal para

los peces correspondientes a las tres franjas de desarrollo seleccionadas, se calcularon las correspondientes velocidades de fatiga de la siguiente manera Se recolectaron 50 peces aleatoriamente de cada franja de desarrollo y, en grupos de 5, se sometieron a incrementos de velocidad del caudal que oscilaron entre 0,4 y 2,2 cm/s. El intervalo de tiempo entre incrementos de velocidad fue de 6 min. A medida que la velocidad se iba incrementando, se anotaba el intervalo de velocidad y el número de peces que se iban fatigando⁴. Las velocidades de fatiga para cada franja de desarrollo correspondieron al valor más cercano, pero si superólo, en el que se alcanzaba un 60% de peces fatigados conforme se iba incrementando la velocidad del agua. Estas velocidades de fatiga permitirían a los peces, en condiciones normales, nadar activamente en el espacio de natación disponible durante 6 min sin llegar a fatigarse.

Visualización de la laminaridad de los caudales

La laminaridad de los caudales correspondientes a las velocidades de fatiga seleccionadas, se visualizó dosificando una disolución saturada de permanganato potásico con una pipeta Pasteur en la entrada del canal.

Configuración del sistema de grabación

Una vez realizada la puesta en marcha del sistema con las mallas delimitando la zona de natación, elegida la velocidad de fatiga y establecidas las velocidades de agua correspondientes a los diferentes caudales se procedió a configurar el sistema de grabación. La configuración consistió en el encuadre de la arena a través de la cámara de video. La cámara se situó sobre el canal mediante el soporte regulable a una distancia según la tercera premisa descrita en el apartado “*Configuración del espacio*

⁴ En este contexto la *fatiga* se entiende como aquel estado de agotamiento extremo del pez que le impide nadar a lo largo del espacio disponible, con lo que es arrastrado por la corriente quedando atrapado en la malla de salida de agua, corriente abajo.

de natación”. La cámara se conectó a un sistema de captura de video (Elgato game capture HD, Corsair Components, Munich, Alemania) incorporado a un ordenador para visualizar la grabación con el objeto de hacer los ajustes pertinentes y obtener la mejor calidad de imagen. Una vez almacenados en la memoria del ordenador, estos vídeos eran posteriormente procesados con el programa de cálculo de trayectorias según la metodología descrita en el Capítulo 4.

Resultados

Espacio de natación

Las longitudes del canal disponibles para la natación en cada etapa de desarrollo del pez se muestran en la Tabla 3.1. La modificación en las longitudes de estos espacios se realizaron cambiando la posición de la mallas dentro del canal.

Tabla 3.1 Condiciones del caudal de agua para cada etapa de desarrollo evaluada.

Edad del pez (dde)	Longitud media del pez (mm) ²	Longitud del canal (mm)	Velocidad del agua (cm/s)
0-2 ¹	5,01 ± 0,08	150	3,2
20-27	6,95 ± 0,12	200	8,4
40-47	9,69 ± 0,79	300	8,6

¹ Los peces comprendidos entre esa edad utilizados en los estudios del cálculo de las velocidades de fatiga habían logrado inflar la vejiga natatoria.

² Valores expresados como media (± SEM; n = 50-70).

Velocidad del agua con relación al caudal

La Figura 3.4 muestra la relación entre el flujo de agua en el canal, indicado en el caudalímetro, y su velocidad. Esta relación se ajustó a un modelo de ecuación polinómica. La figura revela cómo para caudales más altos, las velocidades correspondientes se mantuvieron casi constantes debido al aumento de la columna de agua causado por la retención de flujo de las mallas y de las limitaciones intrínsecas del canal abierto. Por lo que, la relación directa entre el caudal y la velocidad fue

disminuyendo hasta el punto en el que la velocidad no aumentó más allá de ciertos caudales agua, el aforo máximo del canal.

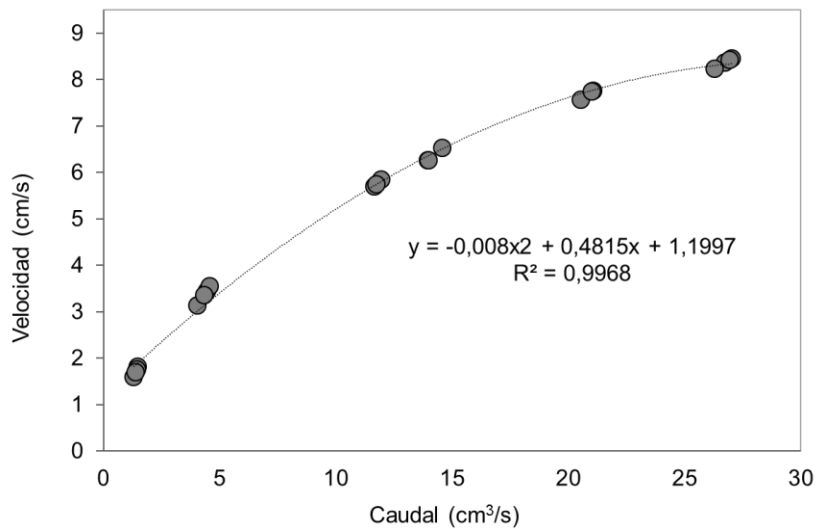


Figura 3.4. Relación polinómica entre el caudal y su velocidad en el canal de natación.

Velocidades de fatiga

Las velocidades de fatiga obtenidas para las tres etapas de desarrollo del medaka se muestran en la Figura 3.5. Se observó un aumento del número de peces extenuados conforme se incrementaba la velocidad del caudal en periodos sucesivos de 6 min. Las tres velocidades de fatiga establecidas fueron 3,2, 8,1 y 8,6 cm/s para los peces de 0-2 dde, 20-27 dde y 40-47 dde, respectivamente.

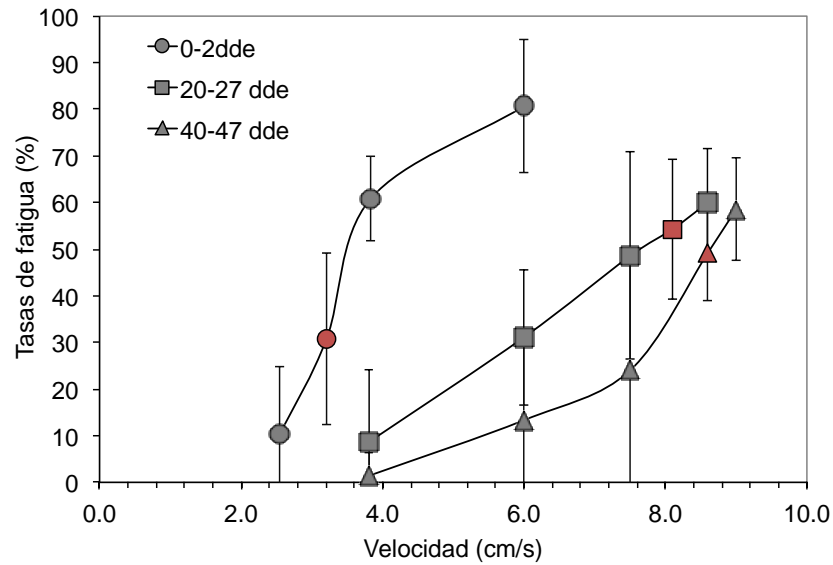


Figura 3.5. Resultados obtenidos del cálculo de las velocidades de fatiga para las etapas de desarrollo correspondientes a 0-2, 20-27 y 40-47 dde. Todos los puntos representan el porcentaje medio de fatiga de 5 grupos de 5 peces (\pm SEM). En rojo están indicados los valores más próximos al 60% de tasa de fatiga pero sin sobrepasarlo.

Laminaridad de los caudales

La Figura 3.6 muestra la dinámica del movimiento del agua a través de los fotogramas tipo de los videos grabados tras aplicar en el caudal permanganato potásico como agente de tinción.

El flujo de agua en el canal se movió siguiendo el desplazamiento descrito por la ley de Poiseuille, donde velocidad del flujo se veía reducida por el rozamiento de las paredes del canal, actuando de manera más turbulenta según aumentaba su velocidad. Aun así, para una velocidad establecida, el caudal mantenía un régimen constante a lo largo del tiempo no viéndose alterado, dando por tanto lugar a una constante experimental.

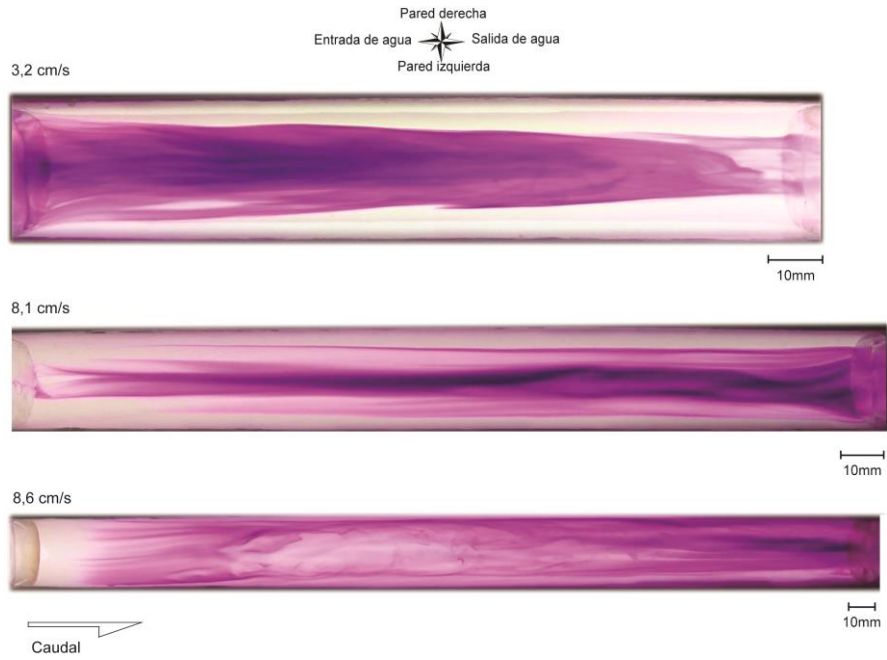


Figura 3.6. Fotogramas representativos de los vídeos del comportamiento del caudal de agua en el espacio de natación o arena para las diferentes velocidades de fatiga seleccionadas en cada etapa de crecimiento. La imagen, es la vista en planta obtenida por el sistema de grabación. “3,2”, “8,1” y “8,6” cm/s son las velocidades de fatiga correspondientes a las etapas de desarrollo de 0-2, 20-27 y 40-47 dde, respectivamente.



Figura 3.7. Fotogramas tipo correspondientes a los videos de grabación digital del comportamiento de los peces. “a”, “b” y “c” representan la vista en planta obtenida por el sistema de grabación del espacio de natación, (arena), para peces de de 0-7 dde, 20-27 dde y 40-47 dde respectivamente. La anchura del canal fue de 25 mm para todas las etapas de crecimiento. El círculo rojo muestra al pez situado en cada arena.

Sistema de grabación

La regulación en altura del sistema de grabación y la optimización de los parámetros de la cámara de video generaron tres configuraciones de grabación del espacio de natación de las tres etapas de desarrollo. En la Figura 3.7 se muestran los fotogramas tipo que muestran la vista en planta del espacio de natación donde nadan los peces según su etapa de desarrollo.

Discusión

El comportamiento natatorio de peces como biomarcador se viene aplicando a ensayos de diferentes disciplinas científicas tales como genética (Dlugos y Rabin, 2003), neurociencia (Bianco *et al.*, 2011), farmacología (Gebauer *et al.*, 2011), y ecotoxicología (Robinson, 2009). Este biomarcador, del cual dependen otros comportamientos más complejos (Bayley, 2002), no es fácil de cuantificar y evaluar, siendo este hecho más acusado al utilizar peces en etapas tempranas de desarrollo (*e.g.* eleuteroembriones y larvas.). Los ensayos con peces en estas etapas tienden a reducir el espacio experimental disponible con el objeto de aumentar el número de réplicas y dar mayor robustez estadística a los experimentos. Esta tendencia ha dado lugar a diferentes tipos de ensayos y sistemas comerciales automatizados cuya aplicación está muy extendida en estudios de ecotoxicología acuática a pesar de las limitaciones que ofrecen desde un punto de vista ambientalmente representativo. Por limitaciones se entienden el reducido espacio disponible para la natación y la artificialidad con que se pretende inducir el movimiento del pez (*e.g.* mediante ciclos de luz, vibraciones, cambios cromáticos), que hacen que los resultados sean difícilmente extrapolables a lo que pudiera ocurrir en un entorno natural (Liao *et al.*, 2015; Macaulay *et al.*, 2015; Kopp, 2016; Nüßer, 2016). Estos ensayos y sistemas toman como referencia del movimiento de natación los datos cinéticos de las trayectorias calculadas a partir del desplazamiento inducido artificialmente. La limitación de espacio mencionada se debe, aparte de permitir registrar

simultáneamente varios replicados, a que bajo estas condiciones los programas de cálculo no ofrecen problemas a la hora de procesar fielmente las trayectorias del pez. En estas condiciones, los píxeles que representan al individuo dentro del área de estudio son lo suficientemente definidos para que el programa de cálculo los pueda diferenciar del resto del entorno.

En nuestro sistema, el espacio de natación es mucho más amplio en proporción al tamaño del pez que el utilizado en otros ensayos de comportamiento, en los que se confinan a los peces en acuarios, placas multipocillo, canales o túneles. Esta baja relación tamaño del pez vs. espacio de natación de nuestro sistema hace que los píxeles que representan al pez en la grabación digital sean difícilmente seguidos por los programas de cálculo de trayectorias al confundirse parcialmente, fotograma a fotograma, con el ruido en la arena grabada (e.g. sombras, brillos, contrastes del agua, etc.). Por otro lado, la alta velocidad que pueden desarrollar los eleuteroembriones y larvas considerando su tamaño añade más dificultad al seguimiento (Ward *et al.*, 2002). La configuración de nuestro sistema dota al pez con un alto contraste respecto al entorno de natación permitiendo el seguimiento para el cálculo de trayectorias.

Al situar al pez en un flujo de agua controlado, la estimulación de la natación se realiza de forma más natural y continuada. Un movimiento de agua continuo estimula y obliga a activar el comportamiento innato de reotaxia positiva que es compartido por los peces (Arnold, 1974). Este comportamiento de reotaxia hace que el pez se sitúe contracorriente en el flujo de agua obligándole a desplegar todas las estrategias posibles para permanecer estable en el espacio de natación. Estas estrategias implican la coordinación y el funcionamiento correcto de los diferentes sentidos y órganos que permiten al pez interactuar con el entorno estabilizando su posición dentro del flujo de agua.

Nuestro sistema, en su diseño, tiene también en cuenta el caudal de agua, en concreto su velocidad. Esta variable, no contemplada en los ensayos con sistemas

Diseño

estáticos, es crucial en los ensayos que emplean túneles para el estudio de la fisiología y biomecánica de peces. Brett (1964) originalmente describe la U_{crit} como la velocidad del caudal dentro del túnel a la cual un pez se ve extenuado al incrementar la velocidad de este a intervalos concretos de tiempo. En contraposición, Farlinger y Beamish (1977) buscaron el tiempo que tardaba un pez en extenuarse a una velocidad fija del agua. El uso del tiempo de natación hasta la extenuación es uno de los protocolos básicos en los estudios de la capacidad de natación de los peces (Rand, 1984; Bagatto *et al.*, 2001; Barbieri. *et al.*, 2007; Palstra y Planas, 2013) y motivo por el cual ha sido un aspecto abordado en la puesta a punto de los métodos experimentales de nuestro trabajo. El compromiso entre estas dos variables, velocidad del agua y tiempo, es necesario para determinar la capacidad del pez de nadar hasta fatigarse pero sin alcanzar la extenuación y así establecer un tiempo mínimo de grabación del movimiento natatorio. Una velocidad alta del agua en el canal extenuaría rápidamente al pez impidiéndole nadar, mientras que una velocidad baja ampliaría mucho el tiempo de natación hasta que el pez quedara extenuado, incrementando así el tiempo necesario para llevar a cabo las grabaciones dentro de los ensayos para valorar el comportamiento natatorio.

La U_{crit} , como indica Brett, es un parámetro arbitrario pero constante, lo que permite realizar comparaciones y establecer de manera uniforme la velocidad a la que los peces quedan extenuados:

$$U_{crit} = U + \left[\Delta U \times \frac{\delta T}{\Delta T} \right]$$

donde U es la velocidad de flujo en el último intervalo, ΔU el incremento de velocidad, δT el tiempo en que el pez nada en el último intervalo, y ΔT es la duración de un intervalo. La U_{crit} por lo tanto se define como aquella velocidad en la que el 50% de los peces acaban extenuados.

En nuestro caso, el cálculo de la velocidad de fatiga no pudo ajustarse de acuerdo con la U_{crit} de Brett. Puesto que el canal de natación en nuestro diseño experimental

está abierto, la velocidad del agua queda limitada al aforo de este canal por donde al agua fluye a la misma presión que la atmosférica. Sin embargo, esta variable que podría considerarse como una limitación, no lo es desde el punto de vista que el pez está sometido a un ambiente dinámico bajo condiciones constantes de presión a lo largo de todo el canal abierto, algo que no ocurriría si el canal fuera cerrado. Por otro lado, el que el canal sea abierto no impidió que los sujetos de estudio nadaran de modo forzado durante los 6 minutos a la velocidad de fatiga calculada correspondiente a su edad.

La laminaridad y estabilidad del caudal se mantuvieron constantes para las velocidades de fatiga seleccionadas. Irremediablemente, la laminaridad del caudal fue disminuyendo conforme la velocidad del agua se incrementaba debido principalmente al rozamiento del flujo de agua con las paredes del canal y al atravesar las mallas que delimitan el espacio de natación. Este fenómeno se da en todos aquellos procesos hidrodinámicos de fluidos conducidos través de tuberías (Bell y Terhune, 1970). Este hecho, lejos de ser una dificultad para la natación del pez, le permite desarrollar las estrategias necesarias para situarse en las zonas que él puede considerar optimas dentro del canal e.g. zonas de turbulencia en la cuales puede establecer un equilibrio entre el gasto energético que conlleva el posicionamiento en el flujo de agua y la perfusión de oxígeno de la corriente a través de las branquias (Wolfgang *et al.*, 1999; Liao 2003, 2007; Elder y Coombs 2015). La estabilidad y regularidad del caudal en el espacio de natación para las distintas velocidades de fatiga seleccionadas permite que estos dos parámetros sean una constante durante el desarrollo experimental de evaluación del comportamiento, capacitando a nuestro sistema para la evaluación del comportamiento natatorio en etapas tempranas de peces de laboratorio en el proceso de validación descrito en el Capítulo 4

Objetivo 2

VALIDACIÓN DEL CANAL MEDIANTE UN ENSAYO NEUROTÓXICO CON CLORPIRIFOS



El trabajo mostrado en este capítulo dió lugar a la publicación
“Stage-dependent effects of chlorpyrifos on medaka (*Oryzias
latipes*) swimming behavior using a miniaturized swim flume
“Aquatic Toxicology. 2018. 200, 37-49. ANEXO II.

VALIDACIÓN DEL CANAL MEDIANTE UN ENSAYO NEUROTÓXICO CON CLORPIRIFOS

Introducción

Este capítulo tuvo como objetivo evaluar la validez y sensibilidad del canal en estudios del comportamiento en la natación de peces como biomarcador ecotoxicológico. Para ello, se seleccionó una sustancia química con propiedades neurotóxicas reconocidas como es el O,O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosfotionato, clorpirifos (CPF). Se seleccionaron tres etapas diferenciadas, o estrategias, dentro del crecimiento del medaka y, cada una de estas tres etapas se sometió a diferentes concentraciones de CPF para, a continuación, valorar los efectos de éste sobre el comportamiento natatorio.

El CPF (Figura 4.1) es un insecticida organofosforado de amplio espectro, de fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NOPS$, muy parecida a la de los gases nerviosos. Se puede afirmar que, junto con otros de tipo carbamato, es uno de los insecticidas neurotóxicos más utilizados a nivel mundial (Rohlman *et al.*, 2011). El espectro de amplitud del uso de este insecticida, así como su ubicuidad en el medio acuático (Williams, 2014), obligó en su momento a realizar estudios de evaluación del riesgo de esta sustancia (Khalil, 2013; Pérez, 2013; Giddings, 2014; Jin, 2015) confirmándose el peligro y las propiedades neurotóxicas de este compuesto en peces. El CPF inhibe el proceso de la acetilcolinesterasa creándose una sobre-estimulación de la sinapsis química al no hidrolizarse la colinesterasa, dando lugar a procesos neurotóxicos agudos que repercuten en la coordinación locomotora (Fukuto, 1990; Barron y Woodburn, 1995).

Siendo los efectos del CPF tan acusados y bien documentados, se consideró esta sustancia como candidata para ser utilizada como modificadora de la conducta natatoria, y, de esta manera, poder evaluar la validez y sensibilidad del sistema de natación.

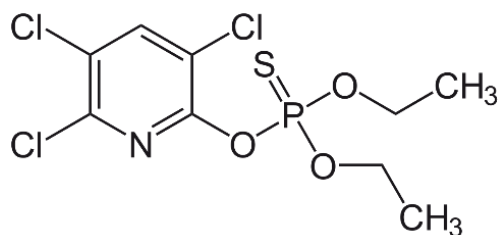


Figura 4.1. Estructura molecular del CPF (O,O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosfotonato). La estructura base con el átomo de fósforo unido por doble enlace a un átomo de azufre u oxígeno y todos sus enlaces de valencia saturados es característico de los insecticidas organofosforados y gases nerviosos.

Materiales y métodos

Reactivos y análisis químicos

Los tratamientos de CPF (CAS 2921-88-2. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) aplicados a los peces se prepararon a partir de una disolución de CPF en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich Chemical Co.) a una concentración de 1000 mg/L. El CPF se dividió en alícuotas de 100 µl y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Estas alícuotas se diluyeron en agua procedente de la colonia de reproductores para obtener una disolución de CPF de 10 mg/L, a partir de la cual, mediante diluciones sucesivas, se prepararon los tratamientos de 12,5, 25, 50 y 100 µg/L. Estas concentraciones se seleccionaron tomando como referencia trabajos previos con peces que mostraban efectos en el comportamiento natatorio, empleando principalmente metodologías de valoración en ambientes estáticos (Cooper y Bidwell, 2006; Kienle *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2015).

Con el objeto de corroborar las concentraciones nominales de CPF se realizó una exposición independiente con los cuatro tratamientos empleando peces de entre 20 y 40 días de edad para simular las mismas condiciones experimentales de exposición. Las concentraciones de CPF en el agua se analizaron a tiempos de muestreo sucesivos (0, 6, 12 y 24 h) a lo largo de un periodo de 24 h y se consideraron seis réplicas por tratamiento.

La valoración de CPF se realizó siguiendo la metodología analítica descrita por López-Mancisidor *et al.* (2008). En cada tiempo de muestreo se tomaron 10 ml de muestra del medio de cada réplica. La extracción del CPF de cada una de ellas se realizó mediante fase solida utilizando cartuchos (Strata-XTM 33 HBL, 6 ml de capacidad con, 200 mg/ml; Phenomenex 8BS100-FCH). Estos se acondicionaron previamente con 6 ml de metiliterbutileter/metanol (90/10 % v/v) y 10 ml de agua ultrapura (tipo *miliQ*). Los 10 ml de muestra se cargaron en cada cartucho para a continuación eluir el CPF usando 10 ml de metil tert-butileter/metanol (90/10% v/v). La porción eluida se evaporó en un evaporador con vacío y control de temperatura (Genevac EZ-2). El concentrado se redisolvió en 1 ml de metil tert-butyl éter/metanol (90/10% v/v). El contenido de CPF en el concentrado obtenido se analizó conjuntamente mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS; GS 6890 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) acoplado a un detector de espectrometría de masas 5973 con columna Agilent 19091J-413, HP-5 30 mm x 0,25 mm x 0,25 μ m. La recta de calibrado se realizó con muestras de agua fortificadas con CPF de entre 6,25 y 100 μ g/L.

Exposiciones

Los individuos necesarios para la validación del sistema se obtuvieron de la colonia reproductora de medakas del Laboratorio de Ecotoxicología del INIA. Se seleccionaron peces en tres etapas tempranas de su desarrollo, *i.e.* 0 dde, 20 dde y 40 dde.

Para la exposición del grupo de peces de 0 dde se recolectaron aproximadamente unos 100 embriones recién fertilizados (\leq 4 horas de vida) obtenidos en un solo día de la colonia reproductora. Los huevos se individualizaron mediante la rotura manual de los filamentos coriónicos que los mantienen en forma de racimos, se lavaron con agua desclorada, y se incubaron a unos 25 °C realizando renovaciones diarias del medio hasta su eclosión. Los eleuteroembriones resultantes de un mismo día se separaron aleatoriamente en grupos de 5 individuos dentro de cuatro recipientes de cristal de 250

Validación

ml de capacidad. A cada grupo se añadió 50 ml de las cuatro disoluciones tratamiento de 12,5, 25, 50 y 100 µg/L de CPF. La exposición duró 48 horas, renovándose el medio cada 24 horas, incluyéndose el día en el que los individuos fueron sometidos a natación forzada en el sistema de evaluación.

Para las exposiciones de los individuos de 20 dde y 40 dde, se recolectaron unos 500 embriones a lo largo de dos días. Los embriones se incubaron según se detalla en las exposiciones con peces de 0 dde. Los eleuteroembriones resultantes de entre 0 y 2 dde se transfirieron a acuarios de 8 L de capacidad dentro de un sistema de flujo continuo, con las mismas condiciones de agua y ambientales que la colonia de reproductora, y donde el agua se renovaba a razón de 18 ml/min. Los peces se alimentaron *ad libitum* dos veces al día los primeros siete días con la cianobacteria espirulina (género *Arthrospira*) (8-10 x 20 µm; Argent Laboratories). Posteriormente la dieta constó de una mezcla de espirulina y alimento comercial en copos (Sera Vipán), en una proporción 2:3, que se dosificó en cada acuario en una cantidad correspondiente al 15% del peso medio del pez (en la Tabla 5.1 del Capítulo 5 se detalla la composición nutricional de esta mezcla). Esta dosis se ajustó cada 10 días para adaptar la dieta al crecimiento de los peces. Una vez alcanzada la edad correspondiente, de 20 y de 40 dde, se realizaron las exposiciones a CPF según la metodología descrita en las exposiciones con eleuteroembriones de 0 dde.

Estas tres estrategias de exposición se repitieron entre seis y siete veces a lo largo de los meses de mayo de 2016 hasta noviembre de 2017 (Figura 4.2), y en cada una de ellas se incluyó un grupo control disolvente consistente en individuos expuestos a la concentración de DMSO de 0,01% v/v, equivalente a la concentración en el tratamiento de 100 µg/L de CPF. Estudios previos han mostrado que el DMSO, a esta concentración, no mostraba efectos ni alteraciones en el comportamiento (Chen, *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2018). La valoración de la natación se llevó a cabo con 150-175 peces en cada una de las etapas de desarrollo, que se expusieron a las cuatro concentraciones de CPF y

el control disolvente (Figura 4.2), sumando para este estudio un total de entre 450 y 525 peces sometidos a natación forzada para las tres estrategias.

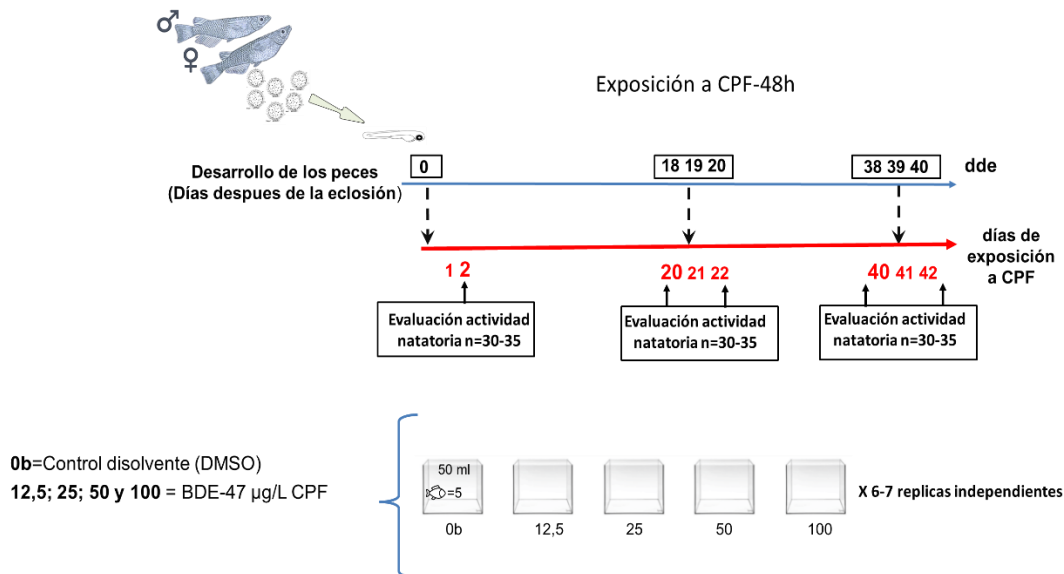


Figura 4.2. Esquema que muestra las tres etapas del crecimiento del pez que fueron seleccionadas para su exposición a CPF. Cada etapa se sometió a cuatro concentraciones de CPF y un control disolvente (DMSO, 0.01%). Cada concentración de exposición dentro de cada grupo de tratamiento constaba de cinco peces. Los tratamientos se repitieron entre 6 y 7 veces (n = 30-35 peces por concentración).

Obtención de los datos cinemáticos

La actividad natatoria, dentro de las tres etapas de desarrollo seleccionadas, se evaluó para las cuatro concentraciones de exposición y el grupo control disolvente (0b). Los ensayos de natación se realizaron a lo largo de la mañana y durante el mismo intervalo de tiempo con el objeto de minimizar posibles variaciones en la respuesta natatoria debidas a la actividad diurna diferencial. El espacio de natación se ajustó conforme a cada una de las tres etapas de desarrollo del pez de acuerdo con lo descrito en la Tabla 3.1. del Capítulo 3. Una vez tratados, los peces seleccionados aleatoriamente se situaron, de uno en uno en la zona central del espacio natación del canal con una velocidad inicial de agua $\leq 1\text{cm/s}$. Una vez estabilizada la posición del pez, la velocidad se ajustó a la prescrita para cada etapa de desarrollo del pez según la Tabla 3.1. En ese momento, se empezó a registrar el movimiento del pez durante 6 min. La natación se

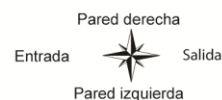
Validación

monitorizó para un total de entre 30 y 35 peces para cada tratamiento. La exposición a las cuatro concentraciones de CPF junto con el control disolvente supuso un tiempo de grabación total de aproximadamente unos 1000 min [(30–35 peces/tratamiento × tiempo de grabación de 6 min) × 5 tratamientos = aprox. 16 h]. En consecuencia, las tres estrategias de exposición sumaron aproximadamente 3000 min de tiempo de grabación total.

Los videos registrados se procesaron con el programa informático de cálculo de trayectorias Ethovision XT 9.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda). Los tres espacios de natación (vista en planta de las imágenes de video), correspondientes a las tres etapas de desarrollo del pez (0, 20 y 40 dde), equivalían a superficies bidimensionales de 3750, 5500 y 7500 mm², respectivamente. Estos espacios se dividieron en cuadrículas iguales de 5 x 2,5 mm, originando tres matrices respectivas de 300, 440 y 600 elementos (Figura 4.3).

0 dde

1A	2A	3A	4A	5A
1B	2B	3B	4B	5B
1C	2C	3C	4C	5C



20 dde

1A	2A	3A	4A	5A
1B	2B	3B	4B	5B
1C	2C	3C	4C	5C

40 dde

1A	2A	3A	4A	5A
1B	2B	3B	4B	5B
1C	2C	3C	4C	5C

Caudal

25mm

Figura 4.3. Representación de las superficies bidimensionales o arenas que delimitan el espacio de natación para las etapas de desarrollo de “0 dde”, “20 dde” y “40 dde”. Las líneas finas y rojas muestran superficies o elementos, de 5 x 2,5 mm generan como resultado matrices de 300, 400 y 600 elementos para cada etapa de desarrollo respectivamente. Las líneas gruesas oscuras delimitan las áreas de interés estratégico en la interacción del posicionamiento del pez y el canal.

Procesamiento de los datos cinemáticos

Se buscaron diferencias en los patrones de comportamiento natatorio entre los peces no tratados y los tratados con CPF. Para ello, una vez configuradas las arenas y los diferentes parámetros dentro del programa de cálculo de trayectorias, se obtuvo la salida de cinco datos cinemáticos: la distancia relativa⁵ media, el tiempo total de presencia del pez en cada elemento de la matriz, el tiempo total en la arena y las velocidades máxima y media. De estos, la distancia relativa media y el tiempo de presencia en cada elemento fueron los datos que se trataron con la hoja de cálculo Microsoft Excel. Los tres datos cinemáticos restantes (*i.e.*, tiempo total en la arena y velocidades máxima y media) se emplearon como datos control de tal manera que valores anómalos en la salida de estos indicaban un cálculo erróneo de la trayectoria (*i.e.*, pérdida de seguimiento por parte del programa) que indicaba la necesidad de realizar un posterior reajuste de los parámetros de seguimiento del programa.

El tratamiento con la hoja de cálculo de los datos de cada pez, correspondientes a los tiempos totales de presencia en cada elemento de la matriz, dio como resultado un porcentaje medio de tiempo del total en cada elemento de los peces de cada grupo o tratamiento (n=30-35) correspondiente a cada una de las tres etapas de desarrollo. Cada uno de los elementos comprendidos dentro de cada una de las tres arenas se referenciaron con tres coordenadas, siendo “x” e “y” la posición de cada elemento en la división digital de la arena, y “z” el valor del porcentaje medio de tiempo correspondiente. Con este formato de coordenadas, los datos del porcentaje de tiempo medio en cada elemento para cada grupo de peces se exportaron al programa probabilístico de “mapeo” de datos Surfer 12 (Golden software, Colorado, EE.UU.). La correlación (grado de continuidad) espacial entre los diferentes valores de presencia en cada elemento de la matriz se llevó a cabo con este programa mediante el desarrollo de un

⁵ En condiciones naturales, los peces mantienen su posición cuando sus velocidades absolutas y el agua en movimiento son iguales en magnitud, pero opuestas en sentido. Por lo tanto, las distancias de natación registradas por el programa de seguimiento se calcularon y se asumieron como *distancias relativas*.

Validación

semivariograma experimental previo a una interpolación espacial de los valores correspondientes en los diferentes elementos basada en el método de Kriging (Chilés y Delfiner, 1999). Este método permitió la modelación de los valores de los diferentes elementos en forma de mapas de gradiente, donde visualmente se puso de manifiesto la tendencia o probabilidad de encontrar al pez a lo largo de las diferentes zonas de la arena durante los seis minutos de natación.

Análisis estadístico de los datos cinemáticos

Para saber de un modo cuantitativo si los peces se veían afectados tras las exposiciones al CPF, la arena correspondiente a cada etapa de desarrollo se dividió en quince áreas denominadas áreas de residencia (Figura 4.3). Cada una de estas áreas comprendía un número concreto de elementos de la matriz. Este criterio de división se basó en dos aspectos: 1) la fuerza de rozamiento existente entre dos capas que se mueven a diferentes velocidades, es decir, el agua en movimiento y las paredes del canal de acuerdo a ley de Hagen Poseuille, y 2) el rozamiento entre el agua y las mallas que delimitan el espacio de natación, y que perturban su velocidad. Para cada una de las quince áreas, se calculó un tiempo de residencia sumando los valores de tiempo de presencia para cada grupo de elementos dentro de cada área, y promediándolos a un valor porcentual para cada grupo de peces tratados. La distribución de los datos de residencia promediados en cada una de las 15 áreas se representó mediante la ordenación estadística de cajas y bigotes dentro del área correspondiente, dando lugar a los mapas de residencia.

Los valores de tiempo de residencia dentro de las áreas y las distancias medias relativas se analizaron para determinar el grado de normalidad y la homogeneidad de sus varianzas. Viendo que los datos tenían una distribución no normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y se realizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni para identificar cualquier diferencia significativa entre los tratamientos con

CPF y el control disolvente. Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significación o rechazo de la hipótesis nula igual o menor a 0,05 (*i.e.*, valor de $P \leq 0.05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa para ciencias sociales de IBM SPSS 22 (SPSS Inc., Illinois, EE.UU.). Los datos de las áreas de residencia, al ser valores discretos originados a partir de numerosos datos procedentes de elementos agrupados, no pudieron mostrar ninguna correlación espacial entre los datos de presencia individuales para cada elemento vecino dentro de cada matriz. Por lo tanto, y como se podrá apreciar en los resultados, ambas aproximaciones, la presencia en el espacio de natación en forma de mapas de gradiente y los valores de tiempo de residencia dentro de las 15 áreas de interés estratégico, son informaciones complementarias.

Resultados.

Estabilidad de CPF en agua

Las concentraciones medias ponderadas en el tiempo (CMPT) junto con las respectivas vidas medias del CPF se pueden ver en la Figura 4.4. Independientemente de la concentración, la cantidad de CPF en cada tratamiento se redujo en un valor mayor del 45% respecto a la concentración inicial tras 24 horas de incubación, siendo imposible mantener la concentración nominal del CPF a lo largo del tiempo a pesar de las renovaciones diarias de las exposiciones

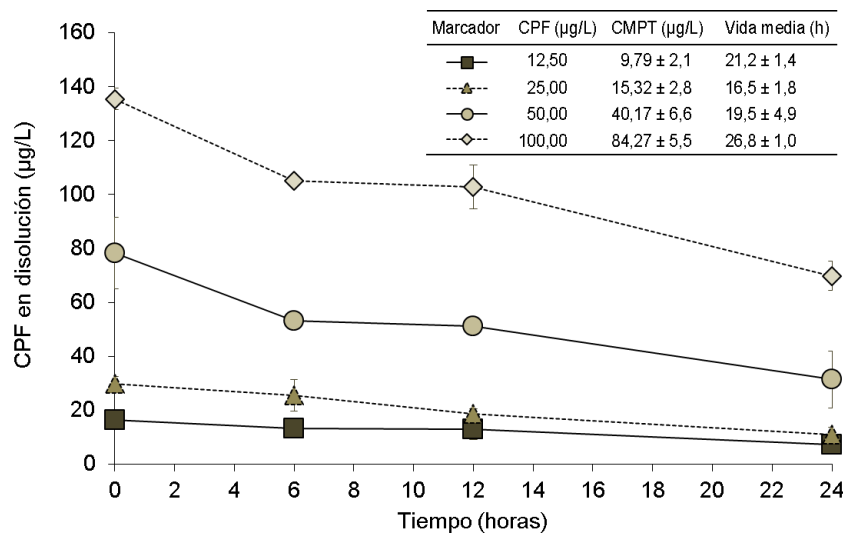


Figura 4.4. Concentraciones de CPF medidas en los intervalos de tiempo seleccionados en volúmenes agua de 50 ml con CPF y 5 peces de 20 y 40 dde La tabla insertada muestra las concentraciones medias ponderadas en el tiempo (CMPT) presentes en disolución durante 24 h y la vida media de CPF con relación a las concentraciones nominales. Los valores representan la media (\pm SD) de seis replicas medidas.

A las 0 horas, los análisis de las concentraciones de todos los tratamientos mostraron cantidades de CPF superiores a las respectivas concentraciones nominales, con valores que oscilaron entre el 19 % y el 56% para las nominales 25 µg/L y 50 µg/L, respectivamente. Estas diferencias pudieron deberse a variaciones en los procedimientos de preparación de las concentraciones de los tratamientos. La Figura 4.4 revela una evidencia de la disipación del CPF en los medios de incubación.

Por motivos prácticos, en el texto las concentraciones de los cuatro tratamientos vienen siempre referidas a sus concentraciones nominales (12,5, 25, 50 y 100 µg/L de CPF).

Distancias relativas recorridas.

Las distancias medias recorridas por los peces en las etapas de desarrollo de 0, 20 y 40 dde expuestos a los diferentes tratamientos con CPF se pueden ver en la Figura 4.5. La distancia media relativa recorrida de los eleuteroembriones (*i.e.* 0 dde) en el control disolvente fue de 3310 ± 130 mm (valor expresado como media \pm SEM). En las etapas 20 y 40 dde las distancias se incrementaron hasta valores de 4014 ± 182 y 6321 ± 306

mm, respectivamente. Todas las distancias medias recorridas en las diferentes etapas de desarrollo expuestas a los diferentes tratamientos con CPF mostraron diferencias significativas respecto al control disolvente excepto en 12,5 $\mu\text{g/L}$ para la etapa de 20 dde donde la distancia fue de 3822 ± 333 mm, cercana a la del control disolvente y con una dispersión de datos mayor que este.

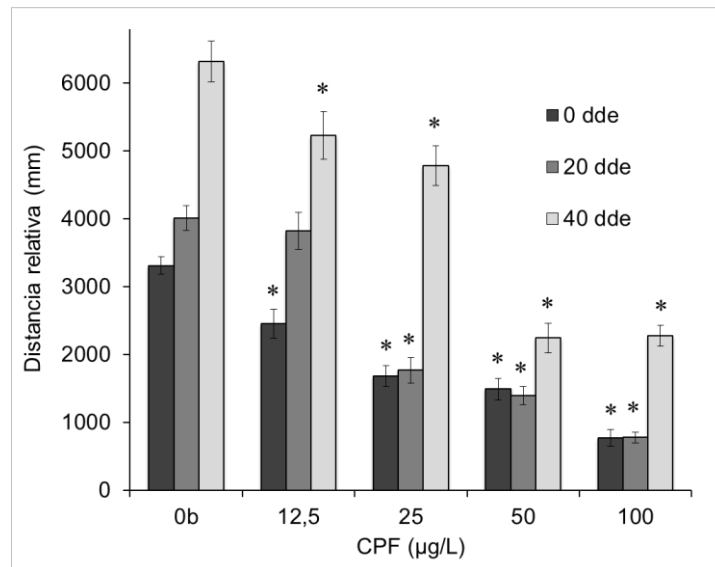


Figura 4.5. Distancias relativas recorridas por los peces tratados en etapas tempranas del desarrollo correspondientes a “0 dde”, “20 dde” y “40 dde”. La concentración “0b” representa el tratamiento control disolvente con una concentración inferior al 0,01 de DMSO (% v/v). Un “*” indica diferencias significativas respecto al grupo control disolvente para la misma etapa de desarrollo. Los valores representan la media (\pm SEM) de $n=30-35$ peces por tratamiento.

Mapas de gradiente

Partiendo de los datos cinemáticos obtenidos de la grabación del movimiento, se mostró el patrón de situación de los peces mediante los correspondientes mapas de gradiente, los cuales representaban la tendencia en porcentaje medio de tiempo empleado por los peces para situarse en el canal durante los 6 min de natación forzada según la etapa de desarrollo y tratamiento previo con CPF. El incremento de los gradientes de porcentaje mostrado en estos mapas fue del 0,1% y el rango osciló entre 0.0%-8.0% del tiempo total de grabación. La integración de todos los elementos que conforman cada mapa de gradiente para cada tratamiento completa el 100% del tiempo de presencia en el canal,

Validación

es decir 6 min. La integración de todos los elementos que conforman cada mapa de gradiente para cada tratamiento completa el 100% del tiempo de presencia en el canal, es decir 6 min. Se obtuvieron cinco mapas de gradiente por cada etapa de desarrollo, cuatro mapas para cada concentración de CPF y uno para el control con DMSO (0b).

Los eluteroembriones de 0 dde del grupo control disolvente presentaron los valores más altos de porcentaje de tiempo de presencia empleado en la entrada de agua del canal oscilando entre 0,8-3,0 %. La zona media del canal presentó valores más bajos, entre 0,3%-0,7%, pero muy cercanos a los valores de la salida de agua, donde el gradiente nunca superó el valor de 1,5%. La distribución de los gradientes fue más homogénea en este grupo que en los tratamientos con CPF.

A partir del tratamiento de 12,5 µg/L de CPF los gradientes con mayor valor se encontraron en la salida de agua del canal. Estos valores se incrementaban en detrimento de las zonas de entrada de agua y zona media. Esta tendencia aumentó conforme la concentración del tratamiento con CPF se incrementaba llegando a concentrarse exclusivamente a la salida del canal en el tratamiento de mayor concentración, *i.e.* 100 µg/L de CPF (Figura 4.6).

En los mapas de gradiente correspondientes a 20 dde, el tratamiento control disolvente mostró zonas de gradiente con valores del 0,3 al 1% que abarcaron amplios espacios del canal, situándose las de mayor valor en la entrada y salida de agua (Figura 4.7). No obstante, el valor máximo de gradiente se observó en la entrada. Para el tratamiento de 12,5 µg/L de CPF la continuidad de los gradientes fue comparativamente menor, diferenciándose claramente dos zonas de presencia a la entrada y salida del agua. A partir de la concentración de 25 µg/L, la presencia de los peces en la entrada de agua es mínima encontrándose el valor máximo en esta zona por debajo del 0,1%, mostrando así una tendencia a situarse en zonas más cercanas a la salida de agua según aumentaba la concentración de CPF (Figura 4.7).

Los peces de 40 dde en el tratamiento control mostraron una tendencia a situarse a lo largo de todo el canal como indican las zonas de gradiente que parecen revelar una preferencia a utilizar paredes de la zona media y de los extremos del canal (Figura. 4.8). Esta posible estrategia de natación sugiere una mejor gestión de los peces para aprovechar las zonas óptimas de natación contracorriente mediante el comportamiento innato de reotaxia. El valor de estos gradientes en estas zonas oscilaba entre 0,2%-2%, siendo la zona de entrada de agua más amplia que la de salida. Los valores próximos a los laterales de la zona media estuvieron entorno al 0,2-0,4%. A partir del tratamiento de 12,5 µg/L de CPF los gradientes con valores más altos se apreciaban en zonas próximas a la entrada y salida de agua, concentrándose los valores más altos en la entrada de agua del canal (3,5%- 4%). En los tratamientos de 12,5 y 25 µg/L de CPF, las zonas de mayor gradiente se observaron próximas a la entrada de agua del canal con valores máximos concentrados en pequeñas zonas (3,5-5%). A partir de 50 µg/L los gradientes con los valores máximos se apreciaban a la salida de agua alcanzándose los valores máximos en el tratamiento de 100 µg/L de CPF.

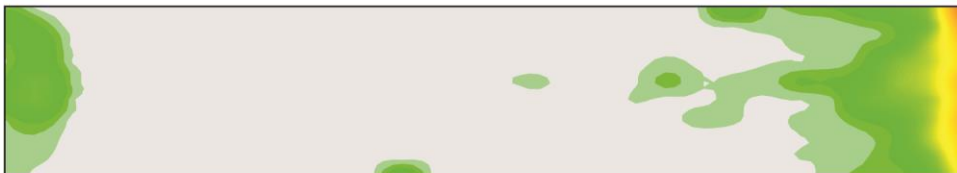
0b



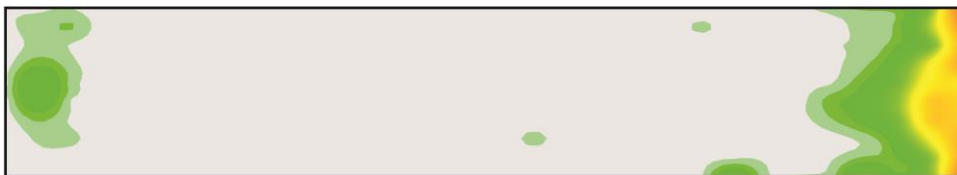
12.5



25



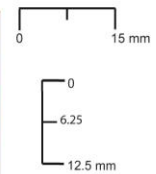
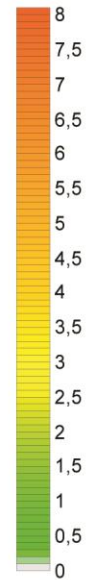
50



100



Tiempo de presencia (%)



Caudal

Figura 4.6. Mapas de gradiente de los peces de 2 dde. El mapa "0b" corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas "12,5", "25", "50" y "100" representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF ($\mu\text{g/L}$). Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de entre 30-35 peces por tratamiento a CPF durante 48 h, correspondiendo los valores más altos a los colores cálidos.

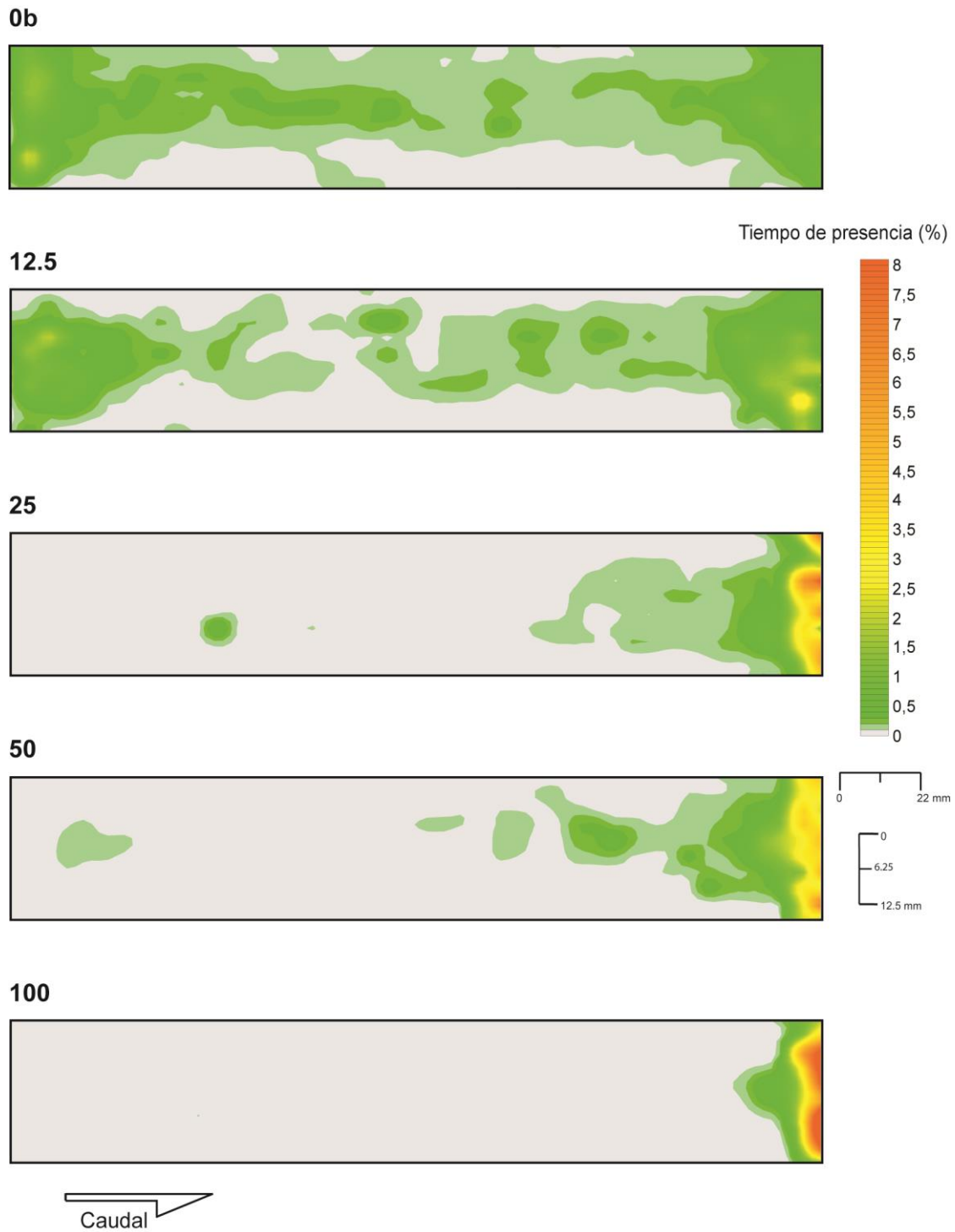


Figura 4.7. Mapas de gradiente de los peces de 20-22 dde. El mapa "0b" corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas "12,5", "25", "50" y "100" representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF ($\mu\text{g/L}$). Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de entre 30-35 peces por tratamiento a CPF durante 48 h, correspondiendo los valores más altos a los colores cálidos.

0b



12.5



25



50



100



Tiempo de presencia (%)

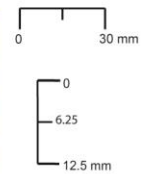
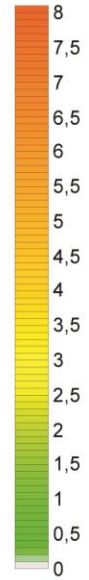


Figura 4.8. Mapas de gradiente de los peces de 40-42 dde. El mapa "0b" corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas "12,5", "25", "50" y "100" representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF ($\mu\text{g/L}$). Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de entre 30-35 peces por tratamiento a CPF durante 48 h, correspondiendo los valores más altos a los colores cálidos.

Áreas de residencia

La comparación estadística entre los datos de las áreas de residencia del tratamiento control disolvente y las correspondientes áreas de los peces tratados con CPF dio lugar a mapas de áreas de residencia donde las diferencias significativas se resaltaban marcándolas de color rojo en los mapas de los grupos tratados.

Los mapas de áreas de residencia para la etapa de desarrollo de 0 dde de los cuatro grupos tratados con CPF mostraron diferencias significativas en los tiempos de residencia en al menos 12 áreas de las 15 totales ($P < 0.05$) distribuyéndose de acuerdo con la Figura. 4.9.

En los peces de 20 dde la comparación estadística entre las áreas del tratamiento control disolvente y los tratados con 12,5 µg/L de CPF dio lugar a 5 áreas (valores de $P < 0,001$; Figura. 4.10). Al incrementarse la concentración de CPF, las diferencias significativas se apreciaban en al menos 13 áreas,

Con relación a los peces de 40 dde, el tratamiento de 12,5 µg/L de CPF mostró tiempos de residencia estadísticamente significativos en tres áreas (Figura. 4.11). Los peces tratados con 25 µg/L de CPF presentaron un total 9 áreas con diferencias en los tiempos de residencia. No fue hasta el tratamiento de 50 µg/L de CPF donde se apreciaron un mínimo de 13 áreas con tiempos de residencia estadísticamente diferentes.

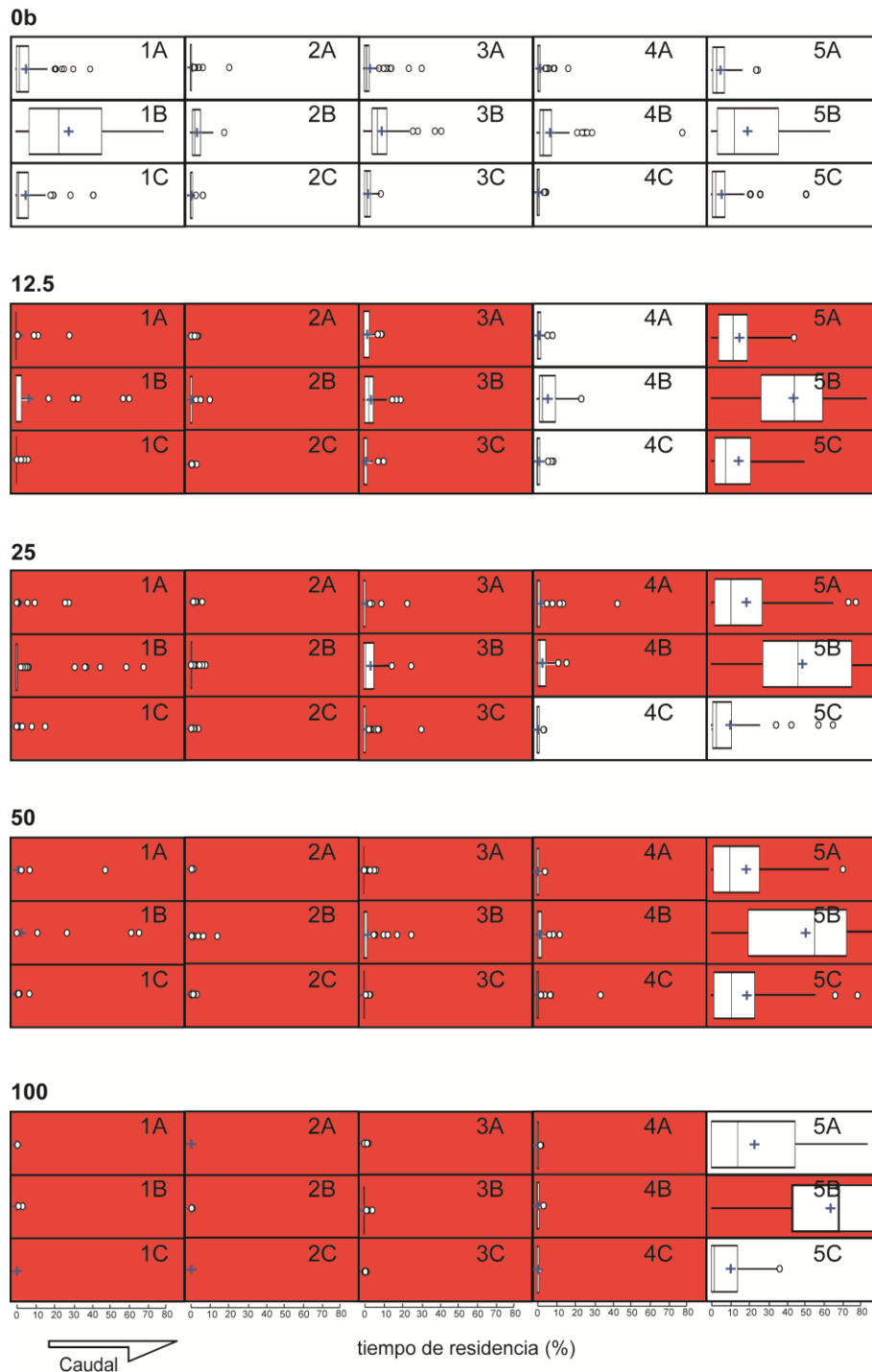


Figura 4.9. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 2 dde. Por motivos prácticos las 15 áreas se han representado con el mismo tamaño (las proporciones reales se pueden ver en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). El mapa "0b" corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas "12,5", "25", "50" y "100" representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF ($\mu\text{g/L}$) a las que fueron sometidos los peces. Las cajas y bigotes insertados horizontalmente en cada área muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de ese área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los "bigotes" representa 1,5 veces el rango intercuartil [$1,5 \times (Q3 - Q1)$] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos se representaron como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos del grupo control "0b", marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaban diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30-35 peces por tratamiento.



Figura 4.10. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 20-22 dde. Por motivos prácticos las 15 áreas se han representado con el mismo tamaño (las proporciones reales se pueden ver en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). El mapa “0b” corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas “12,5”, “25”, “50” y “100” representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF (µg/L) a las que fueron sometidos los peces. Las cajas y bigotes insertados horizontalmente en cada área muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de esa área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los “bigotes” representa 1,5 veces el rango intercuartil [$1,5 \times (Q3 - Q1)$] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos se representaron como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos del grupo control “0b”, marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaban diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30-35 peces por tratamiento.

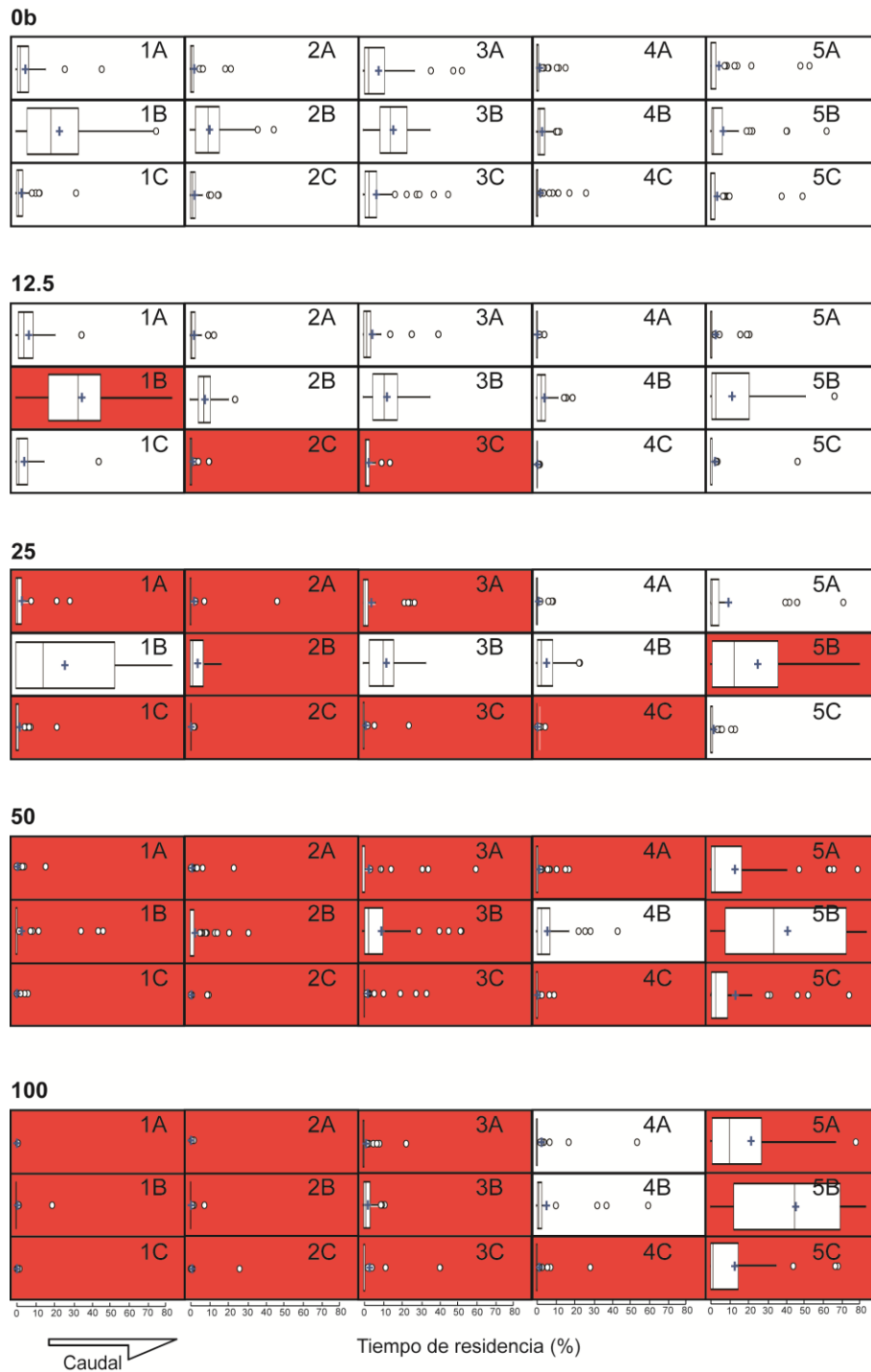


Figura 4.11. Representación de los mapas de áreas de residencia de los peces de 40-42 dde. Por motivos prácticos las 15 áreas se han representado con el mismo tamaño (las proporciones reales se pueden ver en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). El mapa “0b” corresponde al tratamiento control disolvente (0,01 DMSO %v/v). Los mapas “12,5”, “25”, “50” y “100” representan las concentraciones nominales del tratamiento con CPF (µg/L) a las que fueron sometidos los peces. Las cajas y bigotes insertados horizontalmente en cada área muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de ese área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los “bigotes” representa 1,5 veces el rango intercuartil [1,5 x (Q3 - Q1)] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos se representaron como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos del grupo control “0b”, marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaban diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30-35 peces por tratamiento.

Discusión

La representación de los datos cinemáticos a través de la información gráfica de los mapas de gradientes junto con los mapas de las áreas de residencia, permiten aunar variables independientes como son el tiempo, etapa de desarrollo y tratamiento, dando lugar a una información visual que en el caso del CPF reveló cambios en las estrategias del comportamiento natatorio del medaka. Con estos mapas, estos cambios se pueden elucidar tanto desde una perspectiva cualitativa (visual) como cuantitativa (estadísticamente demostrable).

En este primer estudio, se ha podido observar cómo bajas concentraciones de CPF respecto a la literatura existente, fueron suficientes para provocar cambios en la actividad de la natación dando lugar a patrones diferenciales, independientemente del período de desarrollo en el que los peces fueron expuestos. En términos generales, estas concentraciones fueron equiparables, o estuvieron muy por debajo, de aquellas publicadas en la literatura científica que demuestran modificaciones en el comportamiento con modelos experimentales de peces en etapas tempranas de su desarrollo. En la mayoría de estos trabajos la actividad de la natación se ha evaluado recurriendo a entornos estáticos, donde el medio se limitaba a un área muy restringida y donde la actividad natatoria se inducía mediante diferentes formas de estímulos artificiales (Levin *et al.*, 2004; Khalil *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2017). Un ejemplo de esta aproximación experimental se puede encontrar en los estudios de Jin *et al.* (2015) empleando microplacas y ciclos de luz-oscuridad para evaluar los efectos en la natación en etapas tempranas de desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) expuestas durante 96 horas a CPF (valores nominales de 100-300 µg/L de CPF). De modo similar, Levin *et al.* (2004) diseñaron un recipiente cilíndrico de 16 mm de diámetro dividido en 16 áreas con el objeto de dotar de mayor sensibilidad el método experimental. Recurriendo a este método comprobaron que la actividad de la natación de peces cebra de 5 dde disminuía tras exposiciones a 100 µg/L de CPF durante 120 h. En línea con

Validación

estos trabajos, Selderslaghs *et al.* (2010) desarrollaron un método basado en la evaluación de diferentes parámetros cinemáticos en placas de 6 pocillos, donde evidenciaron efectos en cebras de 4 y 5 dde previamente expuestos a concentraciones de 39-100 $\mu\text{g/L}$ de CPF durante 96 h. Utilizando de nuevo placas de 6 pocillos como plataforma para estudios de comportamiento, Richendrfer *et al.* (2012) encontraron efectos sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad de peces cebra de 7 dde tras exposiciones a $\geq 25 \mu\text{g/L}$ de CPF durante 168 h.

La literatura científica revela también la existencia de trabajos donde, recurriendo a túneles con flujos de agua, se evaluó la natación en etapas avanzadas del desarrollo de peces con tamaños superiores al del medaka o el cebra (Little y Finger, 1990; Gravato y Guilhermino, 2009; Vieira *et al.*, 2009). Al igual que en nuestros trabajos, estos estudios indujeron la natación activando la respuesta innata de la reotaxía. Esta respuesta, que ofrece un alto nivel conductual básico, en estos estudios no fue explotada más allá que para valorar aquellos aspectos relacionados con distancias y velocidades. Las limitaciones de algunos de estos estudios probablemente se hayan debido a la escasa disponibilidad que en esos momentos había de herramientas fiables de captura de análisis e informáticas junto con la dificultad para integrarlas con un fin concreto.

Los efectos del CPF sobre la natación en peces también se han estudiado empleando etapas adultas tanto del medaka como del cebra, aunque los parámetros de evaluación, nuevamente dependían de estímulos artificiales externos inducidos en ambientes estáticos. Rice *et al.* (1997) observaron síntomas adversos en el comportamiento de medakas de 30 dde expuestos durante 48h, sin renovación, a concentraciones de CPF $\geq 100 \mu\text{g/L}$. Khalil *et al.* (2013) apreciaron alteraciones en la natación y el comportamiento social de medakas de 90 dde sometidos a 12 $\mu\text{g/L}$ de CPF durante 192 h en un acuario circular. Un último ejemplo interesante es el trabajo realizado por Qiu *et al.* (2107) con medakas sexualmente maduros expuestos a 24 $\mu\text{g/L}$

de CPF durante 96 horas donde observaron efectos a corto plazo en la natación. A pesar de emplear un ambiente estático, estos investigadores recurren, entre otros parámetros, a la preferencia (tigmotaxia) del pez por zonas concretas del espacio disponible como indicador de respuesta, una aproximación que entendemos es comparable a la preferencia que se ha podido observar en nuestros trabajos con el CPF en un ambiente dinámico.

A través de los mapas de gradiente mostramos de forma cualitativa la tendencia que tienen los peces expuestos a CPF a “posicionarse” en zonas determinadas del área de natación del canal (espacio y tiempo) de un modo condicionado por el tratamiento. La comparación estadística entre los datos que componen las áreas de residencia del grupo control disolvente frente a mismas áreas de los peces expuestos a CPF permite apreciar diferencias cuantitativas del posicionamiento del pez respecto al grupo control.

Superadas las dificultades técnicas, hemos podido comprobar cómo el sistema de natación propuesto es capaz de poner de manifiesto las diferentes alternativas y estrategias que peces como el medaka, en etapas tempranas de desarrollo, adoptan frente a un caudal de agua. Estas estrategias se han podido expresar en forma de patrones de movimiento específicos. Recurriendo a una sustancia con propiedades neurotóxicas reconocidas, se ha podido demostrar la validez del sistema para valorar la natación en etapas tempranas del desarrollo del medaka como biomarcador del comportamiento básico en peces.

Objetivo 3

EFFECTOS DE BDE-47 EN LA NATACIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO DELMEDAKA



El trabajo mostrado en este capítulo dio lugar a la publicación
“Effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)
exposure on medaka (*Oryzias latipes*) swimming behavior”
Environmental Pollution. 2018. 233, 540-541. ANEXO III

EFFECTOS DE BDE-47 EN LA NATACIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO DEL MEDAKA

Introducción

Alcanzados los dos primeros objetivos de este trabajo de investigación se planteó implementar el sistema dinámico en la valoración de los efectos de un CE de preocupación ambiental sobre el comportamiento de la natación en etapas de crecimiento del medaka.

En el laboratorio donde se han realizado los trabajos de esta Tesis Doctoral se venían desarrollando diferentes proyectos de investigación enmarcados en la valoración ecotoxicológica de la reutilización de efluentes, lodos y aguas regeneradas procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) (Proyectos del Plan Nacional, RTA2010-00004-C02-01, CTM2010 19779-C02, CTM2014-52388-R y CTM2013-44986-R). Estos proyectos, apoyados por la literatura científica confirman la presencia de numerosos CE, la mayoría de origen urbano e industrial, englobándose como los más representativos los productos farmacéuticos, de higiene personal (fragancias, filtros solares, etc) además de conservantes y retardadores de llama (Kolpin *et al.*, 2002; Öberg *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011). Por el momento, no existen evidencias de que los sistemas tradicionales de tratamiento en las EDAR logren evitar la presencia de este tipo de contaminantes en los efluentes. Aunque a bajas concentraciones, la mayor parte de los CE se vierten continuamente, de modo que su introducción en los ecosistemas acuáticos, como principales receptores, es prácticamente permanente por lo que no es necesario que sean muy persistentes para que sus niveles ambientales se mantengan a lo largo del tiempo con el consiguiente riesgo para los organismos que habitan en ellos.

Muchos de estos compuestos tienen el potencial de ejercer efectos tóxicos. De entre todos ellos, los retardadores de llama bromados (BFRs, Bromo Flame retardants) destacan por sus altos niveles de producción y su toxicidad (Darnerud *et al.*, 2001; de

Wit, 2002; Shaw y Kannan, 2009; NASEM 2017). Estas sustancias se caracterizan por inhibir la combustión a través de los átomos de bromo que hay en su estructura. Históricamente hay cuatro grupos de BFRs que son los más utilizados y sobre los cuales existe amplia información. Estos son, el tetrabromobisfenol A (TBBPA Tetrabromobisphenol), el hexabromociclododecano, (HBCD), los polibromo bifenilos (PBBs), y los polibromo difenil éteres (PBDEs), (Figura. 5.1).

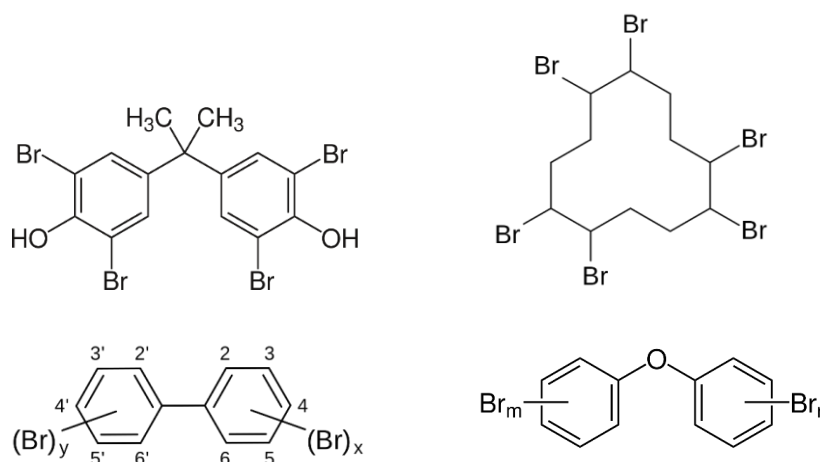


Figura 5.1. Estructura química genérica de los cuatro tipos de retardadores de llama orgánicos bromados: a) TBBPA, b) HBCD, c) PBB y c) PBDE. En estos dos últimos la posición y el número de átomos de bromo ($x+y$ ó $n+m \leq 10$) alrededor de los dos grupos fenilos pueden variar dando lugar a diferentes congéneres.

Los PBDEs comenzaron a comercializarse en la década de 1960 como resultado de la prohibición de otros dos retardadores de llama, los bifenilos polibromados y los bifenilos policlorados (PPBs y PCBs). Los PBDEs son mezclas de monómeros clasificados dentro del grupo de los retardadores de llama aditivos al no formar enlaces químicos con el polímero del material al que se incorporan. Como resultado, y a diferencia de los retardadores de llama reactivos, los retardadores aditivos pueden despegarse del polímero y liberarse al ambiente (McDonald, 2002; de Wit et al., 2006; Meng et al., 2008; Marvin et al., 2013). Se presentan en forma de tres mezclas comerciales o productos técnicos, predominando en su contenido un promedio de cinco (penta-bromodifenil éter [pental-BDE]), ocho (octa-BDE) o diez (deca-BDE) átomos de

bromo (Van Esch, 1994). Todos se caracterizan por un peso molecular elevado y rangos de logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) entre 5 y 10, confiriéndoles propiedades hidrofóbicas, bioacumulables y de persistencia a la biodegradación (ATSDR, 2017; de Wit, 2002; US EPA, 2008). Estos compuestos químicos se han asociado con efectos nocivos en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* tales como estrés oxidativo, toxicidad neurológica, perturbación del sistema hormonal tiroideo. Los PBDEs, además de sus metabolitos hidroxilados (OH-PBDEs), son estructuralmente similares a las hormonas tiroideas de modo que se han asociado con alteraciones en el desarrollo neurológico temprano (Ikonomou *et al.*, 2002; Darnerud, 2003; Ta *et al.*, 2008; Herbstman *et al.*, 2010; Kodavanti y Curras-Collazo, 2010; Williams y DeSesso, 2010; Chan y Chan, 2012).

En el año 2004, las mezclas comerciales penta-BDE y octa-BDE se prohibieron en Europa y los EE.UU. siendo catalogados como contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en la Convención de Estocolmo de 2009 debido a su persistencia, potencial bioacumulativo y toxicidad para la fauna y los seres humanos (UNEP, 2009). En 2008, la Unión Europea acordó la prohibición del uso y venta de deca-BDE en aparatos eléctricos y electrónicos, aunque su uso se continua permitiendo en materiales textiles, automóviles y materiales industriales Sin embargo, como consecuencia del desgaste de los innumerables objetos que los siguen conteniendo hace que sigan liberándose en los diferentes compartimentos ambientales acumulándose en sedimentos, seres vivos y alimentos (EFSA, 2011; US EPA, 2014; 2017).

El 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47) (Figura 5.2) destaca entre todos los demás PBDEs por ser el congénere de mayor preocupación ambiental (Sjödín *et al.*, 1998; de Wit *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2008; Montie *et al.*, 2010). Forma parte de la mezcla comercial penta-BDE, aunque también se presenta como producto bromado de degradación de otros congéneres de mayor peso molecular (de Wit *et al.*, 2006; ATSDR, 2017). Su presencia como retardador de llama de tipo aditivo resulta en

una constante liberación, con la consecuente presencia en numerosos compartimentos ambientales incluidos los ecosistemas acuáticos, siendo así el PBDE más ubicuo de toda la familia de polibromados (McDonald, 2002; de Wit *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2008; Marvin *et al.*, 2013). Su baja solubilidad en el agua (11 µg/L) (US EPA 2008) sugiere concentraciones ambientales del orden de ng/L, encontrándose principalmente asociado a material particulado en suspensión (SPM, Suspension Particulate Material) y en sedimento (1-100 ng/g), (Peng *et al.*, 2009; Sühring *et al.*, 2016), quedando menos de un 10% disuelto en el agua (Anderson y MacRae, 2006; de Wit *et al.*, 2006).

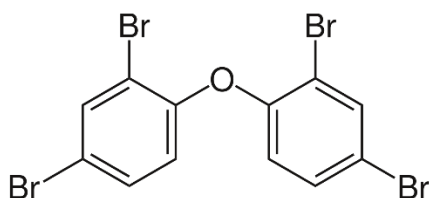


Figura 5.2. El PBDE probablemente más representativo: 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47).

Debido a los efectos del BDE-47 neurotóxico observados en diferentes modelos experimentales, a los diferentes mecanismos de acción sugeridos en la literatura científica y a su ubicuidad en efluentes y lodos de EDAR, tras el diseño y posterior validación del sistema dinámico (ver Capítulos 3 y 4) se consideró esta sustancia como susceptible de ser investigada en estudios relacionados con la valoración de la natación como biomarcador. (Si determinadas concentraciones de BDE-47 próximas a las ambientalmente realistas referentes a las consideradas en la literatura científica alteran procesos altamente coordinados del desarrollo en el pez, se esperaría entonces que esta sustancia originara alteraciones en la natación forzada).

Una revisión de literatura científica relativa a la valoración de los efectos del BDE-47 sobre el desarrollo temprano de peces, ya sea con embriones o en etapas posteriores

a la eclosión, mostró dos aspectos relevantes: la disolución del BDE-47 en el agua mediante disolventes orgánicos (e.g. dimetilsulfóxido, DMSO) como una ruta de exposición factible y realista (Lema *et al.*, 2007; Chou *et al.*, 2010; ; Chan y Chan, 2012; Chen *et al.*, 2012; Mhadhbi *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018), y el uso de configuraciones experimentales de entornos estáticos y restringidos para valorar efectos de tipo neuroconductual (Chou *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). Estudios en nuestro laboratorio cuestionaron el primer aspecto (González-Doncel, 2014) al poner en duda la vía de exposición acuosa del BDE-47. Por esta razón se descartó esta ruta de exposición en nuestros estudios destinados a valorar efectos sobre la natación al considerarla ambientalmente irrealista. El segundo aspecto también se cuestionó debido a que las configuraciones experimentales para valorar la natación parecían ambientalmente poco realistas. Ambos aspectos se han abordado con detalle en la discusión de este capítulo. Una nueva revisión de la literatura científica más acotada puso de manifiesto la existencia de otros trabajos donde se consideraba la ruta de exposición de BDE-47 a través de la dieta para evaluar efectos en el desarrollo del pez (Muirhead *et al.*, 2006; Lema *et al.*, 2008; van de Merwe *et al.*, 2011; Deane *et al.*, 2014; (Tomy *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2013). De éstos últimos, únicamente Chou *et al.* (2010) valoraron efectos de tipo neuroconductual tras exposiciones a BDE-47.

Así pues, recurriendo al medaka como modelo experimental y al sistema dinámico, se planteó evaluar los efectos de una exposición durante 40 días a BDE-47, a través de la dieta sobre el comportamiento natatorio en dos etapas del crecimiento, realizando la evaluación a los 20 y 40 días a partir del comienzo de la exposición.

Materiales y métodos

Reactivos y preparación de dietas con BDE-47

Las dietas fortificadas con BDE-47 (>99%; ChemService, West Chester, PA, EE.UU.) se prepararon partiendo de una disolución concentrada de 1 g/L de BDE-47 en *n*-hexano (>95%; Sigma–Aldrich Chemical Co.) que se diluyó 1:100 con *n*-hexano hasta obtener una concentración de trabajo de 10 mg/L (0,01 µg/L). Esta disolución de trabajo se dividió en alícuotas de unos 5 ml y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las alícuotas se utilizaron para preparar las diferentes dietas fortificadas con BDE-47. Las concentraciones de BDE-47 en estas dietas se seleccionaron de acuerdo con la literatura existente.

Los grupos de dietas conteniendo BDE-47, el control (dieta base) y el control disolvente (dieta con el disolvente *n*-hexano), se realizaron preparando un alimento consistente en una mezcla de la cianobacteria espirulina (género *Arthrospira*) (microfina -8–10 x 20 µm-; Argent Laboratories, Redmond, WA, EE.UU.) con comida comercial en copos (Sera Vipan, Heinsberg, Alemania) en una proporción 2:3. La composición nutricional de esta dieta base se ha detallado en la Tabla 5.1. Una vez mezclada y molida, se tamizó en un cedazo de 1000 µm de luz.

Tabla 5.1. Composición nutricional del alimento base empleado para las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta.

Composición final (%)	Espirulina: copos (2: 3)
Proteína	51,8
Grasa	5,82
Fibra	3,66
Ceniza	11,8

Las tres dietas con BDE-47 se prepararon de la siguiente manera: se mezcló un volumen de 5 ml de la concentración de trabajo de BDE-47 (10 mg/L de *n*-hexano) con 45 ml

adicionales de *n*-hexano para posteriormente añadirlo a 50 g de la dieta base. La mezcla se homogeneizó por agitación y se dejó secar a temperatura ambiente para producir una dieta de exposición enriquecida que contenía 1000 ng/g de BDE-47. Del mismo modo se preparó una dieta denominada control disolvente (0b) añadiendo 50 ml de *n*-hexano a 50 g de dieta base. La dieta control (0a) consistió únicamente en la dieta base. Las dietas de exposición se prepararon diluyendo con la dieta control disolvente la dieta de 1000 ng/g de BDE-47 preparándose así las dietas de exposición de 100 y 10 ng/g de BDE-47. Después de este proceso, las dietas se molieron en un mortero de ágata y se tamizaron con un cedazo de 200 µm de luz para almacenarlas a -20°C en tubos Eppendorf disponibles para la dosificación diaria del alimento de acuerdo con los procedimientos descritos más adelante. En total se obtuvieron 5 tipos de dietas consistentes en la dieta control (0a), control disolvente (0b), y las de BDE-47 (10, 100 y 1000 ng/g).

Sobre la base de la literatura existente pudimos comprobar que la concentración de 10 ng/g podría ser similar a las analizadas en sedimentos de ríos de determinadas zonas afectadas (Peng *et al.*, 2009; Chen *et al.* al., 2013) y a las estimadas en el SPM (Peng *et al.*, 2009).

Exposiciones a BDE-47

Los peces destinados a este estudio se obtuvieron de la colonia de reproductores. A lo largo de 4 días se recolectaron cerca de unos 2500 embriones. Diariamente, los huevos se lavaron con agua desclorada, y se incubaron (25°C) hasta su eclosión según lo descrito en el Capítulo 4.

Conforme la eclosión tenía lugar transcurridos unos 10 días, y en un margen de 4 días, los eleutheroembriones resultantes se transfirieron inmediatamente a acuarios de 15 L conectados al sistema de recirculación cerrado de la colonia reproductora. Se

mantuvieron en este sistema para su correcto desarrollo y aclimatación, alimentándolos ad libitum dos veces al día con espirulina microfina y con un aporte ocasional de Artemia salina en la etapa de nauplio (Instar I). Al comienzo del procedimiento experimental los peces habían alcanzado el estado de larva (4-7 dde). En ese momento, las larvas comprendidas dentro de esta edad y que mostraban una actividad normal se distribuyeron de modo aleatorio en grupos de 200 en 10 acuarios (20 cm x 18 cm x 18 cm; capacidad de 8 L) dentro un sistema de flujo continuo. Este sistema se surtía de la misma agua que la empleada en el mantenimiento de la colonia de reproductores. El caudal de agua en cada acuario se ajustó a unos 18 ml/min de modo que el 100% del volumen se renovara al menos tres veces al día. El fotoperiodo se configuró con un ciclo de luz constante de 15 h luz: 9 h oscuridad.

Los cinco grupos experimentales, cada grupo formado por dos acuarios, consistieron en el control (0a), control disolvente (0b) y los tres tratamientos de 10, 100 y 1000 ng de BDE-47 por gramo de comida. Cada uno de los acuarios se dispuso de modo aleatorio dentro del circuito de flujo continuo. Además, se incluyó un grupo experimental adicional de dos acuarios, denominado control conductual positivo (CPF) que consistió en peces alimentados con la dieta control disolvente. Estos peces se expusieron por vía acuosa a CPF según la estrategia descrita en el Capítulo 4 recurriendo a etapas de vida similares a las comprendidas para valorar el comportamiento tras la exposición a BDE-47 (Análisis estadístico de los datos cinemáticos). Este diseño experimental se realizó en dos ocasiones diferentes.

La duración del procedimiento experimental fue de 40 días a lo largo de los cuales los peces se alimentaron con la correspondiente dosis de comida. El diseño y estrategia experimental se muestra en la Figura 5.3. Durante los primeros 20 días, las dietas, consistentes en los dos controles (0a y 0b) y las fortificadas con BDE-47 (10, 100 y 1000), se administraron diariamente de modo manual a las 9:00 a.m. a cada uno de los acuarios. Transcurridos esos 20 días las dietas se administraron mediante

alimentadores automáticos. Estos alimentadores dispensaban la comida gradualmente a partir de las 9:00 am durante un período de 3 horas optimizando la dosificación.

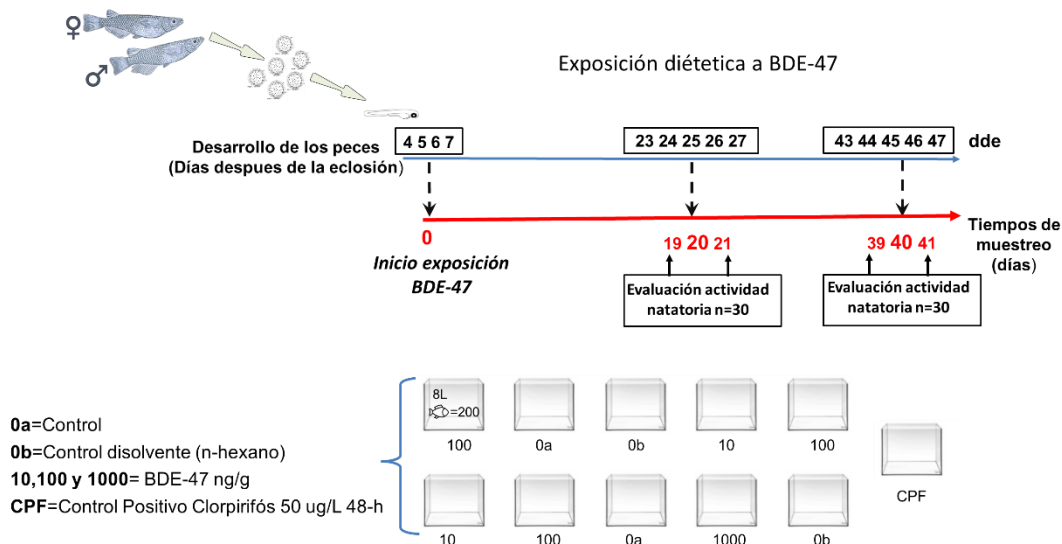


Figura 5.3. Diseño experimental de las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta a lo largo del crecimiento de los peces que muestra los tiempos de muestreo para evaluar diferentes parámetros de estudio: *i.e.* crecimiento, acumulación de BDE-47 y comportamiento en la natación.

La dosis diaria se ajustó al 15% del peso corporal (bw, body weight) cada diez días de acuerdo con el desarrollo de los peces, en función de los pesos registrados en cada punto de muestreo y con la cantidad de peces estimada en cada acuario (Sastre et al., 2018). Este régimen de alimentación del 15% bw está por encima de las necesidades de un pez para su correcto crecimiento y desarrollo (Davis et al., 2002). En este diseño experimental, al haber un número relativamente elevado de peces por acuario, el objetivo fue minimizar una posible competencia por el alimento como factor limitante del crecimiento de los peces.

Los parámetros de agua se monitorizaron de modo aleatorio en diferentes acuarios cada 10-14 días (media \pm DE): temperatura ($23-26^{\circ}$ C), pH ($.32 \pm 0,14$), oxígeno disuelto ($7,73 \pm 0,62$ mg / L) y conductividad ($111,9 \pm 2,12$ μ S / cm).

Evaluación del crecimiento

El crecimiento de los peces se evaluó mediante la medición de la longitud y anchura a los 20 y 40 días a partir del comienzo del procedimiento experimental. Los peces se recolectaron sobre las 9:00 a.m. antes de administrar la comida con el objeto de minimizar la cantidad de alimento presente en el tracto digestivo. Los peces se sumergieron en agua a $< 4^{\circ}\text{C}$ y se les administró una sobredosis de metanosulfonato de tricáina (200 $\mu\text{g/ml}$, Argent Laboratories, Redmond, WA, EE. UU.) Se posicionaron dorsalmente en un microscopio de disección (Olympus, mod. SZX12 Tokyo, Japón), y se fotografiaron junto a una escala de referencia. Las longitudes del cuerpo se midieron desde extremo más rostral de la cabeza hasta el extremo final de la aleta caudal a través de las fotos de los individuos. Adicionalmente, se evaluaron las anchuras del cuerpo de acuerdo con la distancia entre los lados externos de las dos vesículas óticas. Todas las mediciones se llevaron a cabo con el programa informático Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EE.UU.).

Una vez fotografiados, todos los peces muestreados se depositaron sobre papel secante para eliminar el exceso de agua adherida al pez por tensión superficial, para a continuación, pesarlos de modo individual dentro de cada tiempo de muestreo. Los pesos se consideraron como peso húmedo (ww, wet weight). Estos datos de pesos se emplearon para calcular la cuantificación del BDE-47 acumulado. Los peces se transfirieron en grupos a tubos de microcentrífuga de propileno (Eppendorf) de 1,5 ml. conteniendo peces de los dos días, 20 y 40, de muestreo (2 grupos por tratamiento para cada tiempo de muestreo en cada uno de los dos diseños experimentales; $n=4$ total de muestras por tratamiento y tiempo de muestreo), congelándose inmediatamente a -20°C para la posterior cuantificación del BDE-47 bioacumulado.

Cuantificación de BDE-47 en dieta y peces

La concentración de BDE-47 en las dietas se analizó según los métodos descritos por Chou *et al.* (2010) con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se pesó 1 g de cada una de las muestras de comida contaminada con las tres concentraciones de BDE-47 a ensayar (*i.e.* 10, 100 y 1000 ng/g) y se le adicionaron 0,4 ml de una disolución de 10 mg/L de 3,3', 5,5'tetrabromo 1,1'difenil, (PBB-80; Sigma-Aldrich Chemical Co.) como patrón de cuantificación o estándar interno. A continuación se realizó la extracción en baño de ultrasonidos con 5 ml de diclorometano (DCM) durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se llevó el sobrenadante a otro tubo de ensayo. Esta operación se repitió 3 veces. Los extractos trasvasados se agitaron con 2 ml de H₂SO₄ concentrado, se centrifugaron (3500 r.p.m., 5 min) recogiendo el sobrenadante nuevamente; esta operación se repitió 2 veces más. La purificación de los extractos finales se realizó pasándolos a través de una columna de gel de sílice ácida (6 g de gel de sílice acondicionado con H₂SO₄ concentrado; proporción 3: 2). El eluato limpio se evaporó a 40°C (Genevac, Ipswich, Inglaterra) y se disolvió nuevamente con 0,2 ml de *n*-hexano en microviales de inyección. La detección y cuantificación de BDE-47 se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS, Gas Chromatography / Mass Spectrometry): El cromatografo (6890, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) con una columna Equity-5 (30 m × 0,25 mm I.D., 0,25µm), estaba acoplado a un detector selectivo de masas (5973, Agilent Technologies). El flujo de helio se mantuvo constante (1,2 ml/min) y la temperatura de la columna se programó de 60 °C (tiempo de equilibrio inicial de 5min) hasta 300°C con incrementos de 10 °C/min, manteniéndose finalmente a 300 °C durante 5 min. El espectrómetro de masas operó en modo SIM (Selecting Ion Monitoring,) para análisis cuantitativo: 486 y 470 m/z para BDE-47 y PBB-80, respectivamente. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar interno, construyendo una curva de calibración con 10 muestras de comida fortificada de 4 a 1000 ng de BDE-47/g comida. Las recuperaciones variaron entre 72%-117%, calculadas con siete lotes de 1 g de

comida fortificada a 5 niveles: 19, 78, 312, 1250 y 5000 ng de BDE-47 g de comida. Los límites de cuantificación y detección en la comida se establecieron en 4 ng/g y 1.3 ng/g, respectivamente.

El BDE-47 bioacumulado se analizó en las muestras de peces destinadas a valorar el crecimiento (*i.e.* de los días 20 y 40 a partir del comienzo del diseño experimental (Figura. 5.4). Para ello, las muestras congeladas que contenían los grupos de peces (n=4 grupos por tratamiento, para los dos procedimientos experimentales independientes) se descongelaron y la bioacumulación de BDE-47 se determinó de acuerdo a los métodos de Moliner-Martínez *et al.* (2009) con algunas modificaciones (González-Doncel *et al.*, 2014). Cada grupo de peces congelados, con un contenido total en peso de entre 100 y 300 mg, se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml donde se añadieron 500 µl de agua ultrapura (MilliQ; Millipore Co.) y se homogeneizaron con un ultra-Turrax (T25 digital ultra-Turrax, IKA, Staufen. Alemania). El homogeneizado se transfirió a viales de 30 ml. Este procedimiento se repitió tres veces hasta completar unos 2000 µl. Para terminar, el tubo Eppendorf se lavó tres veces más con 1000 µl de agua MilliQ. A continuación, se introdujo una barra de agitación magnética en cada vial y se añadió un volumen de 100 µl de una solución de PBB-80 de 100 ng/ml como estándar interno. Los viales se sellaron con tapones de aluminio con orificio central y septum de teflón. La extracción del BDE-47 se realizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SMPE, Solid Phase Micro Extraction) utilizando fibras de PDMS (polidimetilsiloxano) de 100 µm. Para ello se introdujo el vial de análisis en un baño de agua termostaticado a 95 °C, se insertó la fibra de SPME a través del septum del vial y se permitió la adsorción durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo la fibra se inyectó en el GC/MS con un tiempo de 5 min de desorción a 300 °C, permaneciendo insertada hasta el fin del análisis cromatográfico. La cuantificación se realizó interpolando los datos obtenidos en la curva de calibración correspondiente. Esta curva se obtuvo con lotes de 25 eleuteroembriones (peso aproximado de un eleuteroembrión:

0,750 mg) fortificados con concentraciones de entre 1.5 y 500 ng BDE-47/ lote (valores expresados como ng de BDE-47 por gramo de peso húmedo de pez ,ww). Las recuperaciones variaron entre 65 y 105 %, y se calcularon con seis lotes de 40 larvas fortificadas a tres niveles: 25, 250 y 2500 ng de BDE-47/ lote. Los límites de cuantificación y detección en los peces se establecieron en 79 ng/g y 26 ng/g, respectivamente.

Obtención, procesamiento y análisis estadístico de los datos cinemáticos

La actividad natatoria en los diferentes tratamientos, incluidos los controles y el control conductual positivo de CPF, se evaluó los días 20 y 40 a partir del comienzo del procedimiento experimental (Figura. 5.3). Se seleccionaron dos espacios de natación de longitudes de 220 y 300 mm junto con las dos velocidades críticas correspondientes de 8,1 y 8,6 cm/s obtenidas de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 3. La natación forzada se evaluó en grupos de 15 peces/acuario (n=30 peces/tratamiento o grupo experimental (0a, 0b, 10, 100 y 1000) seleccionados al azar. Los peces de cada grupo se colocaron de uno en uno en la zona central del espacio natación del canal con una velocidad inicial de agua menor o igual a 1cm/s. Posteriormente, el flujo de agua se ajustó a la velocidad prescrita para cada etapa de desarrollo (Capítulo 3) y la actividad locomotora se grabó durante 6 minutos para el estudio de los datos cinemáticos (*i.e.* obtención de patrones de comportamiento natatorio y análisis estadístico comparativo) de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 4.

El grupo experimental adicional de dos acuarios, denominado control conductual positivo, se destinó a la exposición de peces a CPF y así poder tener una referencia de perturbación conocida de la natación. Se seleccionaron aleatoriamente grupos de 15 peces/tanque (n=30 peces) para los tiempos de muestreo 20 y 40. Estos grupos se expusieron en vasos de vidrio de 250 ml conteniendo 100 ml de una disolución de 50

$\mu\text{g/L}$ de CPF renovándose durante 48 h del medio 24 h antes de registrar la actividad natatoria. Los peces expuestos a CPF se descartaron una vez se registraron los vídeos.

El tiempo de grabación total que comprendió cada uno de los dos días de evaluación de la actividad natatoria fue de unos 1080 min. Este tiempo comprendía a todos los peces correspondientes a los seis tratamientos incluido el control conductual positivo $[(30 \text{ peces/tratamiento} \times 6 \text{ min}) \times 6 \text{ tratamientos} = \text{aprox. } 18 \text{ h}]$. Así, los tiempos de registro de la actividad natatoria se tomaron a lo largo de 3 días consecutivos, en los que las grabaciones de la natación se realizaron entre los 19, 20 y 21 para el día 20 de muestreo, y los días 39 40 y 41 para el día 40 de muestreo (Figura. 5.3). De acuerdo con esta estrategia, diariamente se grabaron cinco peces por acuario (10 peces/tratamiento) comenzado en todos los casos a la misma hora de la mañana. Los peces tratados con BDE-47 utilizados para las pruebas de natación en el punto 20 se devolvieron a sus respectivos acuarios para continuar con las exposiciones a través de la dieta. El análisis del comportamiento de los peces y el tratamiento de datos se hizo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4.

Resultados

Crecimiento

Las longitudes y anchuras de los peces medidas los días 20 y 40 se muestran en la Tabla 5.2. La longitud y en ancho de los peces no mostró una diferencia estadística entre los grupos de los tratamientos con BDE-47 y los respectivos controles para ninguno de los dos tiempos de muestreo por lo que el desarrollo de los peces, dentro de su variabilidad, parecía seguir una evolución normal independiente del tratamiento. En el día 20 de muestreo, el ancho de los peces ocupaba un 4.2% del ancho total del canal. En el día 40 ocupaban más del 5.3% del ancho del canal.

Tabla 5.2. Longitud y ancho de los peces según el tratamiento y etapa de desarrollo.

BDE-47 (ng/g)	Tiempo de muestreo 20 días		Tiempo de muestreo 40 días	
	Longitud (mm) (media ± SD)	Anchura (mm) (media ± SD)	Longitud (mm) (media ± SD)	Anchura(mm) (media ± SD)
0a ¹	7,03 ± 0,94	1,06 ± 0,13	8,93 ± 2,42	1,38 ± 0,44
0b ²	7,11 ± 0,84	1,07 ± 0,12	10,26 ± 1,77	1,59 ± 0,32
10	7,26 ± 0,83	1,09 ± 0,11	9,30 ± 2,21	1,44 ± 0,40
100	6,93 ± 1,00	1,04 ± 0,13	8,70 ± 1,66	1,34 ± 0,30
1000	7,15 ± 0,89	1,07 ± 0,12	9,19 ± 2,47	1,42 ± 0,45

^a Valores representan la media (± SD) de n=30 peces medidos por tratamiento

¹ Peces alimentados con la dieta control (dieta base)

² Peces alimentados con la dieta control disolvente

La ausencia de diferencias en cuanto a los tamaños totales de los peces entre los grupos control y los expuestos a BDE-47 en ambos tiempos de muestreo hacía que pudiéramos descartar esta variable fenotípica como un posible factor potencial que pudiera afectar al comportamiento de la natación.

Cuantificación de BDE-47 en dietas

Las concentraciones de BDE-47 analizadas en las tres dietas fortificadas fueron similares a las respectivas concentraciones nominales Tabla 5.3. Las tasas de recuperación variaron entre un 93% y 106% respecto a las concentraciones nominales aplicadas de 10, 100 y 1000 ng/g de BDE-47.

Tabla 5.3. Concentraciones de BDE-47 analizadas en las dietas previamente fortificadas^a.

BDE-47 nominal (ng/g); concentración	BDE-47 (ng/g); concentración real (media ± SD)
10	10,6 ± 0,5
100	92,9 ± 2,2
1000	1015,8 ± 61,7

^a Los valores analizados vienen expresados en forma de peso seco y se obtuvieron a partir de cuatro muestras (réplicas) para cada concentración nominal.

Cuantificación de BBDE-47 en peces

Las concentraciones de BDE-47 analizadas en los peces los días 20 y 40 se presentan en la Figura. 5.4 En los peces alimentados con la dieta fortificada con 10 ng/g de BDE-47 los niveles se mostraron estables entre el día 20 y el día 40, resultando en respectivas acumulaciones de $50,32 \pm 17,34$ y $47,66 \pm 11,03$ ng/g ww (valores expresados como la media \pm SEM). No obstante, se observó cómo conforme incrementaba la concentración de las dosis en dieta (*i.e.*, ≥ 100 ng/g de BDE-47) los niveles de BDE-47 presente en los peces aumentaban con el tiempo de exposición. El día 40 las concentraciones medias máximas de BDE-47 fueron de $230,37 \pm 63,5$ y $636,00 \pm 18,8$, ng/g ww en los respectivos grupos de peces alimentados con 100 y 1000 ng/g de BDE-47. Estos resultados demostraron cómo los peces expuestos a BDE-47 bioacumulaban este contaminante progresivamente conforme la concentración y el tiempo.

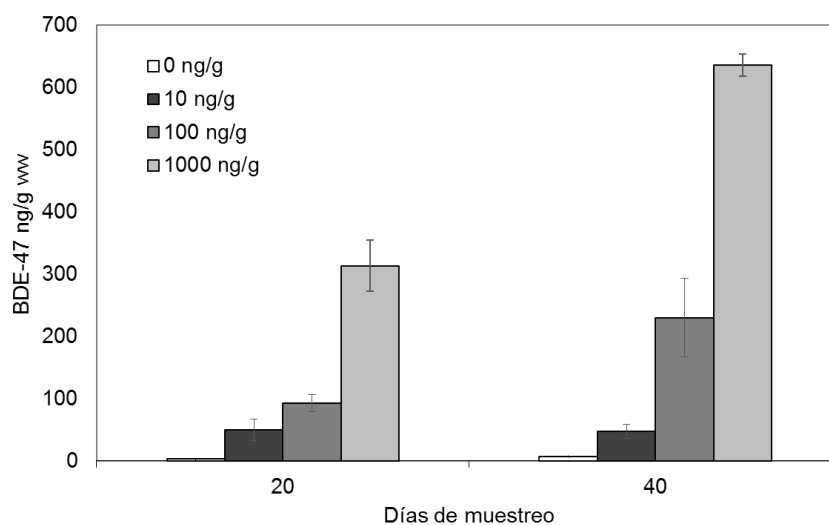


Figura 5.4. Bioacumulación de BDE-47 en peces expuestos a tres dietas fortificadas con 10, 100 y 1000 ng/g de BDE-47. El grupo "0b" corresponde a los peces alimentados con la dieta control disolvente. Los valores representan la media (\pm SEM) de dos grupos experimentales independientes ($n = 4$).

Distancias relativas recorridas

Las distancias relativas medias recorridas durante los 6 min de grabación por los peces muestreados los días 20 y 40 se muestran en la Figura 5.5. Ninguno de los dos tiempos de muestreo mostraron diferencias significativas entre las distancias medias recorridas para los diferentes tratamientos a BDE-47 en dieta.

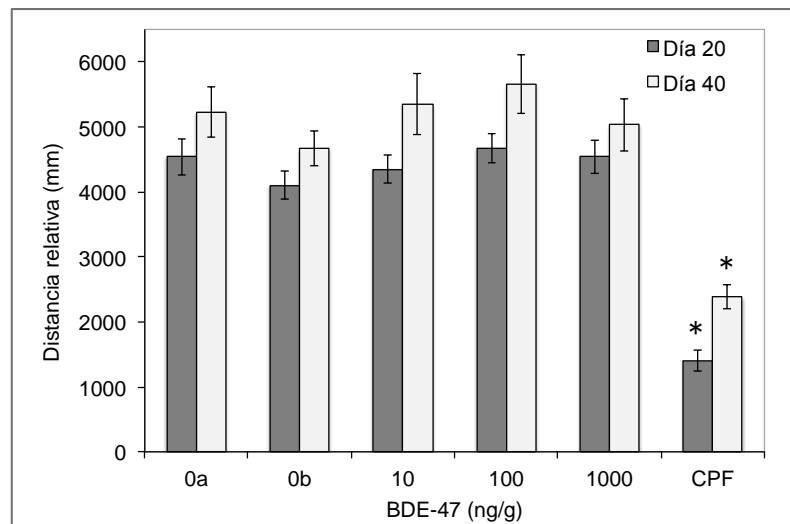


Figura 5.5. Distancias relativas recorridas por los peces en los tiempos de muestreo de 20 y 40 días expuestos a tres dietas fortificadas con 10, 100 y 100 ng/g de BDE-47. Los grupos “0a”, “0b” y “CPF” corresponden a los peces alimentados con la dieta base, la dieta control disolvente (*n*-hexano) y los expuestos a CPF (50µg/L; control conductual positivo) durante 48 h, respectivamente. Un asterisco (*) indica diferencias significativas respecto al grupo control disolvente para el mismo día de muestreo. Los valores representan las medias (\pm S.E.M.) de $n=30$ peces por tratamiento.

Para el día 20 de muestreo, estos valores variaron entre los 4000 y 4500 mm para todos los tratamientos a BDE-47. En el tiempo 40 de muestreo, en todos los tratamientos los peces recorrieron entre los 4800 y 5500 mm siguiendo un patrón similar al observado en el día 20. Observando los datos para el control conductual positivo (CPF), se aprecia una disminución significativa de las distancias medias recorridas en los dos grupos de peces.

Mapas de gradiente

Los patrones de situación de los diferentes grupos de peces correspondientes a los días 20 y 40 de muestreo se han mostrado mediante los correspondientes mapas de gradiente. Los datos cinemáticos obtenidos a partir de las grabaciones del movimiento permitieron obtener estos dos tipos de mapas siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4. En los mapas de gradiente, tanto para el día 20 como el 40, la escala de representación del rango de tiempo de presencia del pez se estableció entre 0,0-8,6% del tiempo total de grabación con incrementos de 0,1%. Para cada uno de los dos días de muestreo, se obtuvieron seis mapas de gradientes, tres mapas correspondientes a los peces tratados con BDE-47, dos para los controles 0a y 0b, y un mapa adicional de los peces del tratamiento con el control conductual positivo (CPF).

Los mapas de gradiente originados por los peces correspondientes al día 20 de muestreo se han presentado en la Figura. 5.6. Los grupos 0a y 0b mostraron un patrón posicional dentro del canal con unos porcentajes de presencia comparativamente elevados en las regiones próximas a la entrada (valores medios de presencia aproximados entre 0,5-1,8%) y salida del agua, y a lo largo de las paredes (entre 0,2-1,0%) (Figura. 5.6, mapas 0a y 0b). En ambos controles se observó un patrón de natación comparable. Los patrones de natación a partir de los mapas de gradiente de los tres grupos de peces tratados con BDE-47 resultaron visualmente similares a los grupos 0a y 0b, en el que tanto los peces se situaban a lo largo de los 6 min en prácticamente las mismas zonas. El mapa de gradiente correspondiente a CPF reveló un patrón conductual con valores altos de posicionamiento en zonas cercanas a la salida del agua (porcentajes de presencia > 1,8-4,0%) (Figura 5.6, mapa CPF).

Los mapas de gradiente correspondientes al tiempo 40 de muestreo se muestran en la Figura. 5.7. Los valores más altos de tiempo de presencia de natación en 0a y 0b se apreciaron principalmente en amplias zonas próximas a la entrada de agua en el canal y en pequeñas zonas aisladas cerca de la salida del agua con valores

comprendidos entre 0,5 y 1,0% (Figura. 5.7; mapas 0a y 0b). Los mapas de gradiente obtenidos con los datos de los grupos de peces tratados con BDE-47 mantuvieron un patrón similar entre ellos y a su vez con el grupo 0b, resultando en las zonas de mayor presencia próximas a la entrada de agua y en zonas más restringidas a la salida del agua del canal. En todos los casos, los valores más bajos de porcentaje de presencia aparecieron en amplias zonas centrales del canal (i.e. valores de < 0,3% del tiempo total de presencia). El mapa de gradiente del grupo CPF mostró valores con alta presencia en zonas adyacentes a la salida del agua (valores entre 1,0-8,0%) (Figura. 5.7, mapa CPF). Al igual que en el día 20 de muestreo, este patrón delató la incapacidad para nadar contra el flujo de agua.

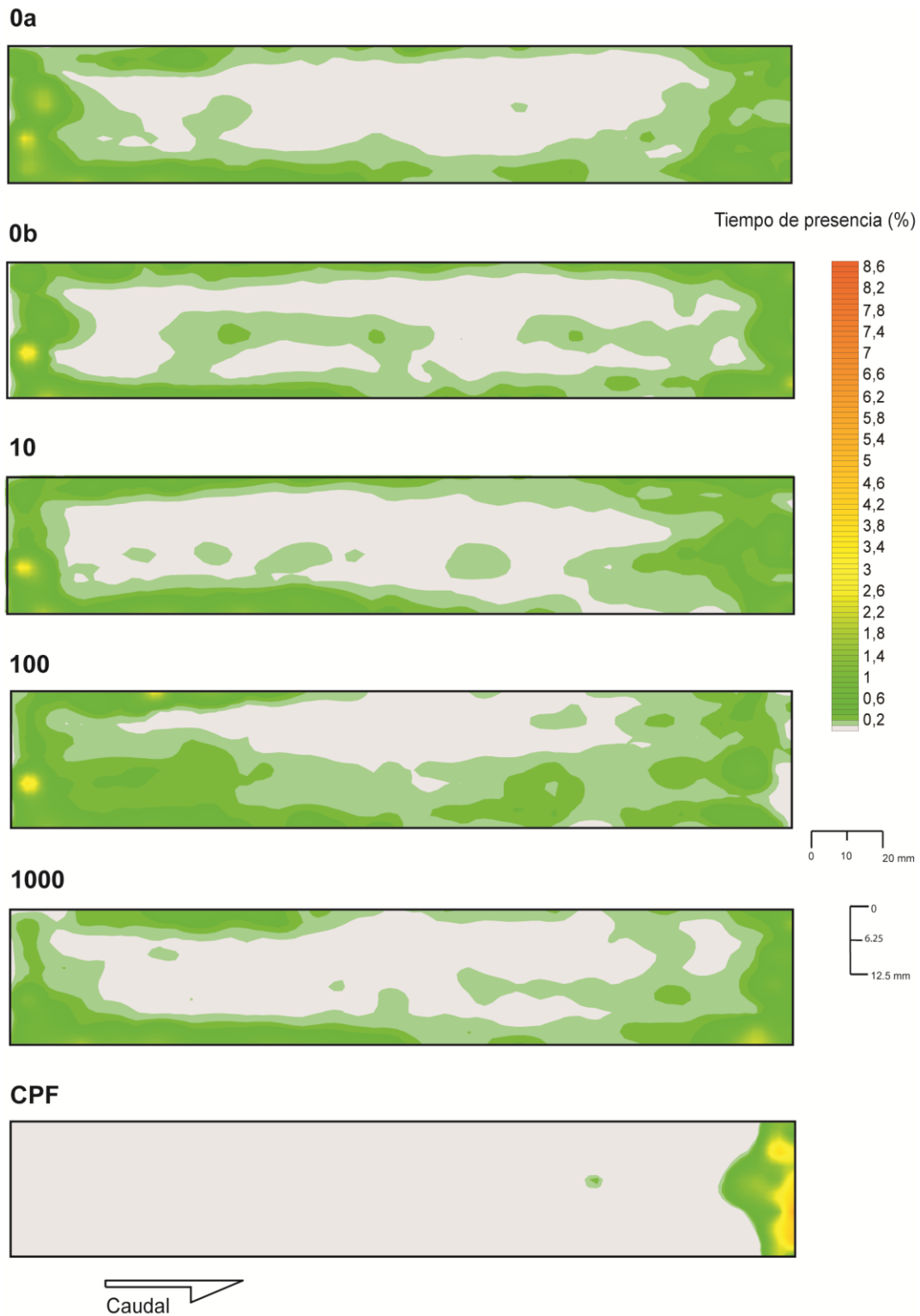


Figura 5.6. Mapas de gradiente del día 20 de muestreo. Los mapas “0a” y “0b” corresponden a los tratamientos control y control disolvente (*n*-hexano). Los mapas “10, 100” y “1000” representan las concentraciones nominales en dieta de 10, 100 y 1000 ng/g de BDE-47 respectivamente. El mapa “CPF” corresponde al grupo de peces tratados con CPF. Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de 30 peces por tratamiento, correspondiendo los valores más altos a los colores más cálidos.

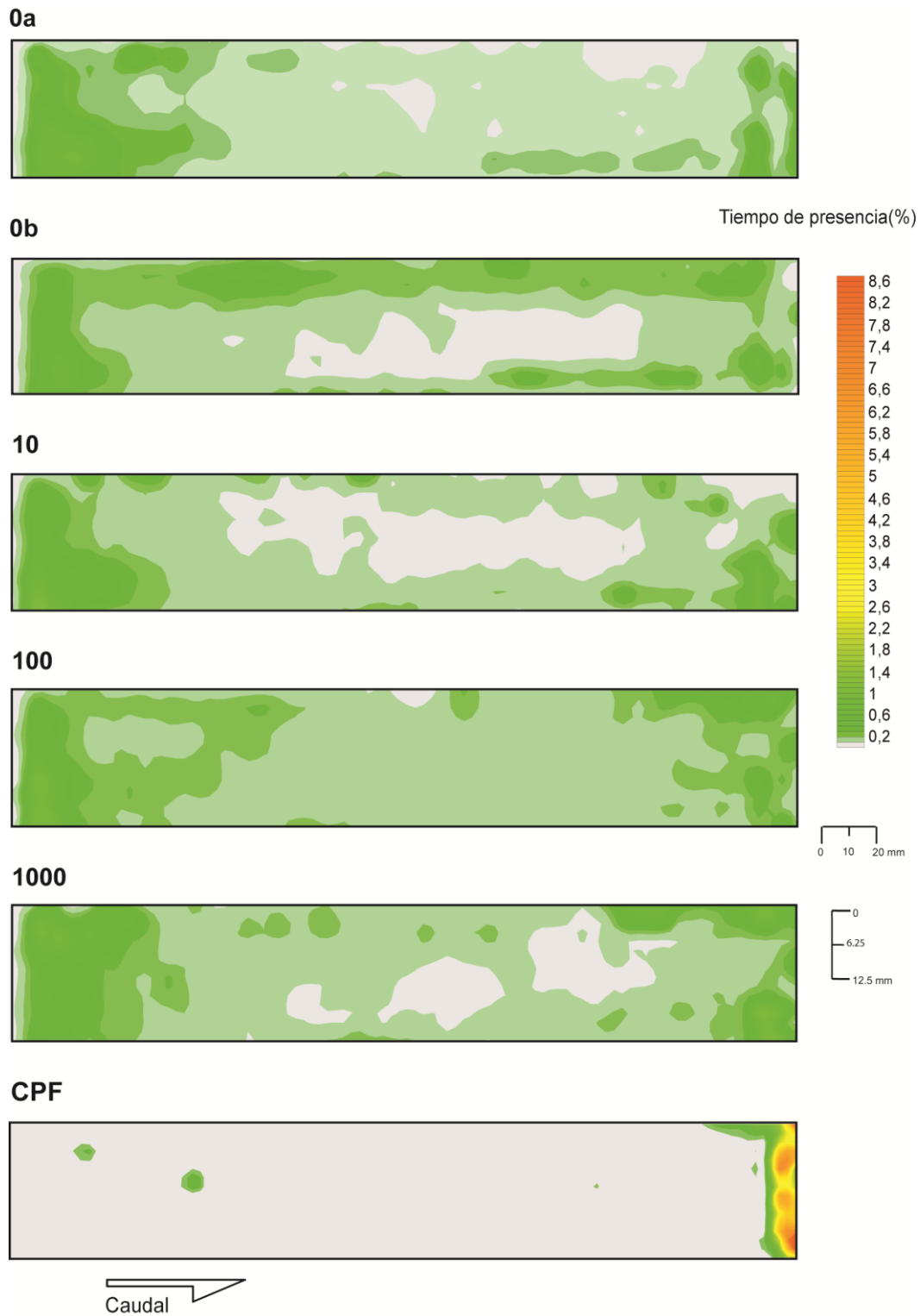


Figura 5.7 Mapas de gradiente del día 40 de muestreo. Los mapas “0a” y “0b” corresponden a los tratamientos control y control disolvente (n-hexano). Los mapas “10, 100” y “1000” representan las concentraciones nominales en dieta de 10, 100 y 1000 ng/g de BDE-47 respectivamente. El mapa “CPF” corresponde al grupo de peces tratados con CPF. Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de 30 peces por tratamiento, correspondiendo los valores más altos a los colores más cálidos.

Áreas de residencia

Los mapas de residencia permitieron comparar estadísticamente el comportamiento natatorio forzado en el canal. En estos mapas, las diferencias significativas las 15 áreas en los grupos tratados con relación a las respectivas de los grupos control se marcaron en color rojo de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 4.

Los mapas de residencia de los tiempos 20 y 40 de muestreo correspondientes a los grupos Control (0a) y Control disolvente (0b) no mostraron diferencias significativas al ser comparadas entre ellos a excepción de los mapas 0a y 0b del tiempo 40 en el que el área 2B del mapa 0b mostró diferencia significativa respecto a 0a (Figura 5.9, mapa 0b; $P \leq 0.015$). Esta única diferencia entre el Control disolvente y el Control, en el tiempo de muestreo, 40 no se consideró suficientemente relevante para concluir la existencia de modificaciones del comportamiento de natación. Así, se descartaron efectos del disolvente en el comportamiento de los peces, permitiendo que la comparación estadística de los diferentes grupos de peces tratados con BDE-47, además de los dos grupos conductuales positivos, se realizara con el correspondiente grupo Control disolvente (0b dentro de cada tiempo de muestreo).

En el día 20 de muestreo, la comparación estadística no reveló diferencias significativas en las áreas de residencia de los peces tratados con BDE-47 y las áreas correspondientes de los peces del control disolvente (Figura. 5.8, mapa 0b vs. mapas 10,100 y 1000). La única excepción se observó en el área 2C dentro del grupo de 1000 ng/g de BDE-47 con un tiempo de residencia comparativamente más alto que el respectivo en el control disolvente ($P \leq 0.030$). Esta única diferencia parecía insuficiente como sugerir variaciones en el comportamiento de la natación debido al tratamiento con 100 ng/L de BDE-47. Con relación al grupo conductual positivo (Figura. 5.8, mapa CPF) la comparación estadística mostró diferencias significativas con relación al grupo Control disolvente en un total de 11 áreas de 15, ($P \leq 0,001$). Estas diferencias apoyadas por el

respectivo mapa de gradiente, revelaban la existencia de cambios en el patrón de comportamiento de la natación forzada.

Los mapas de residencia con la distribución de los valores numéricos de tiempo de residencia para los grupos de peces dentro del día 40 de muestreo se han representado en la Fig. 5.9. Los valores de residencia en las diferentes áreas de los peces tratados con 10 ng/g de BDE-47 no mostraron diferencias significativas con las respectivas áreas del grupo Control disolvente (Fig. 5.9, mapa 0b vs. mapa 10). Los grupos de peces tratados con 100 y 1000 ng/g de BDE-47 mostraron únicamente un área con diferencias significativas respecto al control disolvente: área 3B ($P \leq 0.038$) y área 4C ($P \leq 0.043$), respectivamente. Estos resultados, teniendo en cuenta los mapas de gradiente resultantes, no parecían ser suficientes como para concluir efectos del BDE-47 en la natación forzada de los peces en esta etapa de desarrollo. En cuanto a la comparación estadística del grupo control conductual positivo (CPF) con el grupo control disolvente, se apreciaron 12 áreas con valores de residencia estadísticamente significativas ($P \leq 0,002$). Estas diferencias, junto con los mapas de gradiente, indicaban la existencia de patrones de natación forzada diferenciales.

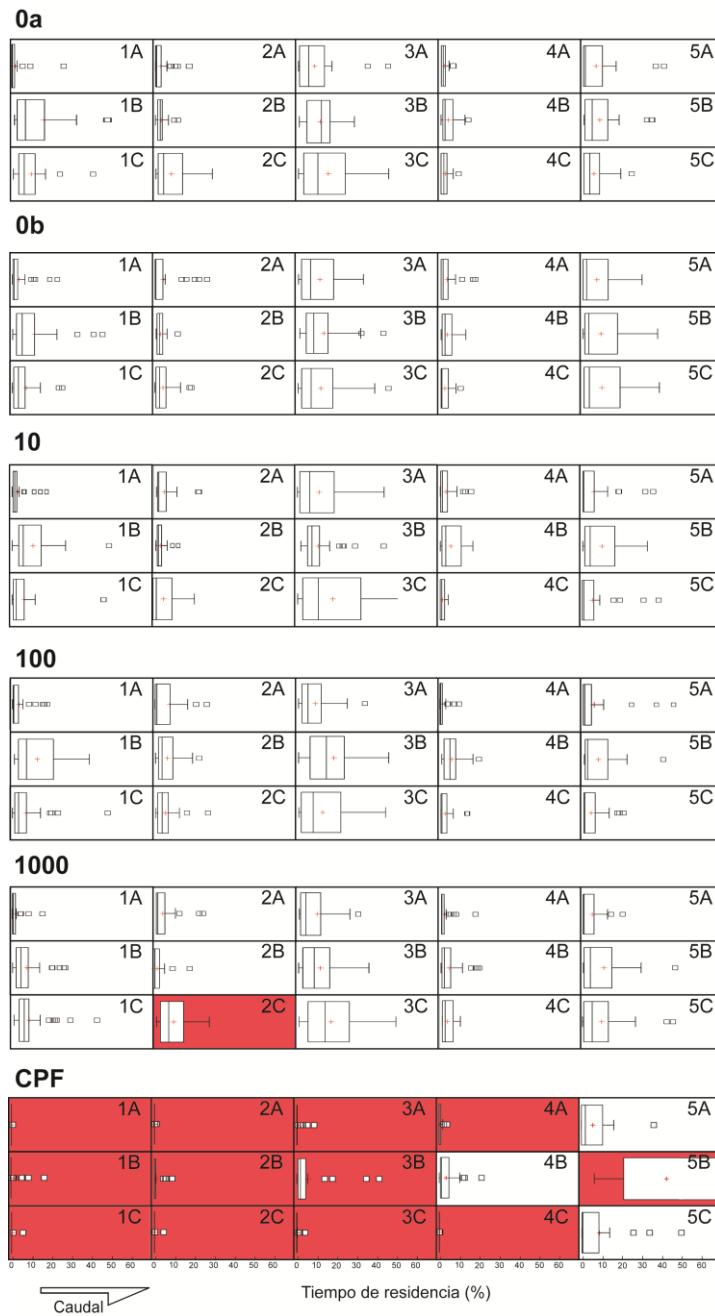


Figura 5.8. Representación de los mapas de áreas de residencia del día 20 de muestreo de las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta. Las 15 áreas se han representado con el mismo tamaño (las proporciones reales se pueden ver en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). Los mapas “10”, “100”, y “1000” están referenciados a las cuatro concentraciones BDE-47 en la dieta, expresadas en ng/g. Los mapas referenciados como “0a” y “0b” corresponden a las distribuciones de los datos de los tratamientos control y control disolvente (*n*-hexano), respectivamente. El mapa “CPF” corresponde al grupo de peces tratados con CPF. Las cajas y bigotes, insertadas horizontalmente dentro de cada área, muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de esa área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los “bigotes” representa 1,5 veces el rango inter-cuartil [$1,5 \times (Q3-Q1)$] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos están representados como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos dentro grupo control disolvente “0b”, marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaron diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30 peces por tratamiento.

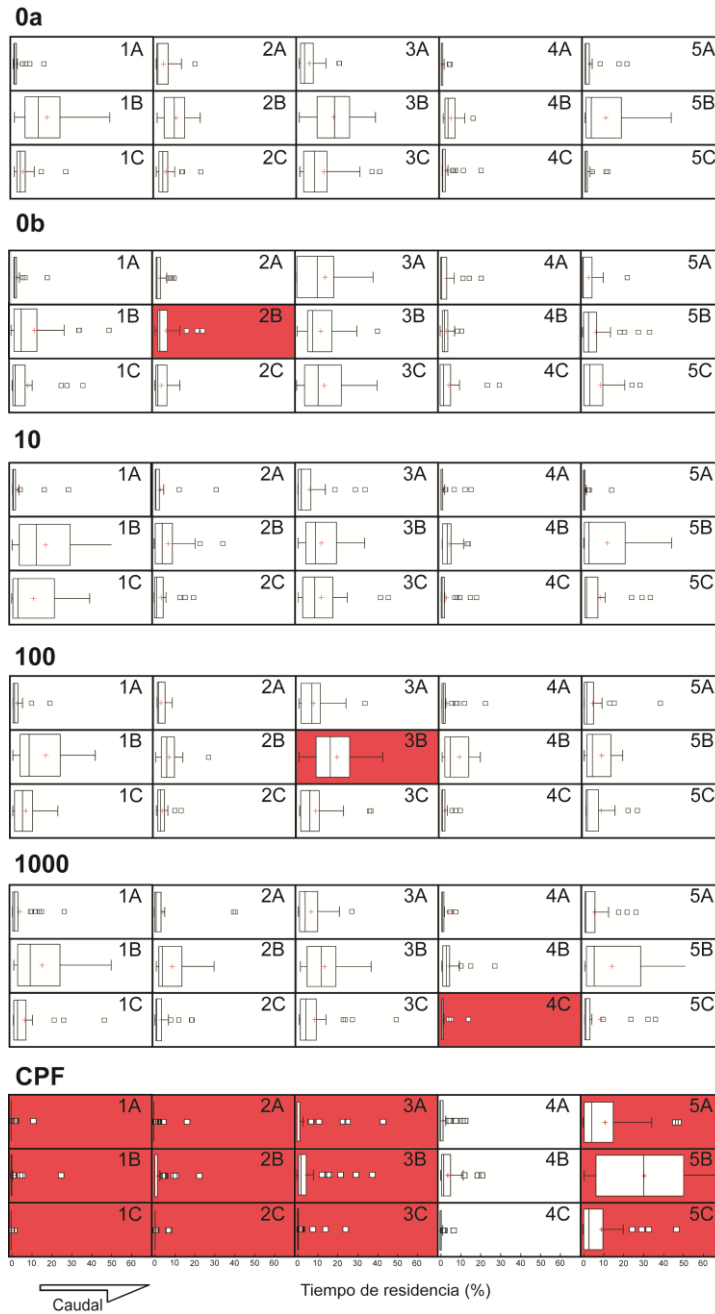


Figura 5.9 Representación de los mapas de áreas de residencia del día 40 de muestreo de las exposiciones a BDE-47 a través de la dieta. Las 15 áreas se han representado con el mismo tamaño (las proporciones reales se pueden ver en la Fig. 4.3 del Capítulo 4). Los mapas “10”, “100”, y “1000” están referenciados a las cuatro concentraciones BDE-47 en la dieta, expresadas en ng/g. Los mapas referenciados como “0a” y “0b” corresponden a las distribuciones de los datos de los tratamientos control y control disolvente (n-hexano), respectivamente. El mapa “CPF” corresponde al grupo de peces tratados con CPF. Las cajas y bigotes, insertadas horizontalmente dentro de cada área, muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de esa área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los “bigotes” representa 1,5 veces el rango inter-cuartil [$1,5 \times (Q3-Q1)$] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos están representados como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos dentro grupo control disolvente “0b”, marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaron diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30 peces por tratamiento.

Discusión

En el momento de llevar a cabo el diseño experimental descrito en este capítulo, la información disponible en la literatura científica describiendo efectos de tipo neuroconductual del BDE-47 en peces era escasa y poco concluyente. Además, esa información ecotoxicológica se refería principalmente en estudios recurriendo a etapas tempranas, previas e inmediatamente posteriores a la eclosión, quizás por ser consideradas tradicionalmente como el periodo de vida más susceptible a cualquier tipo de insulto ambiental [Weis y Weis, 1989], donde las exposiciones se realizaban a través de la columna de agua (por vía acuosa).

Esta estrategia experimental contrasta con el valor de K_{ow} relativamente elevado que presentan no sólo el BDE-47, sino todos los PBDEs. Basándose en esta aproximación experimental, varios de estos trabajos han recurrido a diferentes tipos de actividades motoras básicas, como parámetros de observación y valoración del comportamiento, analizadas a partir de ambientes estáticos y en recintos relativamente pequeños. La Tabla 5.4 muestra los datos experimentales y resultados de todos estos trabajos donde la exposiciones a BDE-47 se realizaron por vía acuosa para recurrir posteriormente al movimiento junto con otros parámetros de observación como indicadores. Usenko et al. (2011) observaron efectos sobre el movimiento embrionario espontáneo y la natación de eleuteroembriones del cebrá analizados en placas de 48 pocillos tras exposiciones de embriones descorionados en condiciones estáticas a seis congéneres de PBDEs, uno de los cuales era el BDE-47, dentro de un rango de concentraciones nominales que variaban entre 635 y 20 000 $\mu\text{g/L}$. Chen et al. (2012) recurrieron a placas de 24 pocillos como receptáculos para evaluar cuatro tipos diferentes de comportamiento motor de larvas del cebrá a las 96, 120, 144 y 168 h después de la fertilización tras exposiciones a concentraciones nominales de entre 607 y 9700 $\mu\text{g/L}$ de BDE-47. En sus estudios apreciaron una disminución de la velocidad y cambios en el movimiento natural de la natación debido a una menor respuesta, al ser

estimulados mediante vibraciones o ciclos de luz y oscuridad. Zhao et al. (2014) observaron una disminución de la actividad normal de larvas del cebrá en placas de 96 pocillos con estimulaciones intermitentes de intervalos de 10 minutos de luz y oscuridad, tras exposiciones durante la fase embrionaria a una concentración nominal de 500 µg /L de BDE-47. Glazer et al. (2018) comprobaron la existencia de diferencias en las distancias recorridas por larvas del pez cebrá que eran estimuladas con ciclos de 10 min de luz y oscuridad tras exposiciones de los embriones a concentraciones nominales de 48,5 µg/L de BDE-47. Recurriendo a embriones descorionados del cebrá, Tanaka et al. (2018) apreciaron signos de hiperactividad pasadas 26 horas de la fertilización al ser sometidos a una concentración nominal de 1000 µg/L de BDE-47.

Todos estos estudios contrastan con los resultados obtenidos de los trabajos realizados por Zhang et al. (2017). Tras exposiciones a concentraciones nominales de 1,63-240 µg/L de BDE-47 no apreciaron efectos en el comportamiento social de larvas del cebrá a los 5, 6 y 7 días después de la fertilización tras estimulaciones con luz y oscuridad en placas de 6 pocillos. Estos autores entendieron el comportamiento social como el número de contactos entre dos larvas. Estas concentraciones, menos alejadas si cabe de las que podrían darse en un medio acuoso natural, contrastan con las concentraciones empleadas en los estudios mencionados con anterioridad. Además de estos trabajos, otros estudios han abordado parámetros de observación sobre efectos morfológicos, fisiológicos y de transcripción de genes relacionados con el eje tiroideo (Lema et al., 2007; Zheng et al., 2012; Chan y Chan, 2012; La Tabla 5.4), donde, nuevamente, los resultados no parecen ser coincidentes.

Tabla 5.4. Trabajos experimentales publicados sobre los efectos del BDE-47 en etapas tempranas de peces tras exposiciones acuosas. La concentración de la exposición se refiere a la concentración nominal de BDE-47 mencionada en los trabajos.

Especie	Exposición (µg/L)	Disolvente, % DMSO	Renovación del medio	Duración exposición (h)	Concentración real analizada	Acumulación en tejidos	Parámetro tóxico	Referencia
<i>Danio rerio</i>	100-5000	0,3	48 h	96	No	Si	Eclosión, crecimiento, malfo, sist. cardiovascular	Lema et al., 2007
<i>Danio rerio</i>	635-20000	0,5	No	168	Si (t=0h)	No	Movimiento, natación, malformaciones	Usenko et al., 2011
<i>Danio rerio</i>	607-9700	0,1	No	24-120	No	Si	Movimiento, natación, sistema neuronal axonal y motor	Chen et al., 2012
<i>Danio rerio</i>	8-200	0,1	24h	200	Si	Si	Transcripción genes eje hipotálamo-pituitaria-tiroides	Zheng et al., 2012
<i>Danio rerio</i>	540-15200	0,2	No	96	No	No	Transcripción genes eje hipotálamo-pituitaria-tiroides	Chan y Chan, 2012
<i>Danio rerio</i>	5-500	0,1	24 h	144	No	No	Natación	Zhao et al., 2014
<i>Oryzias latipes</i>	500-10000	1,0	24h	200	Si	Si	Morfología, fisiología	González-Doncel et al., 2014
<i>Danio rerio</i>	1,63-240	0,1	24	168	Si	No	Actividad social(contacto entre peces) distancia	Zhang et al., 2017
<i>Danio rerio</i>	4,85-48,5	0,1	24 h	115	No	No	Distancia recorrida	Glazer et al., 2018
<i>Danio rerio</i>	40-5000	0,1	No	6h	No	No	Agitación cola rotación	Tanaka et al., 2018

Todos estos estudios delatan una gran disparidad en cuanto a las concentraciones y los tipos de efectos observados. Estos resultados tan contradictorios vinieron a apoyar las conclusiones obtenidas a partir de estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con embriones de medaka en donde se cuestionó la efectividad y realismo ambiental de este tipo de exposiciones de PBDE, y en particular del BDE-47, a través del agua debido a la práctica imposibilidad de mantenerlo en disolución (González-Doncel et al., 2014). De hecho, Lema et al. (2007) y Usenko et al. (2011) también acabaron por poner en duda la representatividad ambiental de esta ruta de exposición para PBDEs. Esta conclusión, originada por la baja solubilidad de los PBDE (González-Doncel et al., 2014), fomenta el uso de rutas de exposición alternativas más realistas cuando de lo que se trata es valorar efectos a lo largo del desarrollo temprano de peces. Por otro lado, las configuraciones experimentales tan restringidas para evaluar el comportamiento en esas etapas tempranas empleadas en las investigaciones citadas podrían limitar el verdadero potencial de la natación del pez al obviar sus capacidades innatas para nadar, adaptarse y "explorar" un entorno dinámico amplio sin la necesidad de recurrir a estímulos artificiales ambientalmente poco representativos.

Una posibilidad de exposiciones más realistas cuando, se trata de especies ovíparas como el pez cebra o el medaka, es la que puede darse a través de sedimentos contaminados sobre los que embriones y eleuteroembriones se desarrollan. Otra posible vía puede ser por medio de la transferencia materna procedente de una exposición a través de los parentales. Esta segunda aproximación será abordada en el Capítulo 6 para la valoración del movimiento en etapas inmediatas a la eclosión (i.e. eleuteroembriones) resultantes de parentales expuestos a BDE-47. En el caso de etapas post-eclosión más avanzadas, donde el individuo ya es capaz de capturar alimento, la exposición a través de la dieta contaminada con BDE-47 se puede aceptar como la ruta ambientalmente más lógica (Fraser et al., 2009). De hecho, existen diversos estudios en la literatura científica que emplean peces en etapas posteriores a

la eclosión en los que se han evaluado efectos tras exposiciones a BDE-47 a través de la dieta. Sin embargo, prácticamente ninguno de ellos consideró el comportamiento como posible parámetro indicador de efectos. Los datos experimentales y resultados en todos estos estudios delatan disparidades, por ejemplo en cuanto a los niveles reales de exposición al BDE-47 y su consiguiente bioacumulación, y a cómo el BDE-47 afecta el desarrollo y viabilidad del pez. Estas diferencias quizás se deban a la inconsistencia de los procedimientos experimentales entre otros aspectos (e.g., concentraciones de BDE-47, duración de las exposiciones, especie de pez y la etapa de desarrollo -edad-, y tipo de dieta como vehículo de exposición del BDE-47). Destaca así el hecho de que parte de estos estudios ha recurrido a la “encapsulación” de BDE-47 en *Artemia salina* suministrada como dieta (Muirhead et al., 2006; Lema et al., 2008; van de Merwe et al., 2011; Deane et al., 2014) mientras que otros -donde se incluyen nuestros experimentos- han expuesto peces al BDE-47 mediante la contaminación de copos o granulados (Tomy et al., 2004; Chen et al., 2010; Chou et al., 2010; Torres et al., 2013). La Tabla 5.5 muestra las condiciones experimentales, dosis reales estimadas y bioacumulación de BDE-47 -en caso de estar disponible esa información-, además de parámetros de estudio de los trabajos publicados referentes al uso de *Artemia salina* o alimento comercial como vías alternativas de exposición de peces a BDE-47. Los datos revelan cómo ambas estrategias ofrecen diferencias experimentales muy importantes en cuanto a las dosis reales de BDE-47. Muirhead et al. (2006), fueron los primeros en diseñar el método de exposición con *Artemia salina*. A este trabajo le siguió una serie de estudios con diferentes objetivos en cuanto a la relevancia ecotoxicológica del BDE-47 en modelos experimentales de peces, principalmente el cebra (i.e. Lema et al., 2008; van de Merwe et al., 2011; Deane et al., 2014).

Tabla 5.5. Trabajos experimentales publicados sobre los efectos del BDE-47 en peces tras exposiciones a través de la dieta. La tabla ha dividido los trabajos en dos grupos de acuerdo con las dos estrategias de exposición empleadas más comunes: el primer grupo mediante la contaminación de artemia y el segundo grupo mediante la contaminación de alimento comercial.

Especie	Dosis diaria estimada (μg BDE-47/g pez)	Duración (días)	Bioacumulación ($\mu\text{g/g}$ pez)	Bioacumulación ($\mu\text{g/g}$ lw pez)	Ruta dietaria	Parámetro de estudio	Referencia
<i>Pimephales promelas</i>	2,9 - 7,2 M- H	25	15- 650 M-H	2,37(a las 36h)	Artemia salina	Toxicocinética, reproducción (esperma)	Muirhead <i>et al.</i> , 2006
<i>Pimephales promelas</i>	0,24-0,59 M-H 12,3 - 3,08 M-H	21	11,43-20,07 M-H 64,42-107,6 M-H	nd	Artemia salina	Señalización hormona tiro (pituitaria y cerebral)	Lema <i>et al.</i> , 2008
<i>Oryzias melastigma</i>	3,25**	18	76-61 M-H 0,025*	1434-1109 M-H	Artemia salina	Transferencia materna	van de Merwe <i>et al.</i> , 2011
<i>Oryzias melastigma</i>	0,6 1,13	21	nd	576-603 M-H 1575-2516 M-H	Artemia salina	Apoptosis Expresion de proteínas	Deane <i>et al.</i> , 2014
<i>Pimephales promelas</i>	4,12-10-31 M-H**	8	0,0053*	nd	Artemia salina	Transferencia materna	Thornton <i>et al.</i> , 2018
Especie	Conc en dieta (ng BDE-47/g comida)	Duración (días)	Bioacumulación ($\mu\text{g/g}$ pez)	Bioacumulación ($\mu\text{g/g}$ lw pez)	Ruta dietaria	Parámetro de estudio	Referencia
<i>Danio rerio</i>	690 3590 17800	120	nd nd nd	5,53-6,208 M-H 34-27,2 M-H 129-119 M-H	Copos	Perdida de peso-Disrupción Tiroides	Torres <i>et al.</i> , 2013
<i>Danio rerio</i>	74,9	40	0,069	0,369	Copos	CYP1A1 mRNA transcripcion desarrollo	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Danio rerio</i>	12,46 81,28 643,6	69	0,0027 0,032 0,409	0,0112 0,18904 1,92416	Copos	Comportamiento básico natación	Chou <i>et al.</i> , 2010
<i>Oryzias latipes</i>	10,6 92,9 1015,8	40	0,048 0,23 0,636	2,3 10,9 30,3	Copos	Comportamiento básico natación	Gonzalez-Doncel <i>et al.</i> , 2016
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	32-280	40	0,10-0,97	0,31-3,1	Copos	Sistema Inmunitario	Arkoos <i>et al.</i> , 2015
<i>Danio rerio</i>	17000	20	3,8- 75 M-H***	nd	Copos	Metabolismo; distribución; transferencia materna	Wen <i>et al.</i> , 2015

Datos calculados según información obtenida de edades y pesos estimados de los individuos.

M: machos; H: Hembras.

n.d.: no hay datos disponibles.

* ug/huevos fecundados.

** Dosis a parentales.

*** Valores de concentración en hígado.

De acuerdo con las estimaciones realizadas, las cantidades de BDE-47 diarias por gramo de pez en estos estudios contrastan enormemente con las administradas en nuestro diseño experimental empleando la mezcla de espirulina y copos donde las dosis oscilaron entre 0.0015 (para 10 ng de BDE-47/g) hasta 0.15 $\mu\text{g/g}$ de pez/día (para 1000 ng de BDE-47) (Tabla 5.5). Nos encontramos con que las dosis diarias reales de BDE-47 mediante encapsulación en *Artemia salina* resultaron ser mucho más altas que la dosis mayor diaria considerada en nuestros estudios. Si estas dosis diarias las extendemos a los días/semanas de duración de las exposiciones, las diferencias se incrementan como así lo demuestran los resultados de la analítica de bioacumulación de BDE-47 en los diferentes estudios donde se abordó este parámetro (Muirhead et al., 2006; Lema et al., 2008; van de Merwe et al., 2011) (Tabla 5.5). En general, los datos de bioacumulación referentes a los peces expuestos a BDE-47 por medio de *A. salina* revelaron unos niveles de BDE-47 varios ordenes de magnitud superiores a los analizados en nuestros experimentos tras las distintas dosis (i.e., 0,048, 0,230 y 0,636 ng BDE-47/g de pez para las dietas de 10, 100 y 1000 ng/g de comida, respetivamente). Hay que destacar también que el método de encapsulación de BDE-47 descrito originalmente por Muirhead et al. (2006) aparentemente impide obtener concentraciones consistentes de BDE-47 en los diferentes lotes de *A. salina*, dificultando la reproducibilidad de los experimentos. Como resultado, la dosis administrada corre el riesgo de depender estrictamente de la concentración de BDE-47 obtenida de un lote concreto de *A. salina*. De hecho, Ye et al. (2012) observaron variaciones de hasta el 60% en cuanto al BDE-47 “encapsulado” en diferentes lotes *Artemia* contaminados a una sola concentración.

Como vía de exposición alternativa a la dosificación del BDE-47 con *A. salina* está la de la contaminación de copos o granulados (Tomy et al., 2004; Chen et al., 2010; Chou et al., 2010; Torres et al., 2013) (Tabla 5.5). En este caso, y teniendo en cuenta las diferencias en cuanto a la duración y las dosis de BDE-47 administradas diariamente,

los niveles de bioacumulación de BDE-47 en los medakas de nuestros estudios mostraron valores dentro de los mismos órdenes de magnitud con respecto a los observados en estos trabajos con copos o granulados como vía de exposición al BDE-47. No obstante, esos valores resultaron ser, por lo general, más bajos que los encontrados en los medakas de nuestros experimentos. Estas diferencias, mucho menores si las comparamos con las observadas en los estudios empleando A. salina como vehículo, podrían justificarse como resultado de variaciones en cuanto a los regímenes de alimentación, diferencias en la eficiencia de la acumulación entre especies además de variaciones en el contenido de lípidos entre y dentro de la misma especie en función de la fisiología y condiciones de cultivo.

Considerando las propiedades neurotóxicas del BDE-47, y a la vista de los estudios sobre la respuesta neuroconductual en etapas embrionarias y pos-embrionarias tras exposiciones acuosas a BDE-47, sorprendía que ninguno de los estudios que empleaba la dieta como vehículo de exposición hubiera recurrido a parámetros de respuesta relacionados con el comportamiento. Cabe mencionar únicamente el trabajo de Chou et al. (2010), con cebras empleando copos como vía de exposición donde las dosis de BDE-47 seleccionadas se encontraban dentro del rango de las concentraciones empleadas en nuestros experimentos (Tabla 5.5). Tras un periodo de exposición desde los 21 dde hasta los 90, dde evaluaron el comportamiento en placas de 6 pocillos con 10 ml de agua recurriendo a la distancia total recorrida y el porcentaje de actividad como parámetros críticos de respuesta. De acuerdo con sus resultados, los valores de ambos parámetros fueron significativamente más bajos en el grupo correspondiente a la dosis mayor (i.e., 644 ng/g de BDE-47) que en el grupo control -sin solvente-. Sin embargo, no observaron diferencias significativas con relación al que debería ser el grupo de referencia, es decir, el grupo de control con disolvente. Por otro lado, distancia total vs. porcentaje de tiempo, son dos parámetros de respuesta matemáticamente dependientes con lo que los consiguientes resultados conductuales

analizados por Chou et al. (2010) no deberían ser suficientes para alcanzar resultados concluyentes. Si bien esta investigación analizó la bioacumulación de BDE-47 solo al final de los tratamientos, los niveles encontrados fueron comparables con los observados en nuestros estudios con medaka, teniendo en cuenta las diferencias intrínsecas entre las especies empleadas, las condiciones experimentales generales, y las duraciones de los experimentos.

Nos planteamos el grado de representatividad ambiental que podrían tener los niveles de BDE-47 bioacumulados en los medakas de nuestros estudios. La Tabla 5.6 comprendía concentraciones de BDE-47 encontradas en diferentes especies de peces muestreados en diferentes ecosistemas donde se ha podido apreciar una presencia de PBDE. Los valores vienen representados en unidades por contenido medio de lípidos. Con fines comparativos, se cuantificó el contenido lipídico (lw. Lipid weight) en medakas de edades comprendidas entre las de nuestros experimentos para obtener un promedio de $2.1 \pm 0.41\%$ (expresado como media \pm SEM). Con este dato calculamos las concentraciones de BDE-47 bioacumuladas por gramo de contenido lipídico en los medakas a los 40 días, resultando en $2,3 \pm 0,53$; $10,9 \pm 3,00$ y $30,3 \pm 0,85$ $\mu\text{g BDE-47/g lw}$ (Tabla 5.5). Desde una perspectiva de la evaluación del riesgo ambiental, estos datos junto con la información de las Tablas 5.4 y 5.5, ponen de manifiesto cómo los niveles de bioacumulación tras exposiciones a través de una dieta en forma de copos o granulados, y muy especialmente los obtenidos tras exposiciones a BDE-47 mediante *Artemia salina*, dan lugar a escenarios que no sugieren que los niveles de bioacumulación analizados en medios naturales resulten en un factor preocupante de riesgo ambiental. Conviene incidir nuevamente en la dificultad de alcanzar resultados concluyentes a partir de los estudios disponibles hasta la fecha con modelos in vivo de peces, y que viene a poner nuevamente en cuestión el verdadero riesgo que las concentraciones ambientales de esta sustancia que pueden representar para la salud y viabilidad de los peces de un ecosistema.

Tabla 5.6. Datos disponibles en la literatura sobre la bioacumulación de BDE-47 en peces procedentes de entornos naturales con presencia de BDE-47 y de otros PBDEs. El dato de bioacumulación indicado corresponde al valor máximo obtenido en el estudio. En negrita se indica aquella especie que mostraba los valores más altos de bioacumulación encontrados en el estudio.

Especies	Bioacumulación BDE47(µg/g pez)	BioacumulaciónBDE47(µg/g lw pez)	Localización	Referencia
<i>Mugil cephalus</i> , Flounder, Ray mullet ,Horse mackerel, Red sea bream, Sea bass, Yellowtail		0,038	Mar epicontinental Seto. Japón	Akutsu <i>et al.</i> , 2001
<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> , <i>Morone saxatilis</i> , <i>Morone chrysops</i> , <i>Pilodictus olivaris</i>		47,9 *	Cuencas hidrográficas del estado de Virginia. EEUU.	Hale <i>et al.</i> , 2001
Boreogadus saida , <i>Myoxocephalus scorpius</i> , , <i>Anarhichas minor</i> , <i>Amblyraja radiata</i>		0,2745	Igaliko, Narsaq, Qaqortoq. Groenlandia	Christensen <i>et al.</i> , 2002
Bass , Carpa		0,163	Río Detroit, Michigan. EE.UU.	Rice <i>et al.</i> , 2002
Fletán , <i>Atherinopsis californiensis</i> , <i>Hyperprosopon argenteum</i> , <i>Cymatogaster aggregata</i> , <i>Genyonemus lineatus</i> , <i>Morone saxatilis</i> , <i>Triakis semifasciata</i>		1,3	Bahía de San Francisco EE.UU.	Lunder y Sharp, 2003
<i>Micropterus dolmieui</i> , <i>Catostomus commersoni</i> , <i>Anguila rostrata</i>		6,5	Río Penobscot, Maine . EEUU	Anderson y MacRae, 2006
Trucha de lago	0,228		Lago Superior Lago Hurón, Lago Michigan, Lago Ontario, EEUU.	Carlson y Swackhamer, 2006
Alburnus alburnus , <i>Barbus graellsii</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius aurata</i> , <i>Scardinius</i> , <i>Alburnus alburnus</i>	0,219 **		Cuenca del Río Ebro. España	Lacorte <i>et al.</i> , 2006
"Bluefish", Salmón, Salmón de piscifactoría	0,038		Mercados de Maryland Washinton DC y Norte de Carolina. EEUU.	Hayward <i>et al.</i> , 2007
Anguila , Salmón piscifactoria , <i>Anguila piscifactoria</i> , Caballa, Lenguado, Arenque		0,36	Mar del Norte, Canales de agua. Holanda	van Leeuwen y Boer, 2008
Lota , Trucha		45,144 *	Lago Mjøsa, Lillehammer. Noruega	Mariussen <i>et al.</i> , 2008
Anguila anguila , <i>Perca fluviatilis</i> , <i>Rutilus rutilus</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Abramis brama</i> ; <i>Carassius auratus gibelio</i> , <i>Pseudosbora parva</i> , <i>Tinca tinca</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Scardinius erythrophthamaltus</i>		2,2	Río Scheldt, Oudenaarde. Oeste de Bruselas	Roosens <i>et al.</i> , 2008
<i>Coregonus hoyi</i> , <i>Myoxocephalus tompsonii</i>		0,254	Lago Michigan. EEUU.	Hahm <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>		1,24	Sistema de bahías de Massachusetts y Cape Cod. EEUU.	Montie <i>et al.</i> , 2010
<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Luciobarbus graellsii</i> , <i>Silurus glanis</i> , <i>Barbus graellsii</i> , <i>Mycropterus salmpoides</i> , <i>Alburus alburus</i> , <i>Anguila anguila</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Gobio lonzanoi</i> , <i>Luciobarbus sclateri</i>		0,115 0,0468 0,0146 0,00794 ***	Rios Ilobregat, Ebro, Jucar, Guadalquivir. España	Santín <i>et al.</i> , 2013
Notothenia coriiceps , <i>Trematomus newnesi</i> , <i>Notothenia rossii</i>		0,0736	Bahías de la Isla King George elsla Nelson. Antártida	Lana <i>et al.</i> , 2014
Anguila , Lenguado		0,0467 *	Bahía de Alemania, Río Elbe , Alemania	Sühring <i>et al.</i> , 2016
Arenque , Lubina, Espadín, Caballa, Mujol,Sardina ,Rodaballo		0,02085	Aguas costeras Reino Unido, Mar de Irlanda,Costa oeste de Francia, Bizkaya y Algarve	Zhuhua <i>et al.</i> , 2018

* Se refiere al grupo de congéneres de PBDEs analizados en ese estudio.

** Peso seco

*** Valor en cada río

Dentro de este marco de evaluación del riesgo, sería oportuno desarrollar estrategias y métodos robustos ambientalmente representativos, que permitieran una evaluación del comportamiento de los peces como base para su implementación dentro de los ensayos ecotoxicológicos estandarizados actuales. Si bien los estudios actuales más aceptados, que como hemos visto evalúan diferentes parámetros del comportamiento de peces en condiciones estáticas, ofrecen indudables ventajas como la facilidad y la reproducibilidad experimental, hacen que factores como los espacios tan limitados para el movimiento y los estímulos externos aplicados puedan poner en cuestión el verdadero significado y la representatividad ambiental de dichos datos. Los túneles de natación pueden ofrecer, por otro lado, un alto grado de funcionalidad y significado gracias a un entorno dinámico y más realista desde una perspectiva ambiental al ofrecer al pez la oportunidad de optar, de un modo más natural, por diferentes estrategias de natación para hacer frente a un flujo de agua. Este trabajo también ha demostrado, cómo estas estrategias se pueden traducir en patrones de movimiento específicos en dos etapas del crecimiento del medaka bien diferenciadas.

Objetivo 4

EFFECTOS EN LA NATACIÓN DE ELEUTEROEMBRIONES DE MEDAKA POR TRANSFERENCIA MATERNA DE BDE-47



El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a la publicación “Bioaccumulation, maternal transfer and effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure on medaka fish (*Oryzias latipes*) offspring”. Aquatic Toxicology. 2017 192, 241-250. ANEXO IV

EFFECTOS EN LA NATACIÓN DE ELEUTEROEMBRIONES DE MEDAKA POR TRANSFERENCIA MATERNA DE BDE-47

Introducción

El Capítulo 5 abordó la exposición al BDE-47 a lo largo de las etapas posteriores a la eclosión del medaka recurriendo a la dieta como vía de exposición ambientalmente realista. Los estudios del comportamiento empleando el túnel diseñado y validado de acuerdo con los Capítulos 3 y 4 no apreciaron variaciones conductuales significativas como resultado de estas exposiciones, independientemente de que los peces mostraran una acumulación eficiente de BDE-47 a lo largo del periodo experimental de 40 días.

La lipofilia del BDE-47 y en general de los todos PBDEs, facilita su transferencia a través de las membranas biológicas, bioacumulándose de un modo eficiente en tejidos adiposos con un alto contenido lipídico (US EPA, 2008). Esta bioacumulación es el resultado de un equilibrio entre la capacidad del pez para asimilar, metabolizar y excretar el BDE-47 (Newman y Unger, 2003). En el caso de la hembra en época reproductiva, existe la variable añadida de la translocación hacia los huevos. De hecho, el contenido lipídico del saco vitelino puede comportarse como un sumidero de la madre de compuestos lipófilos (Miller *et al.*, 1993, Zhang *et al.*, 2010; Freese *et al.*, 2017). Por lo tanto, sería posible que esta vía de exposición indirecta tuviera efectos sobre el desarrollo de las etapas iniciales de la vida del pez (Darnerud, 2003). Por lo tanto, cualquier información relacionada con las consecuencias de la exposición embrionaria a BDE-47, y de otros CE con características químicas similares, por medio de una transferencia materna podría ser útil desde una perspectiva ambiental de su evaluación del riesgo, considerando que es un escenario de exposición realista y que esas etapas tan tempranas de la vida pueden ser especialmente vulnerables.

En el momento de proponer una nueva estrategia experimental, encontramos pocos estudios ecotoxicológicos con peces en los que se evaluase la toxicocinética de BDE-47 a través de la dieta (Stapleton *et al.*, 2004; Muirhead *et al.*, 2006; Tomy *et al.*,

2004) y su transferencia materna (van de Merwe *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2015). Sin embargo, no se hacía mención sobre si esta transferencia materna podría provocar efectos en la descendencia una vez se trasladaba desde la hembra al embrión durante la ovogénesis. Así pues, recurriendo al mismo enfoque experimental que en el Capítulo 5, propusimos como una vía de exposición alternativa y ambientalmente más realista que las exposiciones empleando el medio acuoso, la ruta de exposición en dieta de medakas adultos en condiciones reproductivas, con el objeto de evaluar la transferencia materna de BDE-47 y sus efectos sobre la natación forzada de los eleuteroembriones resultantes

Materiales y métodos

Reactivos y preparación de dietas con BDE-47

Los reactivos y la preparación de dietas empleadas en este estudio se realizó según lo descrito en el Capítulo 5. Tomando como referencia los resultados de ese capítulo relacionados con la bioacumulación de BDE-47 y los estudios cinemáticos en las dos etapas del crecimiento del medaka, se seleccionó una única concentración, de BDE-47 ,1000 ng/g. Se emplearon dos dietas (tamaño de partícula $\leq 620 \mu\text{m}$): dieta control disolvente (*n*-hexano) y dieta fortificada (1000 ng/g de BDE-47). Diferentes porciones de estas dietas se transfirieron a tubos Eppendorf en las cantidades adecuadas para la alimentación diaria de acuerdo con el peso de los peces y posteriormente almacenarlas a -20 °C.

Exposición de parentales a BDE-47

Para el desarrollo del procedimiento experimental descrito en este capítulo se obtuvieron medakas sexualmente maduros de 165 dde ,procedentes de la colonia reproductora de medakas del laboratorio. Los peces, con una masa media de $0,49 \pm 0,08$ g (expresada como la media \pm SD), se distribuyeron aleatoriamente en grupos de entre 5 y 15 peces en una relación de 2 machos por cada 3 hembras en acuarios de 8 L de capacidad dentro del circuito de flujo continuo descrito los experimentos del Capítulo 5. Se establecieron dos grupos experimentales de acuarios en cuadruplicado (Fig 6.1): el primer grupo, designado como el grupo Control disolvente "0b", consistió en los acuarios de peces alimentados con la dieta control disolvente (*n*-hexano). El segundo grupo experimental "1000", que contenía los peces alimentados con la dieta de 1000 ng/g de BDE-47.

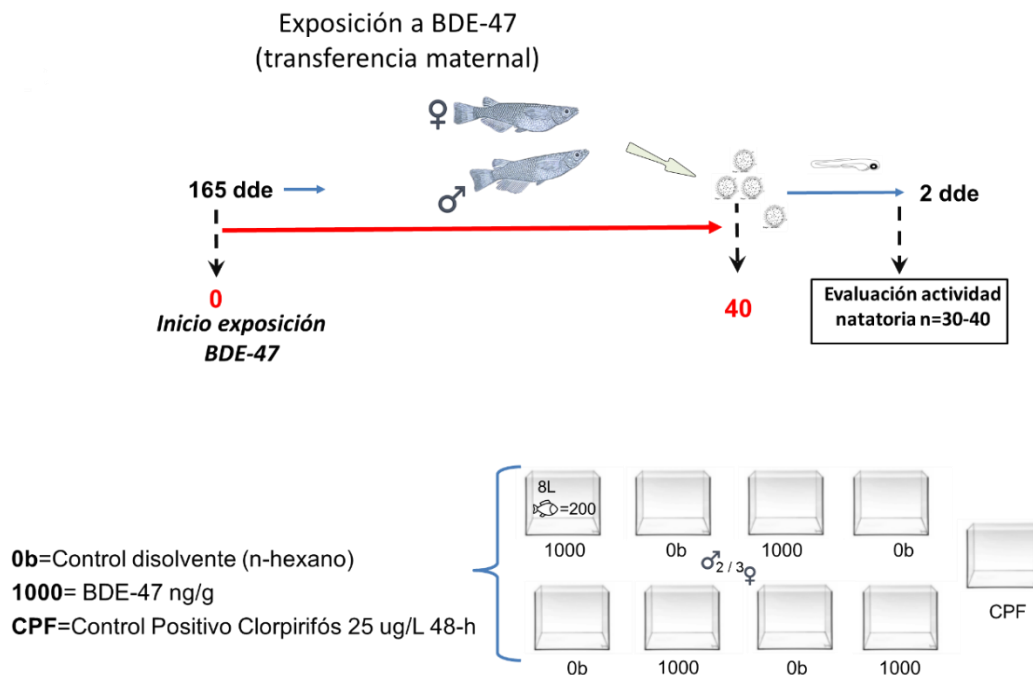


Figura 6.1 Diseño experimental de las exposiciones a BDE-47 de eleuterioembriones mediante transferencia materna. La valoración de la actividad natatoria forzada se llevó a cabo en eleuterioembriones de 2 dde procedentes de huevos fecundados al final del diseño experimental.

Transferencia materna

La duración de los experimentos se estableció en 40 días a lo largo de los cuales los peces se alimentaron diariamente usando alimentadores automáticos que administraban la correspondiente dosis diaria de comida (5% bw) complementada con *Artemia salina* (*Instar I*) al menos tres veces por semana. Las dosis diarias de dieta se ajustaron cada 10 días de acuerdo con los pesos de los peces registrados a lo largo de los correspondientes días de muestreo (González-Doncel *et al.* 2017). La calidad del agua se controló cada 10-15 días en acuarios seleccionados aleatoriamente. La temperatura media fue de 24-26°C, El pH fue de $7,8 \pm 1,6$, la concentración de oxígeno se mantuvo a $7,59 \pm 0,82$ mg/L y la conductividad estuvo en $116,2 \pm 4,02$ μ S/cm.

Cuantificación de BDE-47 en parentales y eleuteroembriones

El Capítulo 5 describe la metodología y los resultados referentes a la cuantificación del BDE-47 (1000 ng/g) en la dieta. Al alcanzar el día 40 del procedimiento experimental, el BDE-47 bioacumulado en los peces se analizó en un macho y una hembra de cada uno de los cuatro acuarios procedentes del grupo experimental "1000". Para ello, los peces recibieron una sobredosis de metanosulfonato de triclaína (200 μ g/ml, Argent Laboratories, Redmond, WA, EE. UU.). Tras eliminar el exceso de agua adherida se pesaron y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml, y se congelaron inmediatamente a -20 °C para la posterior cuantificación de BDE -47.

La transferencia materna de BDE-47 se evaluó en eleuteroembriones procedentes de madres dentro del grupo experimental "1000". Con este fin, aproximadamente 3 horas después del comienzo del ciclo de luz diurna del día 40, se recolectaron grupos de huevos que se lavaron e individualizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Capítulo 4. Los grupos (n= 30-40) de embriones procedentes de hembras de cada uno de los cuatro acuarios se transfirieron en subgrupos de 10 a placas de 6 pocillos con 5 ml de medio de cultivo embrionario *RM*, Rugh, 1962) y se incubaron (25 ± 1 °C; 15 luz: 9 oscuridad) en los que se aplicaron

renovaciones diarias del medio. Los eleuteroembriones resultantes de ≤ 1 dde de cada acuario recibieron una sobredosis de metanosulfonato de triclaína se transfirieron a tubos Eppendorf en sus cuatro grupos de 30 por cada uno de los 4 acuarios del "0b" y de "1000", se pesaron y se congelaron a -20 °C para la posterior cuantificación de BDE-47. El análisis de BDE-47 en las muestras de los peces se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 5.

Obtención, procesamiento y análisis estadístico de datos cinemáticos

La actividad natatoria (i.e. distancias relativas medias y tiempos de presencia en cada elemento de la arena) se evaluó en eleuteroembriones de 2 dde procedentes de parentales expuestos a BDE-47 así como en el grupo control disolvente (n-hexano) y un grupo control conductual positivo de CPF. La longitud del espacio de natación disponible fue de 150 mm y la velocidad del agua a través del canal se fijó en los 3,2 cm/s de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 3.

Los eleuteroembriones se obtuvieron de huevos recolectados los días 39, 40 y 41 de los cuatro acuarios con los grupos experimentales "0b" y "1000". Se incubaron en placas de 6 pocillos hasta su eclosión según los métodos descritos anteriormente. Una vez eclosionados, se mantuvieron en las placas con renovaciones diarias del medio hasta alcanzar los 2 dde para, evaluándose la actividad natatoria de 30-40 peces por tratamiento a lo largo de tres días consecutivos (Figura 6.1).

Con el objeto de tener una referencia en tiempo real de la validez del método de evaluación del comportamiento, se incluyó, al igual que en el Capítulo 5, un control conductual positivo empleando CPF. El movimiento se evaluó en una muestra de eleuteroembriones de 2 dde ($n = 30-40$) procedentes de huevos recolectados a lo largo de los tres días de las hembras de los cuatro acuarios del grupo "0b". Posteriormente fueron incubados durante 48h con CPF (25 ng/ml) desde del momento de la eclosión (0

dde). La exposición a CPF se realizó según el procedimiento descrito en el Capítulo 4. Esta concentración de CPF se seleccionó de acuerdo con los resultados de la validación del sistema dinámico y de los datos publicados en otros estudios ecotoxicológicos con esta sustancia en peces (Levin *et al.*, 2004; Macaulay *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2013).

El tiempo total de grabación I de la actividad natatoria de los eleuteroembriones de 2 dde del grupo control disolvente (0b) y del expuesto a BDE-47 (1000), junto con el grupo control conductual positivo (CPF), fue de unos 540-720 min [30-40 peces/tratamiento x 6 min x 3 tratamientos = 9-12 horas]. Por lo tanto, de acuerdo con la estrategia del Capítulo 5, los tiempos de registro de la natación se dividieron tres días consecutivos; *i.e.*, entre el día 39 y el 41 del procedimiento experimental. Siguiendo esta estrategia se grabaron diariamente entre 10 y 13 eleuteroembriones de cada uno de los dos grupos experimentales y del grupo conductual positivo. El análisis del comportamiento de los peces (*i.e.* mapas de gradiente y de residencia) y el tratamiento de datos se hizo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4.

Resultados

Cuantificación de BDE-47 en parentales y eleuteroembriones

La concentración de BDE-47 analizada en machos, hembras y eleuteroembriones de 0 dde tras los 40 días de exposición a 1000 ng/g de BDE-47 en la dieta se muestran en la Fig. 6.2. El BDE-47 acumulado en machos resultó ser mayor que en hembras (*i.e.*, $70,54 \pm 4,82$ y $58,47 \pm 3,35$ ng de BDE-47/g de pez en ww, valores expresados como media \pm SEM-, respectivamente). Las concentraciones de BDE-47 analizadas en los eleuteroembriones de ≤ 0 dde alcanzaron un valor medio de $558,13 \pm 51,18$ ng de BDE-47/g de pez ww.

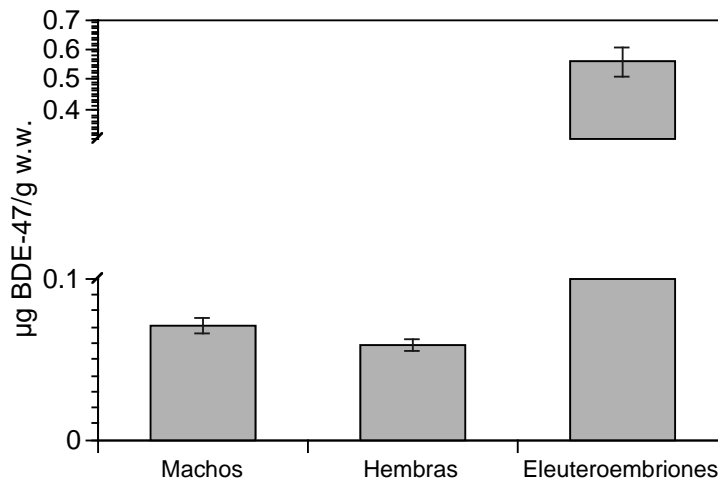


Figura 6.2. Bioacumulación de BDE-47 en medakas parentales y eleuteroembriones de ≤ 1 dde tras 40 días de exposición de los parentales a una dieta fortificada con 1000 ng/g de BDE-47. Para los parentales los valores representan la media (\pm SEM) de cuatro peces ($n = 4$). El valor de los eleuteroembriones representa a media (\pm SEM) de tres grupos de eleuteroembriones; cada grupo se recolectó de tres hembras individuales por acuario ($n = 12$).

Distancias relativas recorridas

Las distancias relativas medias recorridas por los eleuteroembriones de 2 dde procedentes del grupo de parentales “0b” (*n*-hexano) y “1000” se muestran en la Fig. 6.3. Ambos grupos mostraron distancias parecidas. Las distancias relativas recorridas por los eleuteroembriones de 2 dde previamente expuestos CPF resultaron comparativamente menores que las recorridas por los peces del “0b” ($P < 0.05$).

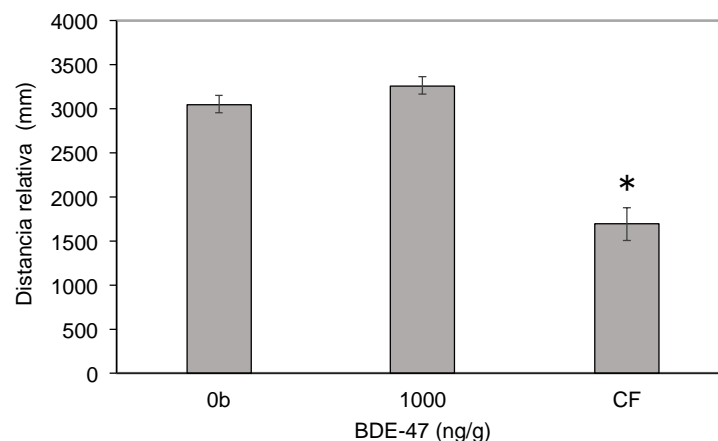


Figura 6.3. Distancias relativas recorridas por los eleuteroembriones de 2 dde. Los valores “0b” y “1000” corresponden a individuos procedentes de grupos de parentales alimentados con la dieta control disolvente (*n*-hexano) y con la dieta fortificada con BDE-47, respectivamente. El valor “CPF” corresponde a eleuteroembriones expuestos a CPF durante 48 h, procedentes de huevos del grupo 0b. Un asterisco (*) indica diferencias significativas respecto al grupo control disolvente 0b ($P < 0.05$). Los valores representan la media (\pm SEM.) de $n=30-40$ peces por tratamiento.

Mapas de gradiente

La actividad natatoria de los eleuteroembriones de 2 dde procedente del grupo de parentales “0b” (n-hexano) y “1000” se ha representado de la Figura 6.4 en forma de mapas de gradiente bidimensionales originados mediante un enfoque geoestadístico a partir de los videos de 6 min recurriendo a las respectivas matrices de datos de valores de porcentaje de presencia dentro de los 300 elementos de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo 4. Se estableció una escala de gradiente para el tiempo de presencia que osciló entre el 0,1% y el 8,6% del tiempo total de grabación con incrementos de 0,1%.

Los peces del grupo control mostraron un patrón posicional de la natación hacia la región central de la entrada del agua en el canal (Figura.6.4, mapa 0b). Los valores de presencia en esta zona oscilaron entre el 3,4% y el 8,6% del tiempo total de la grabación. El mapa de gradiente también reveló una tendencia de estos peces a nadar, o posicionarse, cerca de la zona de salida del agua, corriente abajo. Sin embargo, los valores de presencia no superaban el 1,8% del tiempo total, sugiriendo la incapacidad de los peces de mantener una posición más arriba en el túnel. La región central de la arena mostró los tiempos de presencia más bajos (<0.2%). Un vistazo al mapa de gradiente originado por los peces del grupo “1000” reveló un patrón muy semejante con respecto al grupo control. El mapa generado por los eleuteroembriones expuestos a CPF mostró un gradiente de posicionamiento en la arena con preferencia hacia región próxima a la salida del agua (valores de porcentaje de tiempo de presencia menor o igual al 1,8%; (Figura. 6.4, mapa CPF). En demás regiones los valores de tiempo de presencia fueron generalmente <1%. El mapa por lo tanto sugiere la incapacidad de estos eleuteroembriones de mantener una posición estable corriente arriba como lo logran los demás grupos, lo que indica un patrón de natación diferencial.

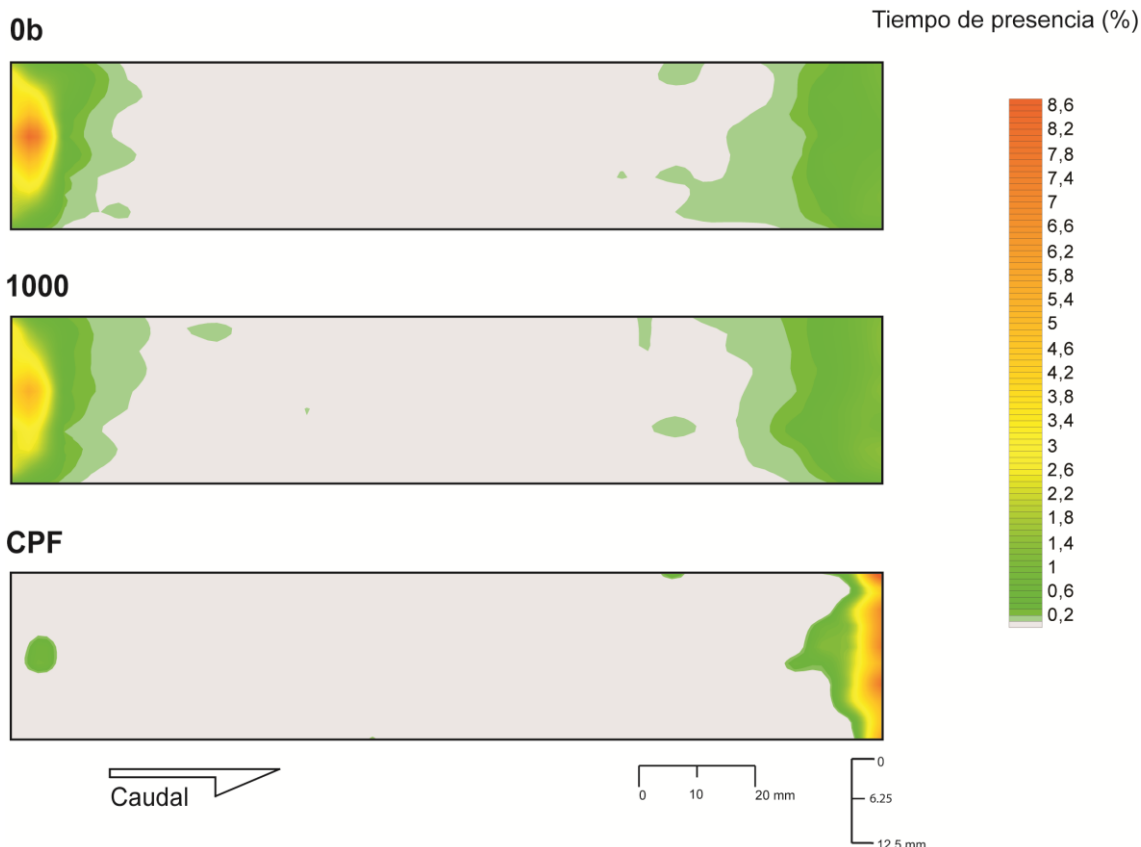


Figura 6.4. Mapas de gradiente de eleuteroembriones de 2 dde procedentes de parentales expuestos a BDE-47 a través de la dieta durante 40 días. Los mapas “0b” y “1000” corresponden a individuos procedentes de grupos de parentales alimentados con la dieta control disolvente (*n*-hexano) y con la dieta fortificada con BDE-47, respectivamente. El mapa “CPF” corresponde a eleuteroembriones expuestos a CPF durante 48 h procedentes de huevos del grupo 0b. Las zonas coloreadas muestran el porcentaje medio de tiempo de presencia de un total de 30-40 peces por tratamiento, correspondiendo los valores más altos a los colores más cálidos.

Áreas de residencia

Los mapas de residencia permitieron la comparación numérica tomando como referencia el grupo control (*i.e.*, control disolvente *n*-hexano). La comparación estadística de los tiempos de residencia en las 15 áreas correspondientes entre los eleuteroembriones procedentes de los parentales dentro del grupo control disolvente (*n*-hexano) y los del grupo tratado con BDE-47 no reveló diferencias significativas (Figura. 6.5 mapa 0b vs. mapa 1000). Estos resultados, en combinación con los mapas de gradiente, sugieren la existencia de patrones de natación comparables entre los dos grupos.

Transferencia materna

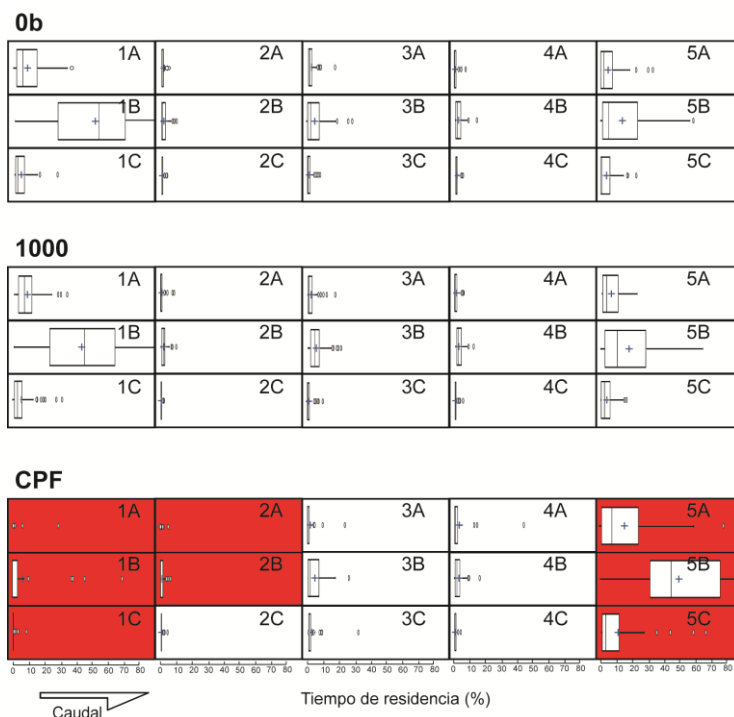


Figura 6.5. Representación de los mapas de áreas de residencia de eleuteroembriones de 2 dde procedentes de e parentales expuestos a BDE-47 a través de la dieta durante 40 días. Los mapas “0b” y “1000” corresponden a individuos procedentes de grupos de parentales alimentados con la dieta control disolvente (n-hexano) y con la dieta fortificada con BDE-47, respectivamente. El mapa “CPF” corresponde a eleuteroembriones expuestos a CPF durante 48 h procedentes de huevos del grupo 0b. Las cajas y bigotes, insertadas horizontalmente dentro de cada área, muestran la distribución estadística de los datos de tiempo de residencia de los peces dentro de esa área. Los extremos de cada caja representan el valor del 25% (cuartil 1 ó Q1) y el 75% (Q3) de los datos. La mediana (Q2) viene representada por una línea vertical. El extremo de los “bigotes” representa 1,5 veces el rango inter-cuartil [$1,5 \times (Q3-Q1)$] desde los extremos de la caja (Q1 y Q3). Aquellos bigotes inferiores que originaban datos negativos se representaron como los valores mínimos de los datos obtenidos en esa área. Los valores más extremos de estos rangos están representados como puntos. Los valores de tiempo de residencia dentro de cada área y para cada tratamiento se compararon estadísticamente con los valores respectivos dentro grupo control disolvente “0b”, marcándose en color rojo aquellas áreas que presentaron diferencias significativas. El contraste de hipótesis se ajustó al valor $P < 0,05$. Los datos en cada área representan los tiempos de residencia obtenidos de 30-40 peces por tratamiento.

La comparación estadística entre las áreas correspondientes del control disolvente (n-hexano) y los eleuteroembriones expuestos a CPF mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), más específicamente en ocho áreas ubicadas principalmente en la zona superior de la arena y en menor número en la zona inferior. Estos datos apoyaron las diferencias visuales observadas en los correspondientes mapas de gradiente, y sugirieron la incapacidad de los eleuteroembriones expuestos a CPF de afrontar de algún modo la velocidad del agua de 3.2 cm/s.

Discusión

En el estudio anterior se observó ausencia de efectos significativos en el comportamiento de la natación forzada de los medakas expuestos a BDE-47 a través de la dieta a lo largo de los 40 días de duración de los tratamientos. Se concluyó que esta ausencia de efectos podría deberse a que las dosis de BDE-47 diarias administradas fueron comparativamente mucho más bajas que las observadas en otros estudios realizados con diseños experimentales similares pero con especies diferentes. En la presente investigación se recurrió a medakas reproductores y el mismo método de exposición considerando la concentración más alta de BDE-47 de las estudiadas en el anterior diseño experimental.

Los niveles de BDE-47 detectados en medakas hembras durante el período reproductivo fueron comparativamente más bajos que los observados en el diseño experimental previo (Capítulo 5) consistente en exposiciones a lo largo de la etapa de crecimiento con la misma concentración de de BDE-47 1000 ng/g dieta (i.e. 0,0585 µg/g en hembras reproductoras vs. 0,636 µg/g ww en peces durante su crecimiento, respectivamente). Estas variaciones podrían deberse, aparte de por las diferencias de edad, a las diferentes dosis diarias de alimento administradas en los dos diseños experimentales (i.e., 5% vs. 15% bw), el proceso de translocación materna del BDE-47 hacia los embriones y otras variables asociadas con el elevado coste energético que conlleva la reproducción en las hembras y que puede implicar tasas metabólicas muy diferentes. No obstante, los niveles de BDE-47 detectados en los medakas machos también fueron considerablemente más bajos que los analizados en la etapa de crecimiento. Por lo tanto, se podrían considerar otras variables responsables de estas diferencias como, por ejemplo, todas aquellas relacionadas con la movilización de lípidos destinadas a dar un sustento al proceso reproductivo junto con otras variables fisiológicas y experimentales como variabilidades en los perfiles de lípidos (e.g. tipos y sus porcentajes) relacionados con la edad de los peces, las diferentes densidades de

Transferencia materna

peces en los acuarios de exposición entre los dos diseños experimentales junto con la administración de *A. salina* como suplemento alimenticio en este último diseño experimental. Todas estas variables, aunque fuera del ámbito de los objetivos y la discusión de esta investigación, podrían contribuir a las diferencias observadas entre los dos experimentos en cuanto a la bioacumulación del BDE-47

Los niveles de BDE-47 detectados en los medakas hembras durante el período reproductivo fueron comparativamente más bajos que los observados en nuestro anterior diseño experimental (Capítulo 5) consistente en exposiciones a lo largo de la etapa de crecimiento con la misma concentración en la dieta de 1000 ng/g de BDE-47 (*i.e.* 0,0585 µg/g en hembras reproductoras vs. 0,636 µg/g ww. en peces durante su crecimiento, respectivamente). Estas variaciones podrían deberse, a diferencias de edad y dosis diarias de alimento entre los dos diseños experimentales (*i.e.*, 5% vs. 15% bw). Además, la translocación materna del BDE-47 junto con otras variables asociadas con el elevado coste energético que conlleva la reproducción en las hembras son factores adicionales que pueden contribuir a los diferentes niveles de bioacumulación observados entre los dos diseños experimentales. De hecho, las dos etapas de la vida consideradas (madurez vs. crecimiento) implican tasas metabólicas muy diferentes. No obstante, si consideramos los medakas machos adultos los niveles de BDE-47 detectados también fueron considerablemente más bajos que los analizados en medakas en la etapa de crecimiento del estudio anterior. Para justificar estas diferencias con los machos, podrían considerarse otras variables como, por ejemplo, todas aquellas relacionadas con la movilización de lípidos destinadas a dar un sustento al proceso de reproducción junto con otras variables fisiológicas y experimentales como variabilidades en los perfiles de lípidos (*e.g.* tipos y sus porcentajes) relacionados con la edad de los peces, las diferentes densidades de peces en los acuarios de exposición entre los dos diseños experimentales junto con la administración de *A. salina* como suplemento alimenticio en este último diseño experimental. Todas estas variables, aunque fuera del

ámbito de los objetivos y la discusión de esta investigación, podrían contribuir a las diferencias observadas entre los dos experimentos en cuanto a la bioacumulación del BDE-47.

Los niveles de BDE-47 detectados en los eleuteroembriones revelaron una relación de la concentración entre eleuteroembrión/hembra adulta de 9,5. Este valor sugirió una transferencia efectiva del BDE-47 desde la madre a los embriones. En el periodo de tiempo en el que se realizó el diseño experimental descrito en este capítulo, el número de trabajos publicados relacionados con la biomacumulación y transferencia del BDE-47 en peces era relativamente escaso. Nyholm et al. (2008) confirmaron una translocación de BFRs a huevos de cebra tras una exposición de 42 días de los parentales alimentados con una tasa del 2% bw consistente en quironómidos liofilizados y previamente contaminados con los BFRs. Estos autores, no facilitaban datos sobre los valores de los BFRs presentes en la dieta, lo que no permitió realizar ningún tipo de cálculo que permitiera estimar las cantidades de dosis reales de los BFRs administrados diariamente a los peces. Sin embargo, sí que facilitaron las relaciones de concentración entre huevo/hembra para todos los BFRs, con valores que variaron entre 0,26-7,3. Wen et al. (2015) determinaron una relación del 1,7 para BDE-47 entre huevo/hígado parental tras exposiciones de 20 días de parentales del cebr a una dieta de copos conteniendo 17 µg/g de BDE-47 (Tabla 5.5). La información relativa al peso de los parentales y la concentración real en la dieta permitió estimar una dosis diaria que estuvo en los 0,170 µg de BDE-47/g de pez. Este dato contrastaba con el calculado en nuestro diseño experimental, donde el uso de una dieta con 1000 ng/g de BDE-47 implicó dosis diarias de aproximadamente 0,0456 y 0,0573 µg de BDE-47/g de pez para las hembras y los machos, respectivamente, asumiendo que los dos sexos ingerían cantidades comparables del alimento.

Hasta donde pudimos encontrar en la literatura científica, este ha sido el primer diseño experimental enfocado a evaluar el comportamiento en forma de natación

Transferencia materna

forzada de peces en etapas inmediatas a la eclosión tras la exposición de los parentales a un BFR., y una vez comprobada la eficiencia de la transferencia materna del contaminante. De acuerdo con lo descrito en la discusión del Capítulo 5, los únicos estudios ecotoxicológicos orientados a valorar los efectos del BDE-47 sobre el comportamiento de peces en etapas tempranas, de eleuteroembrión o larva, consistían principalmente en exposiciones por vía acuosa (ver Tabla 5.4 del capítulo 5). De estos trabajos, los realizados por Chen et al. (2012) fueron los únicos en mostrar la existencia de efectos en el comportamiento motor de larvas de cebra de 5 dde tras exposiciones a BDE-47 estáticas (concentraciones nominales de 607-9700 µg/L no corroboradas). Comprobaron que la concentración nominal acuosa más alta estudiada resultó en unos niveles de bioacumulación en individuos de 4 dde de hasta 116 ng de BDE-47/huevo. Considerando un peso medio húmedo (ww) de 240 µg para el huevo del pez cebrá (Hagedorn et al., 1997; Petersen y Kristensen, 1998), la concentración de BDE-47 alcanzaría un valor aproximado de 483,333 expresado como µg de BDE-47/g de pez ww. Este valor se encuentra unos 80 órdenes de magnitud por encima de la concentración analizada en los eleuteroembriones de medaka de ≤ 0 dde de nuestro estudio (i.e. 0,558 µg de BDE-47/g ww). Conviene mencionar nuevamente el trabajo de Lema et al. (2007) en el que, aunque no realizaron estudios sobre el comportamiento, sí analizaron los niveles de BDE-47 acumulados larvas de cebrá tras exposiciones en agua de 96 h a 100, 500 ó 5000 µg/L y en condiciones semiestáticas. A pesar de no corroborar las concentraciones nominales en el agua, estos autores aportaron valores de bioacumulación en los peces que oscilaron entre 3,4 y 293 µg/g de pez ww, valores nuevamente muy superiores a los niveles detectados en los eleuteroembriones de medaka procedentes de la transferencia materna. Aunque no mencionaron valores que confirmasen la estabilidad o la bioacumulación del BDE-47, Zhao et al. (2013) observaron una baja actividad de larvas del cebrá tras exposiciones a 500 µg/L con renovaciones parciales del medio diarias.

Independientemente de lo discutible que pueda resultar la representatividad ambiental de los estudios resumidos en la Tabla 5.4 del Capítulo 5, los datos de bioacumulación del BDE-47 en eleuteroembriones y larvas resultantes de exposiciones vía acuosa, muestran siempre valores muy superiores a los obtenidos en nuestros eleuteroembriones de medaka por una exposición parental. Por lo tanto, cualquier tipo de efecto sobre el sistema neuromotor mostrado en esos trabajos podría ser cuestionado desde una perspectiva en cuanto a lo que debe suponer el riesgo ambiental del BDE-47.

Siguiendo el mismo patrón que en el Capítulo 5, al final del experimento se cuantificaron los contenidos lipídicos en submuestras de machos, hembras y eleuteroembriones de ≤ 2 dde, para obtener unos porcentajes del $4,38 \pm 1,3$, $3,48 \pm 0,52$ y $0,52 \pm 0,21$, respectivamente. Tomando como referencia estos datos, los correspondientes valores de bioacumulación de BDE-47 por gramo de contenido lipídico fueron de $1,61 \mu\text{g BDE-47/g lw}$ en machos, $1,68 \mu\text{g BDE-47/g lw}$ en hembras y de $107 \mu\text{g BDE-47/g lw}$ en los eleuteroembriones. La Tabla 5.6 del Capítulo 5 ponía de nuevo de manifiesto valores de bioacumulación de BDE-47 por contenido lipídico en peces procedentes de ambientes naturales generalmente más bajos que los valores estimados en nuestros estudios (con la excepción de lugares muy concretos en donde niveles de PBDEs detectados fueron anormalmente elevados). Estos datos indican por lo tanto, que los niveles de BDE-47 resultantes por transferencia materna en una posible progenie de esas especies naturales deberían ser inferiores a los detectados en los eleuteroembriones de medakas de nuestro estudio. Nuevamente, a la vista de los datos disponibles de niveles de exposición y bioacumulación, directa o por transferencia materna, en los diferentes diseños experimentales publicados hasta la fecha, parece cuestionable la existencia de un verdadero riesgo del BDE-47 para la salud de los ecosistemas acuáticos continentales teniendo en cuenta los valores de bioacumulación encontrados y estimados por transferencia materna en especies de entornos naturales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos tras desarrollar los objetivos propuestos, y de acuerdo con la hipótesis de trabajo planteada, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El canal y la metodología diseñada para evaluar la natación forzada han permitido visualizar las alternativas y estrategias que puede adoptar el pez medaka en diferentes etapas de su desarrollo frente a un caudal de agua. Los estudios de este trabajo de investigación han mostrado cómo estas estrategias de natación se pueden traducir en patrones de movimiento específicos permitiendo interpretar y evaluar la capacidad de natación.
2. Recurriendo a etapas tempranas del desarrollo del medaka y al CPF como sustancia con reconocidas propiedades neurotóxicas, se ha demostrado la validez y la sensibilidad del sistema de natación a la hora de evaluar efectos sobre el movimiento forzado como biomarcador del comportamiento básico en peces.
3. Los estudios del comportamiento referidos a los efectos del BDE-47 estuvieron motivados por el alto grado de preocupación ambiental que vienen causando los PBDEs. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestros estudios, tras exposiciones a BDE-47 a través de la dieta o por transferencia materna, no pudieron concluir si las concentraciones de BDE-47 detectadas en entornos acuáticos naturales suponían un verdadero riesgo para la viabilidad de los peces.
4. Dentro del marco conceptual de la evaluación del riesgo, sería oportuno promover estrategias y métodos robustos además de ambientalmente representativos que permitan una evaluación del comportamiento de los peces como base para su implementación dentro de los ensayos ecotoxicológicos estandarizados actuales. Si bien los estudios más reconocidos que vienen

evaluando diferentes parámetros del comportamiento en condiciones estáticas ofrecen indudables ventajas como la facilidad y la reproducibilidad experimental, sin embargo están condicionados por factores como el espacio disponible para el movimiento y el tipo de estímulos externos aplicados. Estos factores pueden poner en cuestión el verdadero significado y representatividad ambiental de los resultados. Los túneles y canales de natación pueden ofrecer un alto grado de funcionalidad y significación ambiental al favorecer un entorno dinámico ofreciendo al pez la oportunidad de optar de un modo más natural por diferentes estrategias de natación para hacer frente a un flujo de agua.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Aida, T., 1921. On the inheritance of color in a freshwater fish, *Aplocheilichthys latipes* Temminck and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6, 554–573.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances, The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress?. *Prospects Based on Aquatic Research. Hum. Ecol. Risk. Assess.* 15, 87–110.
- Anderson, T. d., MacRae, J.D., 2006. Polybrominated diphenyl ethers in fish and wastewater samples from an area of the Penobscot River in Central Maine. *Chemosphere* 62, 1153–1160.
- Akutsu, K., Obana, H., Okinashi, M., Kitagawa, M., Nakazawa, H., Matsuki, Y., Makino, T., Oda, H., Hori, S., 2001. GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan. *Chemosphere* 44, 1325-1333.
- Arkoosh, M.R., Van Gaest, A.L., Strickland, S.A., Hutchinson, G.P., Krupkin, A.B., Dietrich, J.P., 2015. Dietary Exposure to Individual Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE-47 and BDE-99 Alters Innate Immunity and Disease Susceptibility in Juvenile Chinook Salmon. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6974-6981.
- Arnold, G P., 1974. Rheotropism in Fishes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 49, 515–76.
- ATSDR., 2017. Toxicological Profile for Polybrominated Diphenyl Ethers. U.S. Department of Health Human Services. In Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp 592.
- Baba, K., Yahagi, H., Watanabe, S., Hara, N., Yoda, M., Lida, T., Katori, T., Ishida, M., 1989. Apparatus for monitoring the toxicant contamination of water by using aquatic animals. US patent 488703A.
- Bagatto, B., Pelster B., Burggren, W.W., 2001. Growth and Metabolism of Larval Zebrafish, Effects of Swim Training. *J. Exp. Biol.* 204, 4335–43.
- Barbieri, E., 2007. Use of Metabolism and Swimming Activity to Evaluate the Sublethal Toxicity of Surfactant (LAS-C12) on *Mugil Platanus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, 101–12.
- Barron, M.G., Woodburn, K.B. 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 144, 1–93.
- Bayley, M., 2002. Basic Behaviour: The Use of Animal Locomotion in Behavioural Ecotoxicology. In Giacomo Dell'Omo (Ed), *Institute of Anatomy, University of Zürich, Switzerland, Behavioural Ecotoxicology*, pp. 211-230.
- Beecham, R.V., Minchew, C.D., S. D. F. To, Parsons, G.R., 2014. Design and Calibration of a Tilting Tunnel Respirometer to Study Non-Horizontal Swimming in Fishes. *Sci. Tech.* 4, 22–29.
- Bell W. H. and L.D.B. Terhune, 1970. Water Tunnel desing for fisheries Research .Fish. Res. Bd. Canada Tech. Rept. 195, 1-69.
- Bianco, I.H., Kampff, A.R., Engert, F., 2011. Prey capture behavior evoked by simple visual stimuli in larval zebrafish. *Front. Syst. NeuroSci.*
- Bierbach, D., Laskowski, K.L., Wolf, M., 2017. Behavioural individuality in clonal fisharises despite near-identical rearing conditions. *Nat. Commun.* 8, 15361.
- Brett JR., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd Canada* 21, 1183–1226.
- Bridges, C.M., 1997, Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl: *Environmental Toxicology and Chemistry* .*Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1935-1939.

Bibliografía

- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems - impacts through behavioral alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 369 (1656). 101, 1-13-
- Bueno, M.J., Gomez, M.J., Herrera, S., Hernando M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2011. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain, Two years pilot survey monitoring. *Environ. Poll.* 164, 267- 273.
- Carlson, D.L., Swackhamer, D.L., 2006. Results from the U.S. Great Lakes Fish Monitoring Program and Effects of Lake Processes on Bioaccumulative Contaminant Concentrations. *J. Great Lakes Res.* 32, 370–385.
- Carlsson, G., Blomberg, M., Pohl, J., Örn S., 2018. Swimming activity in zebrafish larvae exposed to veterinary antiparasitic pharmaceuticals". *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 63, 74-77.
- Ceballos, G., Paul, R., Ehrlich, Anthony D., Barnosky, García. A., 2015. Accelerated modern human-induced species losses, Entering the sixth mass extinction. *Sciadv.* 1.
- Chan, W.K., Chan, K.M., 2012. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquat. Toxicol.* 108, 106–111.
- Chen, C.Y., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., 2013. Influence of water quality parameters on occurrence of polybrominated diphenyl ether in sediment and sediment to biota accumulation. *Chemosphere* 90, 2420–2427.
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L., Zhou, B., 2012. Acute Exposure to DE-71, Effects on Locomotor Behavior and Developmental Neurotoxicity in Zebrafish Larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2338–2344.
- Chen, T., Wang, Y., Wu, Y., 2011. Developmental Exposures to Ethanol or Dimethylsulfoxide at Low Concentrations Alter Locomotor Activity in Larval Zebrafish: Implications for Behavioral Toxicity Bioassays. *Aquat. Toxicol.* 102, 162–166.
- Chen, T.H., Cheng, Y.M., Cheng, J.O., Chou, C.T., Hsiao, Y.C., Ko, F.C., 2010. Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 377–383.
- Chen, Te-Hao., Wang, Yen-Hsin., Wu, Yu-Hwan., 2011. Developmental Exposures to Ethanol or Dimethylsulfoxide at Low Concentrations Alter Locomotor Activity in Larval Zebrafish, Implications for Behavioral Toxicity Bioassays. *Aquat. Toxicol.* 102, 162–66.
- Chen, X., Huang, C., Wang, X., Chen, J., Bai, C., Chen, Y., Chen, X., Dong, Q., Yang, D., 2012. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 120–121, 35–44.
- Chilés, J.P., Delfiner, P., 1999. *Geostatistics: Modeling Spatial Uncertainty*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Chou, C.T., Hsiao, Y.C., Ko, F.C., Cheng, J.O., Cheng, Y.M., Chen, T.H., 2010. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 98, 388–395.
- Christensen, J.H., Glasius, M., Pécseli, M., Platz, J., Pritzl, G., 2002. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine fish and blue mussels from southern Greenland. *Chemosphere* 47, 631–638.
- Chun, S.N., Cocherell, S.A., Cocherell, DE., Miranda, J., Jones, G.J., Graham, J., Klimley, A.P., Thompson, L.C., Cech, J.J., 2011. Displacement, Velocity Preference, and Substrate Use of Three Native California Stream Fishes in Simulated Pulsed Flows. *Environ. Toxicol. Chem.* 90, 43–52.
- Cook, C.L., Coughlin, D.J., 2010. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* consume less energy when swimming near obstructions. *J. Fish Biol.* 77, 1716–1723.

- Cooper, N., Bidwell, J.R., 2006. "Cholinesterase Inhibition and Impacts on Behavior of the Asian Clam, *Corbicula Fluminea*, after Exposure to an Organophosphate Insecticide. *Aquat. Toxicol.* 76, 258–67.
- Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* 29, 841–853.
- Darnerud, P.O., Eriksen, G.S., Jóhannesson, T., Larsen, P.B., Viluksela, M., 2001. Review Polybrominated diphenyl ethers, occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.* 109, 49–68.
- De Vos, J., Joppa, L.N., Gittleman, J.L., Stephens, P.R., Pimm, S.L., 2015. Estimating the normal background rate of species extinction. *Conservation Biology.* 29, 452–462.
- de Wit C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere.* 46, 583-624.
- de Wit, C.A., de Alae, M., Muir, D.C.G. 2006. Levels and Trends of Brominated Flame Retardants in the Arctic. *Chemosphere* 64, 209–33.
- Deane, E.E., van de Merwe, J.P., Hui, J.H., Wu, R.S., Woo, N.Y., 2014. BDE-47 exposure causes gender specific effects on apoptosis and heat shock protein expression in marine medaka, *Oryzias melastigma*. *Aquat. Toxicol.* 147, 57–67.
- Dell’Omo, G., 2002. Behavioural Ecotoxicology. John Wiley & Sons (Eds), Chichester, UK.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. en, Fossi M.C. and Leonzio C. (Eds), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 271–95.
- Dlugos, C.A., Rabin R.A., 2003. Ethanol Effects on Three Strains of Zebrafish, Model System for Genetic Investigations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 471–80.
- EC, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Off. J. Eur. Union L* 136, 3–280.
- Eddins, D., Cerutti, D., Williams, P., Linney, E., Levin, E.D., 2010. Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure, comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 99–108.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. *European Food Safety* 9, 1-274.
- Elder, J. and Coombs, S., 2015 The influence of turbulence on the sensory basis of rheotaxis. In *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 667–680.
- Eurostat, 2017. Production and consumption of chemicals by hazard class. http://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-datasets/-/ENV_CHMHAZ. (Acceso el 28/04/2017).
- Evans, H.L., 1994. Neurotoxicity expressed in naturally occurring behavior. In, Weis, B., O’Donoghue, J.L. (Eds.), *Neurobehavioral toxicity, Analysis and Interpretation*, Raven Press, New York, pp. 111-135.
- Fairbrother, A., Ankley, G.T., Birnbaum, L.S., Bradbury, S.P., Francis, B., Gray, L.E., Hinton, D., Johnson, L.L., Peterson, R.E., Van Der Kraak, G., 1999. Reproductive and developmental toxicology of contaminants in oviparous animals. En, Di Giulio, R.T., - Tillitt, D.E. (Eds.), *Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates*. Society of Environ. Toxicol. Chem., Pensacola, FL, USA, pp. 283-361.

Bibliografía

- Farlinger, S., Beamish, F.W.H., (1977). Effects of time and velocity increments on the critical swimming speed of largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Trans. Am. Fish Soc.* 106, 436–439.
- Fernández, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., 2010. Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Surface Waters of the Henares-Jarama-Tajo River System (Madrid, Spain) and a Potential Risk Characterization. *Sci. Total Environ.* 408, 543-551.
- Fiaz, A W., Léon-Kloosterziel, K. M., Gort, G., Schulte-Merker, S., van Leeuwen, J.L., a Kranenbarg. S., 2012. Swim-Training Changes the Spatio-Temporal Dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish Larvae (*Danio Rerio*). *PLoS ONE* 7, 1–13.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–80.
- Fossi, M.C., Leonzio, C., Peakall, D.B., 1994. The use of nondestructive biomarkers in the hazard assessment of vertebrate populations. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C., (Eds.), *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Boca Raton, Lewis Publishers, pp. 3-34.
- Fraser A, Webster T, McClean M. 2009. Diet contributes significantly to the body burden of PBDEs in the general U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 117, 1520–1525.
- Freese, M, Sühling, R., Marohn, L., Pohlmann, J.D., Wolschke, H., Byer, J.D., Alae, M., Ebinghaus, R., Hanel, R. 2017. Maternal transfer of dioxin-like compounds in artificially matured European eels. *Environ Pollut.* 227, 348-356.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245–254.
- Furutani-Seiki, M. Wittbrodt, J., 2004. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.* 629-37.
- Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, A.L., Schaefer, I.C., Bonan C.D., Lara, D.L., 2011. Effects of Anxiolytics in Zebrafish, Similarities and Differences between Benzodiazepines, Buspirone and Ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 480–86.
- Gerhardt A., 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology - prospects and limitations. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13, 481-491.
- Giddings, J.M., Williams, W.M., Solomon, K.R., Giesy, J.P., 2014. Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In: Giesy, J.P., Solomon, K.R. (Eds.), *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 119-162.
- Glazer, L., Wells, C.N., Drastala, M., Odamaha, K., Galatb R.E., Behlc, M., Levin E.D., 2018. Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. *Neurotoxicology* 66, 221-232.
- González-Doncel, M., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Beltrán, E.M., Fernández Torija, C., 2016. Effects of dietary 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 178, 141-52.
- González-Doncel, M., Fernández-Torija, C., Beltrán, E.M., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Carbonell, G., 2014. Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. *Aquat. Toxicol.* 148, 184–194.
- Gravato, C. and Guilhermino. L., 2009. Effects of Benzo (a)Pyrene on Seabass (*Dicentrarchus Labrax L.*), Biomarkers, Growth and Behavior. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 121–37.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F. W., Freitas, R., Liu, J., Hsu, E. W., Wildt, D. E., and Rall, W. F. (1997). Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Zool.* 278, 356–713.
- Hahm, J., Manchester-Neesvig, J.B., DeBord, D., Sonzogni, W.C., 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Lake Michigan forage fish. *J. Great Lakes Res.* 35, 154–158.

- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Mainor, T.M., Duff, W.H., Gaylor, M.O., 2001. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Virginia freshwater fishes (USA). *Environ. Sci. Technol.* 35, 4585–4591.
- Hayward, D., Wong, J., Krynitsky, A.J., 2007. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in commercially wild caught and farm-raised fish fillets in the United States. *Environ. Res.* 103, 46–54.
- Hellou, J., 2011. Behavioral ecotoxicology, an early warning signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. R.* 18, 1-11.
- Han, X.B., Yuen, K. W.Y., Wu, R.S.S. 2013. Polybrominated diphenyl ethers affect the reproduction and development, and alter the sex ratio of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.* 182, 120-126.
- Herbstman, J.B., Sjodin, A., Kurzton, M., Lederman, S.A., Jones R.S., Rauh, V., Needham, L.L., Tang, D., Niedzwiecki, M., Wang, R.Y., Perera, F., 2010. Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environ. Health. Perspect.* 118, 712–719.
- Hinton D.E., Kullman S.W., Hardman R.C., Volz D.C., Chen P.J., Carney M., Bencic D.C., 2005. Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance?. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 635-648.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P., Batley, G.E., 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 327–341.
- Huang, Y., Cartledge, R., Walpitagama, M., Kaslin, J., Campana, O., Wlodkovic. D., 2018. Unsuitable Use of DMSO for Assessing Behavioral Endpoints in Aquatic Model Species. *Sci. Total Environ.* 615, 107–114.
- Ijiri, K., 1994. A preliminary report on IML-2 Medaka experiment, Mating behavior of the fish Medaka and development of their eggs in space. *Biol. Sci. Space.* 8, 231–233.
- Ijiri, K., 1998. Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of Medaka fish. *Adv. Space Res.* 21, 1155-1158.
- Ikonomou M.G., Rayne S., Fischer M., Fernández M.P. y Cretney W., (2002). Occurrence and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from coastal British Columbia, Canada. *Chemosphere* 46, 649-663.
- Ishikawa, C., 1913. Lectures on Zoology (in Japanese) Kanazashi- Horyu–Do, Tokyo
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 605–618.
- Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., Fu, Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 405–414.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Brewer, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology, automated techniques, updates and perspectives. In, Ostrander, G.K. (Ed.), *Methods in Aquat. Toxicol.* vol. 2. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 559–590.
- Keenleyside, M.H.A., 1979. *Diversity and Adaptation in Fish Behaviour*. Springer-Verlag, Berlin.
- Khalil, F., Kang, I.J., Undap, S., Tasmin, R., Qiu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2013. Alterations in social behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemosphere.* 92, 125-130.
- Khalil, F., Qiu, X., Kang, I.J., Abo-Ghanema, I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2017. Comparison of social behavior responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to lethal and sublethal chlorpyrifos concentrations at different exposure times. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 78–82.
- Kienle, C., Köhler, H. R., Gerhardt, A., 2009. Behavioural and Developmental Toxicity of Chlorpyrifos and Nickel Chloride to Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos and Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1740–47.

Bibliografía

- Kodavanti, P.R., Curras-Collazo, M.C., 2010. Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 479–496.
- Kolpin D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, SD, Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000, A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
- Kopp, R., Legler, J., Legradi, J., 2016. Alterations in Locomotor Activity of Feeding Zebrafish Larvae as a Consequence of Exposure to Different Environmental Factors. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 4085-4093.
- Lacorte, S., Raldúa, D., Martínez, E., Navarro, A., Diez, S., Bayona, J.M., Barceló, D., 2006. Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environ. Pollut.* 140, 471–482.
- Lana, N.B., Berton, P., Covaci, A., Ciocco, N.F., Barrera-Oro, E., Atencio, A., Altamirano, J.C., 2014. Fingerprint of persistent organic pollutants in tissues of Antarctic notothenioid fish. *Sci. Total Environ.* 499, 89–98.
- Law, J.M., 2003. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology, session introduction. *Toxicol. Pathol.* 31, 49-52.
- Legradi, J., El Abdellaoui, N., van Pomeran, M., Legler, J., 2015. Comparability of Behavioural Assays Using Zebrafish Larvae to Assess Neurotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.int.* 22, 16277–16289.
- Lema, S.C., Dickey, J.T., Schultz, I.R., Swanson, P., 2008. Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environ. Health Perspect.* 116, 1694–1699.
- Lema, S.C., Schultz, I.R., Scholz, N.L., Incardona, J.P., Swanson, P., 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat. Toxicol.* 82, 296–307.
- Levin, E.D., Swain, H.A., Donerly, S., Linney, E., 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol* 26, 719-723
- Liao, J.C., 2003. Fish Exploiting Vortices Decrease Muscle Activity. *Science* 302 (5650), 1566–69.
- Liao, J.C., 2007. A Review of Fish Swimming Mechanics and Behaviour in Altered Flows. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362, 1973–93.
- Liao, P.H., Hwang, C.C., Chen, T.H., Chen, P.J., 2015. Developmental Exposures to Waterborne Abused Drugs Alter Physiological Function and Larval Locomotion in Early Life Stages of Medaka Fish. *Aquat. Toxicol.* 165, 84–92.
- Lin, X., Song B., Sun J., Wang W., Xu, Z., 2007. Fish metabolism swimming synchronous record measure device. Patent CN101011042A.
- Little, E.E., Finge S.E., 1990. Swimming Behavior as an Indicator of Sublethal Toxicity in Fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19.
- Little, E.E., Brewer, S.K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish. En, Schlenk, D. Benson, W.H. (Eds.), target organ toxicity in marine and freshwater teleosts new perspectives, toxicology and the environment. Vol. 2. Systems. Taylor and Francis, London and New York, pp. 139-174.
- Liu, H., Tang, S., Zheng, X., Zhu, Y., Ma, Z., Liu, C., Hecker, M., Saunders, D.M.V., Giesy, J.P., Zhang, X., Yu, H., 2015. Bioaccumulation, biotransformation, and toxicity of BDE-47, 6-OH-BDE-47, and 6-MeO-BDE-47 in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 49, 1823–1833.
- López-Mancisidor, P., Carbonell G., Marina A., Fernández C., Tarazona JV., 2008. Zooplankton community responses to chlorpyrifos in mesocosms under Mediterranean conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 16-25.

- Lunder, S., Sharp, R., 2003. Tainted catch, brominated fire retardants (PBDEs) found in San Francisco Bay fish. Environmental working group. <http://www.ewg.org/reports/taintedcatch>. (Acceso 22/04/2011)
- Lyon, E.P., 1904. On rheotropism. I. Rheotropism in fishes. *Am. J. Physiol.* 12, 149-161.
- Macaulay, L.J., Bailey, J.M., Levin, E.D., Stapleton, H.M., 2015. Persisting effects of a PBDE metabolite, 6-OH-BDE-47, on larval and juvenile zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 52, 119–126.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S., 2009. Locomotion in Larval Zebrafish, Influence of Time of Day, Lighting and Ethanol. *NeuroToxicology* 30, 52–58.
- Mariussen, E., Fjeld, E., Breivik, K., Steinnes, E., Borgen, A., Kjellberg, G., Schlabach, M., 2008. Elevated levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish from Lake Mjøsa, Norway. *Sci. Total Environ.* 390, 132–141.
- Marvin, C., Waltho, J., Jia, J., Burniston, D., 2013. Spatial distributions and temporal trends in polybrominated diphenyl ethers in Detroit River suspended sediments, *Chemosphere* 91, 778-783.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.
- McDonald, T.A. 2002. A Perspective on the Potential Health Risk of PBDEs. *Chemosphere* 46, 745–55.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R., Yu, H., 2009. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2085-2092.
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for Aquatic. Toxicology. testing, a meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217-2223.
- Meng, X.Z., Yu, L., Guo, Y., Mai, B.X., Zeng, E.Y., 2008. Congener-specific distribution of polybrominated diphenyl ethers in fish of China, implication for input sources. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 67–72.
- Mhadhbi, L., Fumega, J., Boumaiza, M., Beiras, R., 2012. Acute toxicity of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) for turbot (*Psetta maxima*) early life stages (ELS). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 708–717.
- Miller, M.A. 1993. Maternal Transfer of Organochlorine Compounds in Salmonines to Their Eggs *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1405-1413.
- Montie, E.W., Letcher, R.J., Reddy, C.M., Moore, M.J., Rubinstein, B., Hahn, M.E., 2010. Brominated flame retardants and organochlorine contaminants in winter flounder, harp and hooded seals, and North Atlantic right whales from the Northwest Atlantic Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1160–1169.
- Moyle, P.B. and Cech, Jr. J., 1996. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*, 3rd Edition.
- Muirhead, E.K., Skillman, A.D., Hook, S.E., Schultz, I.R., 2006. Oral exposure of BDE-47 in fish, toxicokinetics and reproductive effects in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 40, 523–528
- Müller, U. K., Stamhuis, E. J., Videler, J. J., 2000. Hydrodynamics of Unsteady Fish Swimming and the Effects of Body Size, Comparing the Flow Fields of Fish Larvae and Adults. *J. Exp. Biol.* 203, 193–206.
- Muller, U. K., van den Boogaart, J.G.M., and van Leeuwen. J.L., 2008. Flow Patterns of Larval Fish, Undulatory Swimming in the Intermediate Flow Regime. *J. Exp. Biol.* 211, 196–205.
- Munns, W.R.J., Kroes, R., Veith, G., Suter, G.W., Damstra, T., Waters, M.D., 2003. Approaches for integrated risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.* 9, 267–272.

Bibliografía

- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362–372.
- NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine) 2017. Effect of Polybrominated Diphenyl Ethers on Neurodevelopment Chapter 4 In, *Application of Systematic Review Methods in an Overall Strategy for Evaluating Low-Dose Toxicity from Endocrine Active Chemicals*. The National Academies Press Washington, DC, pp. 115-127.
- National Geographic, 2019. Freshwater-crisis. <https://www.nationalgeographic.com/environment/freshwater/freshwater-crisis/>
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2003. *Fundamentals of Toxicology*, 2nd Ed Lewis Publishers, Boca Raton.
- Nihori, M., Mogami, Y., Naruse, K., Baba, S.A., 2004. Development and Swimming Behavior of Medaka Fry in a Spaceflight aboard the Space Shuttle Columbia (STS-107). *Zool. Sci.* 21, 923-931.
- Nüßer, L. K., Skulovich, O., Hartmann, O., Seiler T., Cofalla, C., Schuettrumpf, H., Hollert, H., Salomons, E., Ostfeld, A., 2016. A Sensitive Biomarker for the Detection of Aquatic Contamination Based on Behavioral Assays Using Zebrafish Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 271–80.
- Nyholm, J.R., Norman, A., Norrgren, L., Haglund, P., Andersson, P.L., 2008. Maternal transfer of brominated flame retardants in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73, 203–208.
- Öberg, K., Warman, K., Öberg, T., 2002. Distribution and Levels of Brominated Flame Retardants in Sewage Sludge. *Chemosphere* 48, 805–9.
- Palstra A.P., Schaaf M.J.M., Planas J.V., 2013. Exercise physiology of zebrafish: Swimming effects on skeletal and cardiac muscle growth, on the immune system, and the involvement of the stress axis. In: Palstra, A. Planas, J. (Eds.) *Swimming physiology of fish: Towards using exercise to farm a fit fish in sustainable aquaculture*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 323-342.
- Rice, P. J. Drewes, C. D., Klubertanz, T. M., Bradbury, S. P., Coats J. R., 1997. Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 696-704.
- Peakall, D.B., 1992. *Animal biomarkers as pollution indicators.*, Chapman & Hall. London.
- Peng, X., Tang, C., Yu, Y., Tan, J., Huang, Q., Wu, J., Chen, S., Mai, B., 2009. Concentrations, transport, fate, and releases of polybrominated diphenyl ethers in sewage treatment plants in the Pearl River Delta, South China. *Environ. Int.* 35, 303–309.
- Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A.M., Loureiro, S., 2013. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 4671-4680.
- Petersen, G. I., Kristensen, P., 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1385–1395.
- Pippy. John H.C., 1993. Apparatus for monitoring moving aquatic organisms. Patent CA2057833C.
- Powers, DA., 1989. Fish as model systems. *Science* 246, 352-358.
- Qiu, X., Nomichi, S., Chen, K., Honda, M., Kang, I.J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2017. Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion anxiety, and startle responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 192, 148–154.
- Rand, G. M., 1984. The use of behavioral measurements to assess toxicant induced stress in marine organisms. In G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus, (Eds.), *Ecotoxicological*

- testing for the marine environment, vol.2. Institute for Marine Scientific Research, Bredene, Belgium, pp. 431-456.
- Rand, G.M., 1985. Behavior In Fundamentals of Aquatic Toxicology., Rand GM and Petrocelli SR (Eds), Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 221-263.
- Rice, C.A., Myers, M.S., Willis, M.L., French, B.L., Casillas, E., 2000. From sediment bioassay to fish biomarker-connecting the dots using simple trophic relationships. *Mar. Environ. Res.* 50, 527–533.
- Richendrerfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R., 2012. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 458–465.
- Robinson, P. D., 2009. Behavioural Toxicity of Organic Chemical Contaminants in Fish, Application to Ecological Risk Assessments (ERAs). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 1179–1188.
- Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J., 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32, 268–276.
- Roosens, L., Dirtu, A.C., Goemans, G., Belpaire, C., Gheorghe, A., Neels, H., Blust, R., Covaci, A., 2008. Brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in fish from the river Scheldt, Belgium. *Environ. Int.* 34, 976–983.
- Rugh, R., 1962. *Experimental Embryology; Techniques and Procedures*, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Techniques*. Methuen, London, UK.
- Santín, G., Barón, E., Eljarrat, E., Barceló, D., 2013. Emerging and historical halogenated flame retardants in fish samples from Iberian rivers. *J. Hazard. Mater.* 263, 116–121.
- Scherer, E., 1992. Behavioral responses as indicators of environmental alterations-Approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyol.* 8, 122-131.
- Scott, G.R. and Sloman, K.A. 2004. The Effects of Environmental Pollutants on Complex Fish Behavior, Integrating Behavioral and Physiological Indicators of Toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369-392.
- Selderslaghs, I.W., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 460–471.
- Shaw, S.D., Kannan, K., 2009. Polybrominated diphenyl ethers in marine ecosystems of the American continents, foresight from current knowledge. *Rev. Environ. Health* 24, 157-229.
- Shima, A., Mitani, H., 2004. Medaka as a research organism, past, present and future. *Mech. Dev* 121, 599-604.
- Shiklomanov, I.A. (1993): "World fresh water resources". En P.H. Gleick (ed.) "Water in crisis". Oxford University Press.
- Signore, I., Guerrero, N., Loosli, F., Colombo, A., Villalón, A., Wittbrodt, J., Concha, M.L., 2009. Zebrafish and medaka, model organisms for a comparative developmental approach of brain asymmetry. *Philos. Trans. R. Soc.B.* 364, 991-1003.
- Sjödin, A., Jakobsson, A., Kierkegaard, A., Marsh, G., Sellström, U., 1998. Gas chromatographic identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers in a commercial product, Bromkal 70-5DE. *J. Chromatogr.* 822, 83–89.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics, The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67, 143–154.

Bibliografía

- Solbé, J.F. De. L.G., 1993. Freshwater fish. In Handbook of Ecotoxicology. P. Calow, (Ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 66-82.
- Stapleton, H.M., Letcher, R.J., Li, J., Baker, J.E., 2004. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Environ. Toxicol. Chem. 23, 1939–1946.
- Sühling, R., Busch, F., Fricke, N., Kötke, D., Wolschke, H., Ebinghaus, R., 2016. Distribution of brominated flame retardants and dechloranes between sediments and benthic fish- A comparison of a freshwater and marine habitat. Sci. Total Environ. 542, 578–585.
- Ta, T.N., Aronov, P., Golub, M.S., Pessah, I.N., Berman, R.F., 2008. Perinatal exposure to 2,2',4,4' tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) retards growth and delays neurodevelopment of C57BL6/J mice. Birth Defects Res Part A, Clin. Mol. Teratol. 82, 383–383.
- Tanaka, Y., Fujiwara, M., Shindo, A., Yin, G., Kitazawa, T., Teraoka, H., 2018. Aroclor 1254 and BDE-47 inhibit dopaminergic function manifesting as changes in locomotion behaviors in zebra fish embryos. Chemosphere 193, 1207–1215.
- Thorton, L.M., Path, E. M., Nystrom, G. S., Venables, B.J., Sellin Jeffries, M.K., 2018. Embryonal larval BDE-47 exposure causes decreased pathogen resistance in adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*). Fish and Shellfish Immunol. 80, 80-87.
- Tomy, G.T., Palace, V.P., Halldorson, T., Braekevelt, E., Danell, R., Wautier, K., Evans, B., Brinkworth, L., Fisk, A.T., 2004. Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*). Environ. Sci. Technol. 38, 1496–1504.
- Torres, L., Orazio, C.E., Peterman, P.H., Patiño, R., 2013. Effects of dietary exposure to brominated flame retardant BDE-47 on thyroid condition, gonadal development and growth of zebrafish. Fish Physiol. Biochem. 39, 1115–1128.
- Toyama, K. 1916. On some Mendelian characters (in Japanese). Rep. Jap. Breed. Soc. 1, 1–9.
- Tudorache, C., O'Keefe, R.A., Benfey, T.J., 2011. Optimal swimming speeds reflect preferred swimming speeds of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1874). Fish Physiol. Biochem. 37, 307–315.
- UNEP. (United Nations Environment Programme) Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). Press release, Governments Unite to step-up reduction on global DDT Reliance and add nine new chemicals under international treaty, 2009. Disponible en, <http://chm.pops.int/Convention/Media/Pressreleases/COP4Geneva9May2009/tabid/542/lan>.
- US EPA, 2008. Toxicological review of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/005F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- US EPA 2014. EPA 505-F-14-006. Technical fact sheet polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs). Office of Solid Waste and Emergency Response. Hoja Técnica. U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC, EUA, pp. 1-7. .
- US EPA 2017. Technical Fact Sheet – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). EPA 505-F-17-05. U.S. Environmental Protection Agency
- Usenko, C.Y., Robinson, E.M., Usenko, S., Brooks, B.W., Bruce, E.D., 2011. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. Environ. Toxicol. Chem. 30, 1865–1872.
- van de Merwe, J.P., Chan, A.K., Lei, E.N., Yau, M.S., Lam, M.H., Wu, R.S., 2011. Bioaccumulation and maternal transfer of PBDE 47 in the marine medaka (*Oryzias melastigma*) following dietary exposure. Aquat. Toxicol. 103, 199–204.
- Van Esch, G. J., 1994. Environmental Health Criteria 162, Brominated Diphenyl Ethers. World Health Organization, Geneva.

- van Leeuwen, S.P.J., De Boer, J., 2008. Brominated flame retardants in fish and shellfish - Levels and contribution of fish consumption to dietary exposure of Dutch citizens to HBCD. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 194–203.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking bio-markers to behavior. *Chemosphere* 76, 1416–1427
- Vince, G., 2011. An epoch debate. *Science* 334, 32–37.
- Vitousek, P., Mooney, H., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 27, 494–499.
- Ward, D.L., Maughan, O.E., Bonar, S.A., 2002. A variable-speed swim tunnel for testing the swimming ability of age-0 fish. *N. Am. J. Aquac.* 64, 228–231
- Warner, R.E., Peterson K.K., Borgman L., 1966. Behavioural pathology in fish, a quantitative study of sublethal pesticide toxication. *J. Appl. Ecol.* 3, 223-247.
- Weichert, F.G., Floeter, C., Meza Artmann, A.S., Kammann, U., 2017. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances-Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere* 186, 43-50.
- Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001. Effects of contaminants on behavior, biochemical mechanisms and ecological consequences. *BioScience* 51, 209–217.
- Weis, J.S., Weis, P., 1983. Effects of Environmental Pollutants on Early Fish Development. *Aquatic Sciences*
- Wen, Q., Liu, H.L., Zhu, Y.T., Zheng, X.M., Su, G.Y., Zhang, X.W., Yu, H.X., Giesy, J.P., Lam, M.H., 2015. Maternal transfer, distribution, and metabolism of BDE-47 and its related hydroxylated, methoxylated analogs in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 120, 31–36.
- Williams, A.L., DeSesso, J.M., 2010. The potential of selected brominated flame retardants to affect neurological development. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 13, 411– 448.
- Williams, W.M., Giddings, J.M., Purdy, J., Solomon, K.R., Giesy, J.P., 2014. Exposures of aquatic organisms to the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos resulting from use in the United States. In: Giesy, J.P., Solomon, K.R. (Eds.), *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 77–117.
- Wittbrodt, J., Shima A., Schartl M., 2002. Medaka a model organism from the far East. *Nature reviews. Genetics* 3, 53-64.
- Wolfgang, M.J., Anderson, J.M., Grosenbaugh, M.A., Yue, D.K., Triantafyllou, M.S., 1999. Near-Body Flow Dynamics in Swimming Fish. *J. Exp. Biol.* 202, 2303–2327.
- Xiao, C., Han, Y., Liu, Y., Zhang, J., Hu, C., 2018. Relationship between fluoroquinolone structure and neurotoxicity revealed by zebrafish neurobehavior. *Chem. Res. Toxicol.* 31 238–250.
- Yamamoto, T., 1975. *Medaka (Killifish), Biology and Strains*. Keigaku Publishing Co., Tokyo.
- Yamamoto, T.O., 1955. Progeny of artificially induced sex-reversals of male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to YY-male. *Genetics* 40, 406-419.
- Zalasiewicz, J., Williams, M., Steffen, W., Crutzen, P., 2010. The new world of the Anthropocene. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2228-31.
- Zhang, B., Xu T., Huang G., Yin D., Zhang Q., Yang X. 2018. Neurobehavioral effects of two metabolites of BDE-47 (6-OH-BDE-47 and 6-MeOBDE-47) on zebrafish larvae. *Chemosphere* 200, 30-35.
- Zhang, C., Willett, C., Fremgen, T., 2003. *Toxicological Models*. John Wiley & Sons, Inc (Eds). In *Current Protocols I toxicology*.

Bibliografía

- Zhang, B., Chen, X., Pan, R., Xu, T., Zhao, J., Huang, W., Liu, Y., Yin, D., 2017. Effects of three different embryonic exposure modes of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether on the path angle and social activity of zebrafish larvae. *Chemosphere* 169, 542–549.
- Zhang, B.Z., Ni, H.G., Guan, Y.F., Zeng, E.Y., 2010. Occurrence, bioaccumulation and potential sources of polybrominated diphenyl ethers in typical freshwater cultured fish ponds of South China. *Environ. Pollut.* 158, 1876–1882.
- Zhao, J., Xu, T., Yin, D.Q., 2014. Locomotor activity changes on zebrafish larvae with different 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) embryonic exposure modes. *Chemosphere* 94, 53–61.
- Zheng, X., Zhu, Y., Liu, C., Liu, H., Giesy, J.P., Hecker, M., Lam, M.H.W., Yu, H., 2012. Accumulation and Biotransformation of BDE-47 by Zebra fish Larvae and Teratogenicity and Expression of Genes along the Hypothalamus – Pituitary – Thyroid Axis. *Environ. Sci Technol* 46, 12943-12951.
- Zhihua, L., Panton, S., Marshall, L., Fernandes, A., Rose, M., Smith, F., Holmes, M., 2018. Chemosphere Spatial analysis of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs) in fish collected from UK and proximate marine waters. *Chemosphere* 195, 727–734.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 960**

21 Número de solicitud: 201530256

51 Int. Cl.:

A01K 61/00 (2006.01)
G06T 7/20 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

27.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.10.2015

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

07.01.2016

Fecha de la concesión:

12.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.05.2016

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)
(100.0%)**

**Ctra. de la Coruña, km. 7,5
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ DONCEL, Miguel;
SASTRE LÓPEZ, Salvador y
SAN SEGUNDO GONZÁLEZ, Laura**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Sistema dinámico para analizar un organismo acuático**

57 Resumen:

Un sistema para someter de un modo individual a un flujo controlado de agua dentro de un canal a organismos acuáticos de tamaños muy reducidos, translúcidos y con una capacidad de movimientos rápidos. Este flujo del agua obliga al organismo a nadar en contra de la corriente. El diseño y características del sistema permiten la obtención de fotogramas secuenciales para un posterior análisis cuantitativo del movimiento. La evaluación cuantitativa permite discriminar los diferentes organismos sometidos en función de su respuesta a este estrés ambiental.

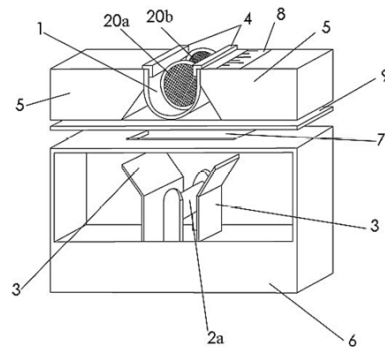


FIG. 3

ES 2 547 960 B2

SISTEMA DINÁMICO PARA ANALIZAR UN ORGANISMO ACUÁTICO**DESCRIPCIÓN**

5

Campo técnico de la invención

La invención pertenece al campo de los sistemas de natación que emplean un canal de agua para estudiar el comportamiento de organismos acuáticos. Más concretamente, la invención se encuadra en aquellos sistemas dinámicos para el estudio cuantitativo.

Antecedentes de la invención o Estado de la Técnica

La natación es un parámetro que viene empleándose para valorar el estado de salud y el tipo de comportamiento en peces. Aparte del uso de sistemas estáticos, se han desarrollado diferentes conceptos de lo que es un sistema de natación dinámico. En los sistemas de natación de tipo estático, el agua se mantiene en un compartimento cerrado donde no existe un caudal o renovación de agua de modo que el movimiento del organismo, y en especial en etapas muy tempranas, no es predecible, siendo, en cierta medida, errático ajustándose a variables no controlables. Los sistemas dinámicos permiten someter a peces u otros organismos acuáticos a corrientes de agua con caudales o flujos controlados. El diseño de estos sistemas se basa en la entrada y la salida del agua que atraviesa un compartimento o canal en el cual se ubica el organismo. De este modo, el organismo es obligado a moverse en sentido contrario a la corriente del agua. En función de la fuerza de la corriente (i.e. velocidad del agua), el organismo deberá de incrementar la actividad motora para controlar su posición y orientación.

Son conocidos diferentes aparatos para valorar el comportamiento y la fisiología de la natación en distintos peces con tamaño mínimo superior a los 20 mm, generalmente opacos con una clara pigmentación del cuerpo. Por tanto, las propuestas existentes no permiten establecer valoraciones cuando el tamaño del organismo es muy reducido o bien dispone de poca pigmentación. Por ello, peces en etapas tempranas escapan a cualquier análisis cuantitativo.

Las limitaciones de estos sistemas se acentúan aún más debido a que los organismos en estas etapas tempranas efectúan movimientos menos predecibles y de mayor velocidad y aceleración con respecto a la edad adulta, lo que dificulta su seguimiento. Típicamente, un pez durante estas etapas tiene un tamaño de muy pocos mm (< 6 mm), es prácticamente translúcido y su peso ronda el miligramo (peso húmedo).

Como ejemplo, la mayoría de los peces teleósteos con fines comerciales tanto de tipo doméstico como para experimentación, son peces que en su fase adulta alcanzan no más de los 40-60 mm con pesos que oscilan entre los 0.7-1-5 gramos. Estas características ocasionan que sistemas disponibles comercialmente no sean útiles. Más aun en las etapas inmediatas a la eclosión del organismo, cuando presentan longitudes y pesos minúsculos junto con escasa pigmentación y muestran gran actividad (en velocidad y aceleración).

Debido a las dificultades mencionadas, los sistemas de natación dinámicos conocidos se vienen diseñando principalmente para valorar de un modo cualitativo la capacidad motora en etapas adultas de peces. En el caso de sistemas con canales cerrados, éstos permiten usarse únicamente para estudios de respirometría. Con relación a los sistemas con canales abiertos, éstos suelen ser de materiales opacos, con lo que es necesaria una iluminación directa del túnel de natación para poder ver el organismo moverse. En otros casos se ha recurrido a metacrilato o plexiglás para darle total transparencia al canal, lo que imposibilita la grabación desde la parte superior debido a reflejos del mismo canal y del agua que lo atraviesa. Esto se agrava cuando los organismos de estudio son muy pequeños y presentan escasa pigmentación.

Otra limitación de los sistemas actuales radica en que no trabajan con iluminación transmitida a través del canal. Si se intenta grabar el movimiento en vídeo, las imágenes obtenidas presentan interferencias de sombras, contrastes variables y presencia de artefactos. Por otro lado, los sistemas en los que el canal se ha fabricado con materiales transparentes, tienen la desventaja de producir reflejos indeseados, bien por el propio material, o por el movimiento del agua. Estos factores se complican aún más cuando el objeto de interés presenta escasa coloración o es translúcido, y su capacidad motora y de aceleración es muy elevada con relación a su tamaño.

El proceso de adquisición de imágenes digitales introduce de un modo inherente en la señal lo que se denomina "ruido". Dependiendo de la calidad del sensor, este ruido hace que el procesado de la imagen pueda ser realizado por el programa de seguimiento con mayor o menor fortuna teniendo en cuenta todos los factores mencionados anteriormente. Puesto que la presencia del ruido es inherente a la toma de información de la imagen digital a lo largo de la obtención secuencial de los fotogramas, se pretende minimizar la influencia del entorno y otros factores con la partícula u objeto de estudio, y así homogeneizar la señal de ruido de tal manera que esta forme parte de modo permanente de todos los fotogramas secuenciales y pueda contabilizarse como un factor constante en la información de la imagen obtenida.

Cuando el organismo es de un tamaño significativo y presenta una clara coloración, la captura digitalizada de su movimiento resulta en un número elevado de píxeles con un valor numérico de intensidad también alto en cada uno de los fotogramas representando el objeto de seguimiento que es ese organismo en movimiento. Esto, junto con que el organismo no presenta un movimiento y aceleración anormal resulta en un solapamiento de un porcentaje de píxeles oscuros del objeto entre un fotograma y otro. Este solapamiento y el tamaño facilitan su seguimiento de un modo secuencial a lo largo de los diferentes fotogramas.

Los sistemas dinámicos conocidos, al igual que otros sistemas de tipo estático, no consideran la toma de imágenes digitales para captar el movimiento del organismo y efectuar un posterior análisis. Los sistemas de captura digital de imágenes conforman la información de los objetos en forma de un conjunto de píxeles. La relación entre el objeto y la proyección de su imagen en forma de píxeles es muy compleja y depende otros factores además de la posición y el tamaño del objeto, lo que implica que la cuantificación del movimiento no sea sencilla. Otros factores adicionales tales como las relaciones de ese objeto con el entorno que le rodea, iluminación, sombras, artefactos, cambios de tamaño y de la perspectiva de éste con relación al equipo de captura de imágenes son críticos para posibilitar una cuantificación real del movimiento.

Además, dada la alta velocidad que llegan a presentar en momentos concretos, puede originar que estos píxeles no logren solaparse entre los fotogramas secuenciales que constituyen la película, lo que dificulta o imposibilita el seguimiento.

5 **Breve descripción de la invención**

La presente invención es un sistema consistente en un canal de natación con un diseño que permite, mediante un dispositivo de grabación convencional de imágenes digitales de alta resolución, una evaluación cuantitativa de la respuesta de organismos acuáticos, de tamaño muy reducido y con escasa pigmentación, frente a un agente externo como es un flujo o caudal controlado de agua. La respuesta se puede medir como: 1) la capacidad de nadar contracorriente y, 2) el tipo de movimiento dentro del canal.

El objeto de la invención es un sistema que permita analizar de un modo cuantitativo el comportamiento y la capacidad de natación contracorriente de organismos acuáticos que presentan tamaños muy reducidos, escasa pigmentación (i.e. coloración) y capacidad de movimiento a altas velocidades y fuertes aceleraciones con relación al tamaño cuando son sometidos a un flujo de agua con velocidad controlada. También puede considerarse como la capacidad de respuesta frente a un estrés como es un caudal de agua controlado a lo largo de un canal. La presente invención se refiere a un sistema de gravedad compuesto por un circuito cerrado por donde el agua pasa a través de un canal de natación. La configuración del sistema facilita un control preciso del caudal de agua a través del canal. Las características del canal permiten una iluminación transmitida evitando interferencias en la captura de imágenes digitales destinadas a la cuantificación del movimiento del organismo. La simplicidad del sistema permite su utilización en instalaciones donde se realizan estudios de fisiología, toxicología y farmacología con organismos acuáticos, así como en el campo de la acuicultura como herramienta de selección de los individuos en función de sus capacidades natatorias.

El sistema propuesto comprende un canal de natación abierto, unos medios hidráulicos acoplados al canal de natación, estando dichos medios hidráulicos configurados para establecer un flujo controlado de agua a través del canal de natación. Comprende además medios para iluminar el canal de natación que incluyen: una fuente de iluminación, un elemento difusor dispuesto entre la fuente de iluminación y el canal de natación de forma que la luz se transmite homogéneamente en el canal de natación.

Opcionalmente, los medios para iluminar el canal comprenden además unas pletinas reflectantes que dirigen la luz de la fuente de iluminación hacia la superficie inferior y lateral del canal de natación.

Opcionalmente, el canal de natación es de longitud variable.

40 Opcionalmente, el canal de natación es de sección semi-elíptica, con las partes laterales planas.

Opcionalmente, los medios hidráulicos están configurados para establecer un flujo de agua variable.

Opcionalmente, la fuente de iluminación es longitudinal y está situada a lo largo y debajo del canal.

Opcionalmente, la fuente de iluminación longitudinal es un tubo fluorescente.

5 Opcionalmente, la fuente de iluminación comprende una pluralidad de elementos luminosos puntuales distribuidos alrededor del canal.

Opcionalmente, la fuente de iluminación puntual es un diodo emisor de luz (led).

Breve descripción de las figuras

10 La FIG. 1 muestra una realización del sistema completo que incluye el canal de natación.

La FIG. 2 muestra en detalle la sección del depósito de acumulación.

La FIG. 3 muestra un corte en sección de la realización del canal con sus componentes.

15 La FIG. 4 muestra la realización del canal con otra configuración de la iluminación que ofrece los mismos resultados a los de la FIG. 3.

Descripción detallada de la invención

20 Las FIG. 1, 2 y 3 muestran una primera realización de la invención. La fuente de iluminación es tubular y se dispone longitudinalmente debajo del canal. En la FIG. 4 se puede ver una variante de realización para la fuente de iluminación **2** compuesta por varios elementos luminosos individuales **2b** situados parcialmente alrededor del canal cuya forma geométrica varía.

25 La FIG.1 ilustra una realización de todo el sistema para una mejor apreciación de los elementos conectados y acoplados al canal **1**. Las FIG. 3 y 4 muestran como se adapta en la parte inferior una fuente de iluminación **2a ó 2b** para iluminar dicho canal **1**. El canal tiene la capacidad de difundir de un modo regular la luz que transmite evitando artefactos y ruidos. Permite el paso de la luz creando un ambiente translúcido y homogéneo libre de interferencias.

30 A lo largo de los dos lados de la fuente de iluminación **2a** se han colocado dos pletinas reflectantes **4** que posibilitan que la luz reflejada sobre su superficie incida con la misma intensidad sobre la parte inferior y los laterales del canal **1**. El elemento luminoso longitudinal se extiende a lo largo del canal **1** para lograr una iluminación uniforme con el objeto de homogeneizar e incrementar el contraste de los organismos acuáticos en el canal **1**. Este diseño consigue una iluminación homogénea en toda la superficie inferior del canal, tanto en la parte más baja como en los laterales. Como elemento luminoso se puede emplear un tubo fluorescente **2a**.

35 La distancia entre la fuente de luz y la superficie inferior del canal ha de ser tal que la luz transmitida a través del canal no produzca una sobre-exposición lumínica de la imagen. En el caso de que la fuente de luz la constituyan un conjunto de focos lumínicos **2b**, éstos deberán estar posicionados de modo que la distancia entre ellos no origine diferentes zonas de intensidad lumínica en el canal (i.e. claro-oscuros). El ángulo de inclinación de las pletinas reflectantes con relación a la superficie curva del

canal ha de ser tal que permita que la intensidad de luz reflejada que llega al canal, tenga la misma intensidad en toda la superficie del canal. Tanto el posicionamiento del foco o los focos de luz y/o el ángulo de las pletinas dependen directamente de la intensidad de luz que llega al canal y de que ésta sea homogénea en toda la superficie a su vez. Esta intensidad de luz en el canal, también depende de las propiedades intrínsecas del material con que está hecho el canal.

En la FIG.2 se muestra una sonda de regulación temperatura con termostato **23a** que se sumerge en el interior del depósito de acumulación **12**. Esta unidad controla y mantiene la temperatura deseada estable a lo largo del canal de natación **1**. Otras características físico-químicas como el pH, el oxígeno disuelto, temperatura, etc. se observan mediante la incorporación en el interior del depósito de acumulación **12** de las correspondientes sondas paramétricas **23b**.

En la FIG. 3 se puede apreciar la forma del canal **1** que tiene una sección semi-elíptica con la parte inferior curvada y los laterales planos, cuyos lados están flanqueados por dos escuadras **4**, sujetándolo en toda su longitud. Dos soportes **5** flanquean y fijan esas dos escuadras **4**. Preferiblemente, el grosor de estos dos soportes **5** se rebaja a lo largo de la zona de flaqueo con las escuadras **4** para que la luz inferior procedente de la fuente de iluminación **2** pueda incidir sobre los lados del canal **1**. Por otro lado, al canal **1** se acopla la fuente de iluminación **2** a través de una estructura hueca **6**, que puede ser, por ejemplo, una caja de base rectangular. La estructura **6** dispone en la parte central superior de una ventana o apertura **7** para que llegue la luz al canal de natación **1**. Se puede disponer una referencia métrica **8** para establecer la distancia de natación disponible para el pez. Esta se puede disponer longitudinalmente a un lado del canal y sobre la estructura **6**.

Preferiblemente, entre la estructura **6** que alberga la fuente de iluminación **2a, 2b** y el canal de natación **1**, se dispone una lámina translúcida **9** con el objeto de ayudar a difundir y homogeneizar la iluminación que incide sobre la superficie inferior curva del canal **1**.

La disposición particular de la fuente de iluminación **2a, 2b** y el apropiado direccionamiento de la luz **3** posibilitan una incidencia homogénea de los haces luminosos a lo largo de toda la superficie del canal de natación inundado por agua. La lámina translúcida **9** colabora disminuyendo reflejos y variaciones locales de la intensidad de luz producidas por la fuente de luz **2a, 2b** o las pletinas reflectantes **3**.

El circuito hidráulico se sirve parcialmente de la gravedad para establecer un flujo de agua. El agua que pasa por el canal de natación **1** a un depósito colector **10**. Desde el depósito colector **10**, el agua es elevada por una bomba elevadora **11** a un segundo depósito: el depósito de acumulación **12**. El depósito colector **10** y la bomba elevadora **11** están conectados mediante racores rectos y una primera tubería flexible **13**. La bomba elevadora **11** se conecta con el depósito de acumulación **10** mediante una segunda tubería flexible **14**. El depósito colector **10** está provisto de un detector de nivel **15**, preferiblemente electrónico. El detector de nivel **15** activa la bomba elevadora **11** cuando el volumen de agua vertido sobrepasa un volumen de desbordamiento límite establecido para mantener el caudal de agua constante. Esto hace que la bomba elevadora **11** actúe intermitentemente manteniendo el nivel de agua en el depósito de acumulación **12** estable.

Para conseguir una velocidad del agua constante a través del canal **1**, el detector de nivel **15** activa y desactiva la bomba elevadora **11** ante oscilaciones muy pequeñas del volumen de agua en el depósito colector **10**. Esto posibilita que la columna de agua en el depósito de acumulación **12** fluctúe mínimamente sin afectar la velocidad de salida del agua de éste por gravedad.

El depósito de acumulación **12** tiene una capacidad muy superior a la del depósito colector **10**. Este depósito de acumulación **12** está sobre un soporte elevado **16** con respecto al canal de natación **1**. Cerca de su base, el depósito de acumulación **12** tiene una primera válvula **17a** conectada a una primera manguera **18a**. La manguera **18a** conduce el agua por gravedad hacia un caudalímetro **19**. Otra segunda manguera **18b** de igual calibre conecta el caudalímetro **19** con un extremo del canal de natación **1** mediante dos válvulas **17b**, **17c**.

Para limitar el movimiento del organismo dentro del canal de natación **1**, se han adaptado dos rejillas **20a**, **20b**, una en cada extremo. La rejilla **20b** se fija próxima a la salida de agua (i.e. corriente abajo) del canal **1**, mientras que la rejilla **20a** que está más próxima a la entrada de agua en el canal (i.e. corriente arriba) se puede colocar a distancias variables a lo largo del canal en función del tamaño del pez. Para ajustar estas dos rejillas **20a,20b** dentro del canal **1**, se emplean, por ejemplo, dos secciones de tubería translúcida, una para cada extremo del canal. En cada una de estas dos secciones de tubo, se ha embutido otra sección menor, y entre ambas secciones una rejilla **20a**, **20b** de luz inferior al tamaño del organismo de estudio que se encuentra en el canal de natación **1**.

La primera válvula **17a** acoplada al depósito de acumulación **12**, la segunda válvula **17b** inmediatamente a la salida del caudalímetro **19**, y la tercera válvula **17c** de entrada al canal de natación **1** permiten una regulación conjunta del caudal por gravedad en el caudalímetro **19**. La flexibilidad de las mangueras y el diseño permiten conferir al canal de natación **1** de cierta inclinación con relación a la horizontal (por ejemplo, 4°). Su extremo más elevado es el que está acoplado a la segunda válvula **17b** y el más bajo el que conecta con el depósito colector **10**. La inclinación del canal de natación se puede variar hasta los 0°.

El agua, al entrar por el canal de natación **1**, discurre hacia el depósito colector **10** ayudado por la gravedad producida por el desnivel entre el depósito de acumulación **12** y el canal de natación **1**. El sistema completo es un circuito cerrado de agua con caudal regulado en el canal de natación. Sobre el canal de natación se coloca un sistema de captura de imágenes **21** mediante un soporte "mono-pie" **22**. Este soporte "mono-pie" **22** dispone de regulación de altura. Ello permite colocar la el sistema de captura de imágenes **21** a diferentes distancias sobre el canal **1** en función del tamaño del pez y de la longitud de canal disponible con el objeto de optimizar la definición en el momento de capturar imágenes. La relación entre el tamaño del pez y el canal de natación es muy inferior a la de otros canales de natación conocidos. Esto supone que el pez dispone de mucho más espacio para poder moverse con relación a los otros sistemas. Un mayor espacio para la natación (longitud de canal) permite obtener mayor cantidad de información.

Con las imágenes captadas se realiza un análisis de imagen específico que permite obtener valores de diferentes parámetros de la natación de forma estandarizada sobre los videos grabados. El análisis permite cuantificar la trayectoria del objeto bajo

estudio midiéndose parámetros tales como la distancia recorrida, el patrón locomotor, la velocidad de movimiento, etc.

5 En la FIG. 3 se muestran en más detalle las pletinas **3** que dirigen y homogenizan la luz de tal manera que, a pesar de que la fuente de luz está situada en la parte inferior, el resto del canal queda iluminado con la misma intensidad y homogeneidad que la parte inferior.

En la FIG. 4 se puede ver otra realización para la fuente de luz **2b**, que puede comprender luces individuales tipo leds o fluorescentes colocados a lo largo de toda la superficie del canal **1** y detrás de la lámina translúcida **9** difusora de la luz.

10 La colocación de la fuente de iluminación **2a** ó **2b**. Debe estar lo suficientemente alejada del canal **1** y de la lámina **9** para que no se sature la imagen. Al mismo tiempo, debe estar lo suficientemente cerca para permitir el paso de luz entre la lámina **9** y el canal **1**. En el caso de una fuente de luz múltiple como la de la FIG. 4 los componentes deben colocarse a una distancia adecuada para que distancia entre ellos sea tal que
15 no se produzcan claro-oscuros al pasar la luz a través del canal.

La sección del canal **1** y las diferencias de alturas creadas en el sistema junto con la instalación de válvulas, caudalímetro **19** y detector de nivel **15** permiten ajustar caudales variables, adaptados a la velocidad de natación del organismo.

20 LEYENDAS DE LAS FIGURAS

- 1: Canal de natación
- 2a: Luz tipo fluorescente
- 2b: Luz tipo led
- 25 3: Pletinas reflectantes
- 4: Escuadras
- 5: Soportes
- 6: Estructura hueca
- 7: Apertura
- 30 8: Referencia métrica
- 9: Lámina translúcida
- 10: Depósito colector
- 11: Bomba elevadora
- 12: Depósito de acumulación
- 35 13: Primera tubería flexible
- 14: Segunda tubería flexible
- 15: Detector de nivel
- 16: Soporte elevado
- 17a,17b, 17c: Válvulas
- 40 18a,18b: Mangueras flexibles
- 19: Caudalímetro
- 20a,20b: Rejillas
- 21: Sistema de captura de imágenes

22: "Mono-pie"

23a: Sonda con regulador termostato de temperatura

23b: Sondas paramétricas para medición de pH, oxígeno disuelto y temperatura

REIVINDICACIONES

1. Sistema dinámico para analizar un organismo acuático en una etapa temprana que comprende:

- 5 - un canal de natación (1) abierto,
- unos medios hidráulicos (10,11,12,13,14,15,17a,17b,17c,18a,18b,19,20) acoplados con el canal de natación (1), estando dichos medios hidráulicos configurados para establecer un flujo controlado de agua a través del canal de natación (1),
- 10 - medios para iluminar el canal de natación (1), que comprenden una fuente de iluminación (2a, 2b) y un elemento difusor (9) dispuesto entre la fuente de iluminación (2a, 2b) y el canal de natación (1);

caracterizado por que comprende además:

- 15 - un sistema de captura de imágenes (21) para grabar el movimiento del organismo acuático a lo largo del canal de natación, que comprende un mono-pie (22) con regulación de altura para ajustar la grabación en función del tamaño del pez y de la longitud del canal,

donde los medios para iluminar el canal comprenden además unas pletinas reflectantes (3) que dirigen la luz de la fuente de iluminación (2a, 2b) hacia la superficie inferior y lateral del canal de natación (1), donde la fuente de iluminación está situada a lo largo y debajo del canal (1), de forma que la luz se transmite homogéneamente en el canal de natación (1), donde el canal de natación (1) es translúcido, de sección semi-elíptica y con las partes laterales planas.

20

2. Sistema según la reivindicación 1, caracterizado por que los medios hidráulicos están configurados para establecer un flujo de agua variable.

25

3. Sistema según la reivindicación 2, caracterizado por que los medios hidráulicos comprenden: un depósito colector (10) para recoger por gravedad el agua del canal de natación (1), una bomba elevadora (11) para elevar el agua hasta un depósito de acumulación (12), donde el depósito de acumulación (12) dispone de capacidad superior a la del depósito colector (10) y está situado sobre un soporte elevado (16) con respecto al canal de natación (1) y al depósito colector (10).

30

4. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la fuente de iluminación es un tubo fluorescente (2a).

35

5. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, caracterizado por que la fuente de iluminación comprende una pluralidad de elementos luminosos puntuales distribuidos alrededor del canal (1).

40

6. Sistema según reivindicación 5, caracterizado por que la fuente de iluminación puntual es un diodo emisor de luz (2b).

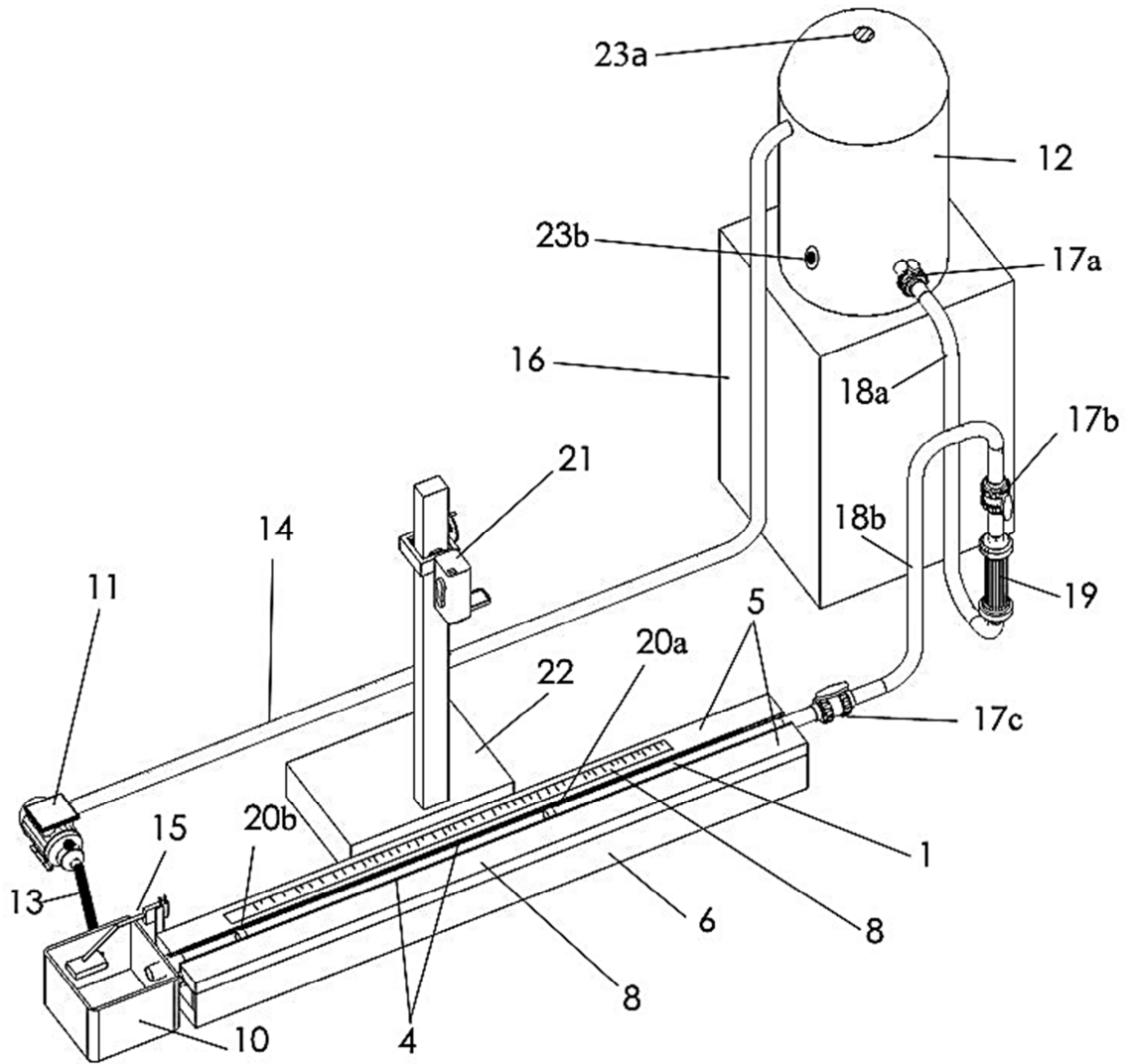


FIG. 1

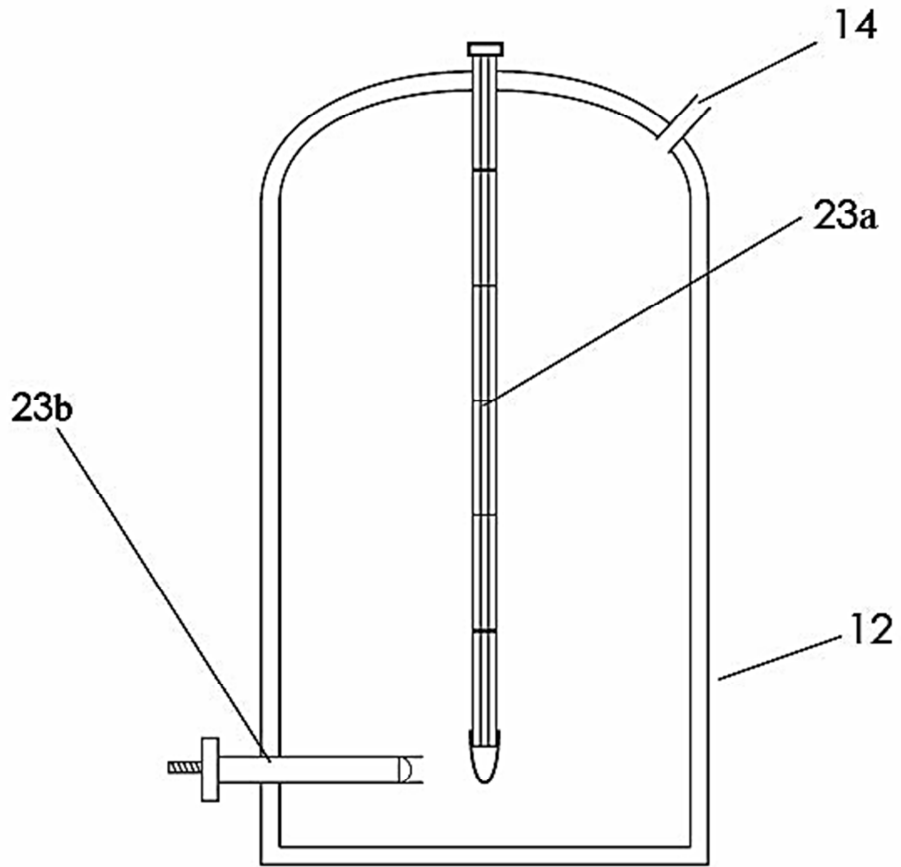


FIG. 2

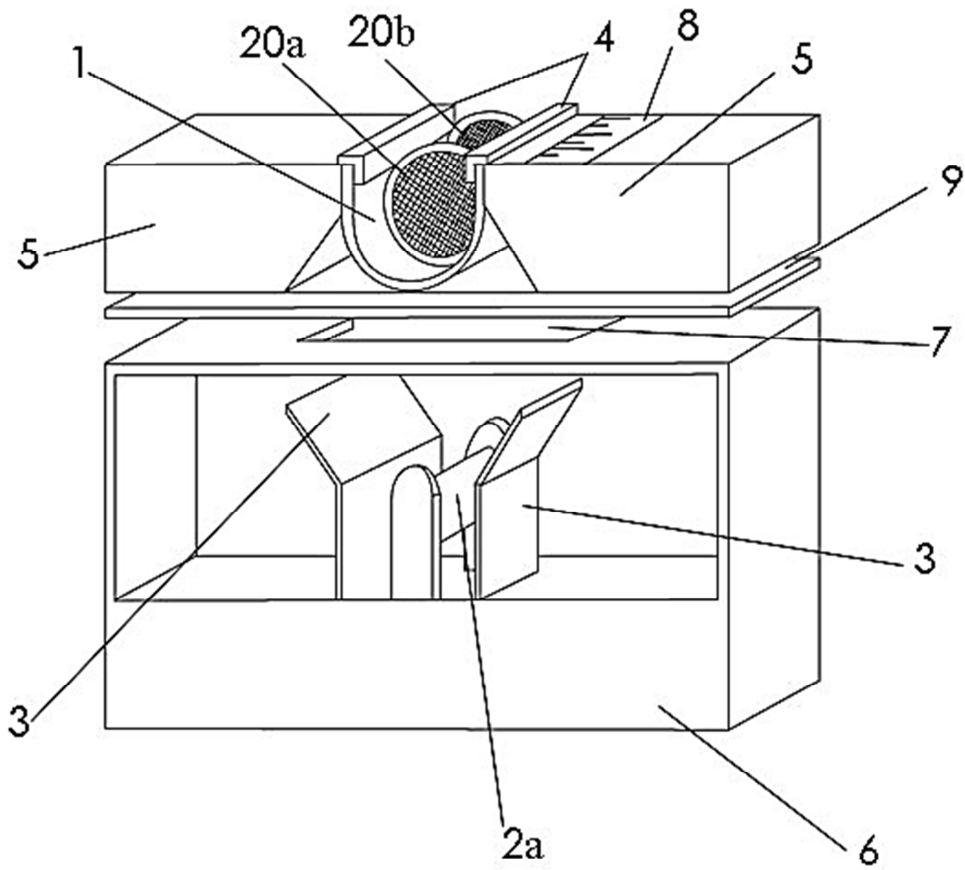


FIG. 3

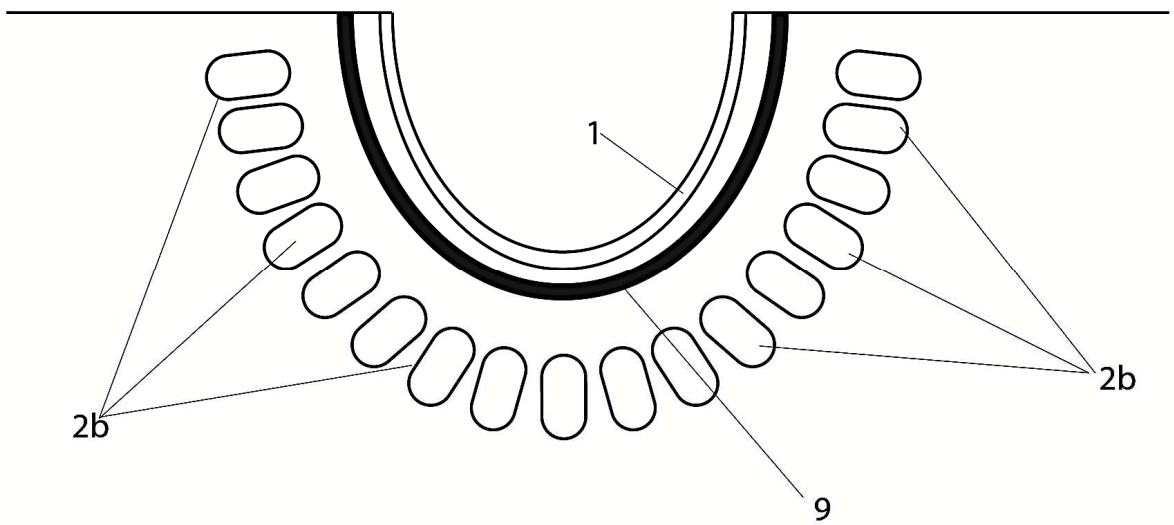


FIG. 4



- ②① N.º solicitud: 201530256
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.02.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K61/00** (2006.01)
G06T7/20 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 4888703 A (HITACHI ENGINEERING CO. LTD.) 19.12.1989, columna 3, línea 50 – columna 5, línea 14; figuras 1-2.	1,3-10
Y		2
Y	US 5222458 A (PIPPY JOHN H. C.) 29.06.1993, columna 2, línea 33 – columna 5, línea 22; figuras.	2
A		1,7-10
A	US 5903305 A (ANIMA ELECTRONICS CO. LTD.) 11.05.1999, resumen; reivindicación 1; figuras.	1,3-4,6
A	US 4626992 A (MOTION ANALYSIS SYSTEMS INC.) 02.12.1986, reivindicación 1; figuras 1-2.	1,3-4,6
A	CN 201275149 Y (NANJING HYDRAULIC RES. INSTITUTE) 22.07.2009, páginas 1-7.	1,3-4,6
A	CN 101011042 A (JINAN UNIVERSITY) 08.08.2007, páginas 1-7.	1,3-4,6
A	FAIZ AW, LEON-KLOOSTERZIEL KM, GORT G, SCHULTE-MERKER S, VAN LEEUWEN JL, et al. (2012) Swim-Training changes the spatio-temporal dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish larvae (Danio Rerio). PLoS ONE 7(4): e34072. doi:10.1371/journal.pone.003407218/04/2012. Apartado "Materials and Methods", figura 6A.	1,3-4,6
A	WARD DL, MAUGHAN OE, BONAR SA. (2002) A variable-speed swim tunnel for testing the swimming ability of age-0 fish. North American Journal of Aquaculture 64: 228-231, 2002.	1,3-4,6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.10.2015

Examinador
J. Cuadrado Prados

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K, G06T

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PAJ.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: **02.10.2015**

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-10	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4888703 A (HITACHI ENGINEERING CO. LTD.)	19.12.1989
D02	US 5222458 A (PIPPY JOHN H. C.)	29.06.1993

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a un sistema de natación que emplea un canal de agua para estudiar el comportamiento de organismos acuáticos, más concretamente, un sistema consistente en un canal de natación con un diseño que permite, mediante un dispositivo de grabación convencional de imágenes digitales de alta resolución, una evaluación cuantitativa de la respuesta de organismos acuáticos, de tamaño muy reducido y con escasa pigmentación, frente a un agente externo como es un flujo o caudal controlado de agua.

Según se desprende de la solicitud, en el estado de la técnica son conocidos diferentes aparatos para valorar el comportamiento y la fisiología de la natación en distintos peces con tamaño mínimo superior a los 20 mm, generalmente opacos y con una clara pigmentación del cuerpo (**página 2, líneas 28-30**), y que, en general, presentan el problema de que *“no permiten establecer valoraciones cuando el tamaño del organismo es muy reducido o bien dispone de poca pigmentación. Por ello, peces en etapas tempranas escapan a cualquier análisis cuantitativo”* (**página 2, líneas 31-33**).

La solicitud pretende solucionar el problema planteado mediante un *“sistema que permita analizar de un modo cuantitativo el comportamiento y la capacidad de natación contracorriente de organismos acuáticos que presentan tamaños muy reducidos, escasa pigmentación (i.e. coloración) y capacidad de movimiento a altas velocidades y fuertes aceleraciones con relación al tamaño cuando son sometidos a un flujo de agua con velocidad controlada”* (**página 4, líneas 13-17**).

Se considera que el objeto de la invención que se desprende de la **reivindicación principal carece de novedad** por estar comprendida en el estado de la técnica, ya que el **documento D01** citado en el Informe (IET) anticipa el objeto de la invención que se deriva de la **definición genérica y poco concreta** de esa reivindicación. En ese documento (**las siguientes referencias entre paréntesis se aplican al mismo**) se anticipa un:

- Sistema dinámico (**figuras 1-2**) para analizar un organismo acuático (**columna 1, línea 12-13, por ejemplo**) que comprende:
 - un canal de natación abierto (**24, figuras 1-2**),
 - unos medios hidráulicos (**20, 22, 32**) acoplados con el canal de natación (**24**), estando dichos medios hidráulicos configurados para establecer un flujo controlado de agua (**columna 4, líneas 16-25**) a través del canal de natación (**24**),
 - medios para iluminar (**36**) el canal de natación (**24**), que comprenden:
 - una fuente de iluminación (**36**), un elemento difusor (**34**) dispuesto entre la fuente de iluminación (**36**) y el canal de natación (**24**) de forma que la luz se transmite homogéneamente (**columna 4, líneas 26-29, 58-68**) en el canal de natación (**24**).

Según la descripción de la solicitud, se entiende por sistema dinámico aquel que *“permite someter a peces u otros organismos acuáticos a corrientes de agua con caudales o flujos controlados. El diseño de estos sistemas se basa en la entrada y la salida del agua que atraviesa un compartimento o canal en el cual se ubica el organismo”* (**página 2, líneas 21-24**). Por lo tanto, el sistema descrito en D01 es dinámico, y por otro lado, el canal de natación es abierto y la entrada de agua al mismo por su parte superior (**figura 1**) y su salida por la tubería de desagüe (**32**), junto con la bomba (**22**) incorporada en el sistema, permitirían establecer un flujo controlado de agua a través del canal de natación.

Así pues, el documento **D01 contiene todas las características técnicas de la reivindicación primera, por lo que esta no es nueva**, y por lo tanto no cumple los requerimientos del artículo 6.1 de la Ley de Patentes (LP 11/1986).

Las **reivindicaciones dependientes segunda a décima** añaden unas características opcionales que, por no estar incluidas en la principal, deben ser consideradas no esenciales y dan lugar a modos particulares de realización. Se estima que estas reivindicaciones, en combinación con la reivindicación primera de la que dependen, **carecen de actividad inventiva** por las siguientes razones:

Reivindicación segunda: Incorpora la característica de que los medios para iluminar el canal comprenden además unas *“pletinas reflectantes que dirigen la luz de la fuente de iluminación hacia la superficie inferior y lateral del canal de natación”*.

Según se desprende de la solicitud, el objeto o efecto técnico perseguido con la incorporación de estas pletinas reflectantes es posibilitar *“que la luz reflejada sobre su superficie **incida con la misma intensidad** sobre la parte inferior y los laterales del canal... Este diseño consigue una **iluminación homogénea** en toda la superficie inferior del canal, tanto en la parte más baja como en los laterales”* (página 5, líneas 29-35), de modo que *“el ángulo de inclinación de las pletinas reflectantes con relación a la superficie curva del canal ha de ser tal que permita que la intensidad de luz reflejada que llega al canal, tenga **la misma intensidad** en toda la superficie del canal”* (página 5, línea 42-página 6, línea 2). Esto es, el efecto técnico producido por esa característica adicional (pletinas) es conseguir una iluminación homogénea con la misma intensidad en todo el canal.

Sin embargo, el **documento D02 (véanse las partes citadas en el IET)** presenta un aparato para monitorizar los movimientos de un organismo acuático (**título**) en el que se anticipa la incorporación de pletinas reflectantes (**15, 15a, 16, 16a**) que dirigen la luz de la fuente de iluminación hacia la superficie inferior y lateral del canal de natación (**ver columna 3, líneas 40-47, columna 4, líneas 16-31**). Este documento D02 incorpora pletinas reflectantes para conseguir una iluminación brillante y uniforme, y como D02 pertenece al mismo campo tecnológico (**sistemas para analizar los movimientos de un organismo acuático**), resultaría evidente para un experto en la materia incorporar las pletinas reflectantes anticipadas en D02 al aparato de monitorización de D01, destruyendo la actividad inventiva de la reivindicación segunda de la solicitud.

Reivindicación tercera: se puede considerar que **carece de actividad inventiva** ya que resulta evidente dotar de una *“longitud variable”* al canal de natación en función de variables tales como el tamaño del pez.

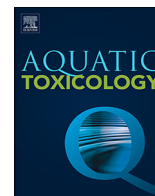
Reivindicación cuarta: el canal anticipado en D01 es rectangular con paredes laterales planas y fondo recto, y parece que una *“forma semi-elíptica con partes laterales planas”* y una superficie inferior curva, estaría al alcance de manera evidente para un experto en la materia como una opción de diseño, sobre la que no se indica o insinúa en la solicitud un posible efecto técnico particular derivable de la misma. El solicitante no explica porque la forma propuesta para el canal no es solo una selección y debiera ser considerada fuera del alcance para un experto en la materia debido a un efecto técnico especial.

Reivindicación quinta: Añade la característica de que el canal de natación es translúcido, al igual que el elemento difusor dispuesto entre la fuente de alimentación y el canal. Ya que D01 incorpora ese elemento difusor translúcido (**34**) que difumina la luz (**columna 4, líneas 26-27**), parecería evidente para un experto en la materia considerar la posibilidad de hacer el canal de un material translúcido con el mismo propósito.

Reivindicación sexta: Resulta evidente que *“los medios hidráulicos puedan establecer un flujo de agua variable”* en el aparato anticipado en D01.

Reivindicaciones séptima a décima: Incorporan características relativas al tipo de fuente de iluminación y se consideran no inventivas y al alcance de un experto en la materia como meras opciones de diseño tendentes a conseguir una iluminación uniforme. En D01 se intuye (**figura 1**) que la fuente de iluminación (**36**) puede ser uno o varios tubos fluorescentes, que en el modo de realización de la figura 2 se sitúan a lo largo y debajo del canal (**reivindicaciones 7 y 8**). Cualquier experto en la materia consideraría de forma evidente la posibilidad de incorporar como alternativa elementos luminosos puntuales distribuidos alrededor del canal, y que estos sean del tipo diodo emisor de luz o LED (**reivindicaciones 9 y 10**).

ANEXO II



Stage-dependent effects of chlorpyrifos on medaka (*Oryzias latipes*) swimming behavior using a miniaturized swim flume

Salvador Sastre, Carlos Fernández Torija, Irene Atiénzar Pertusa, Eulalia María Beltrán, María Victoria Pablos, Miguel González-Doncel*

Laboratory for Ecotoxicology, Department of the Environment, National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, A-6, Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Chlorpyrifos
Forced swimming
Locomotor analysis
Small fish models
Swimming behavior
Swim flume

ABSTRACT

By considering chlorpyrifos (CPF), an organophosphorus pesticide with known mechanisms of action that affect neurobehavioral development, we assessed the validity and sensitivity of a miniaturized swim flume by investigating the effects of the insecticide on swimming behavior in medaka (*Oryzias latipes*) fish growing stages. Medaka in three developmental periods, namely 0, 20 and 40 day-old post-hatch (i.e. time points 0, 20 and 40, respectively), were exposed to CPF (12.5, 25, 50 and 100 µg/L) for 48 h under semi-static conditions. The CPF half-lives during exposures were evaluated and the swimming patterns in a flume section (arena) were presented on two-dimensional gradient maps of forced movement of fish against water current. A comparative numerical analysis of fish residence times between each time point control and the corresponding CPF groups was performed by dividing arenas into 15 proportional areas. The time point 0 control group gradient map showed a noticeably different swim pattern from those of the ≥ 12.5 µg CPF/L groups, which was statistically supported by the differences for residence times seen in ≥ 12 corresponding areas. The control group gradient maps for time points 20 and 40 differed from those of the respective ≥ 12.5 µg CPF/L groups. The comparative analysis of the residence times in the corresponding 15 areas revealed differences in ≥ 5 areas for time point 20 and in ≥ 3 areas for time point 40. The integrative analysis of the gradient maps and the numerical statistics revealed stage-specific effects and a concentration-response relationship between CPF and alterations on forced medaka swimming despite the dissipation of CPF from the water column. These results indicate the validity of the miniaturized swim flume toward a more environmentally realistic scenario for the evaluation of neurodevelopmental and behavioral toxicity in small fish models.

1. Introduction

Environmental risk assessments have arisen as an essential tool originally needed to gain knowledge on the potential harmful effects of chemical substances on ecosystems. More specifically, the aquatic environment is a highly relevant scenario since most pollutants tend to end up either suspended in the water column or attached to sediments in water ecosystems (Mackay et al., 1992a,b; Tanabe et al., 2004). In these ecosystems, fish represent a paradigm as their ecological role is the repository of a myriad of chemical substances.

Within the framework of conventional ecotoxicity tests, small aquarium fish such as fathead minnow (*Pimephales promelas*), medaka (*Oryzias latipes*) and zebrafish (*Danio rerio*), have been paid considerable attention as alternative models (Bunton, 1996; Baumann and

Okihiro, 2000; Law, 2003). Their amenability has allowed a large array of warning signals, or exposure endpoints, to be developed. In particular, behavioral endpoints are of ecological relevance, as they affect individual fitness by impairing population dynamics (Brodin et al., 2014) thus allowing a better assessment of adverse effects on ecosystems (Weichert et al., 2017). A literature search has revealed that many works and reviews address different types of behavior as indicators of neurobehavioral toxicity that results from exposures to numerous chemicals, including solvents, organometals, halogenated aromatic compounds and pesticides (e.g. Marcucella and Abramson, 1978; Drummond and Russom, 1990; Barron, 2002; Scott and Sloman, 2004; Gerhardt, 2007). Of all types, swimming is arguably the most easily unbiased behavioral endpoint, as it is also the most basic and obvious activity that can be quantitatively defined. Swimming studies using fish

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; CPF, chlorpyrifos; dph, day-old post-hatch; DMSO, dimethyl sulfoxide; ELS, early life stages; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; MeOH, methanol; MTBE, methyl *tert*-butyl ether; OP, organophosphate; TWAC, time-weighted average concentration; w.w., wet weight

* Corresponding author.

E-mail address: miguelgd@inia.es (M. González-Doncel).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.008>

Received 24 February 2018; Received in revised form 9 April 2018; Accepted 15 April 2018

Available online 21 April 2018

0166-445X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

have been, and still are, based on a qualitative or a semi-quantitative analysis, which spells difficulties when performing data analyses. However, the introduction of computer-based automated imaging systems is allowing the efficient quantification of many parameters in swimming behavior (Kato et al., 2004; Kane et al., 2005; Gerhardt, 2007).

Among the numerous chemicals that result in neurobehavioral toxicity syndromes in fish, pesticides and, more specifically, organophosphate (OP) and carbamate insecticides, have traditionally been of particular interest, because they are currently the most widely used pesticides in the world (Rohlman et al., 2011). These substances are likely to end up in the aquatic compartment mainly by accidental discharge and surface runoffs (Williams et al., 2014). Studies linking biochemical biomarkers with behavioral endpoints in fish are well documented as an effort to elucidate the physiological mechanisms that underly behavioral alteration (Beauvais et al., 2001; Brewer et al., 2001; Almeida et al., 2010; Oliveira et al., 2013). Chlorpyrifos (O, O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, [CPF]) is a diethyl phosphorothionate OP insecticide that becomes toxic once metabolically activated within the organism by inhibiting the acetylcholinesterase (AChE) (Fukuto, 1990). Numerous studies have demonstrated the high toxicity of CPF to fish and have linked changes in AChE activity with altered fish swimming performance (e.g., Pérez et al., 2013; Khalil et al., 2013; Giddings et al., 2014; Jin et al., 2015). These and other related studies have used different types of motor behaviors as endpoints during specific developmental fish life periods from observations made primarily in still and constrained environments in which artificial stimuli, such as tapping or light stimulation have been used to induce fish responses (Rice et al., 1997; Levin et al., 2004; Khalil et al., 2013, 2017; Qiu et al., 2017). While these methods offer useful and quantifiable data, they neglect fish's actual potential to respond and adapt to a richer, more realistic and dynamic environment. When fish are placed in a water current, they generally show rheotactic behavior (ability to orientate in current), which allows them to hold a stationary position or to look for shelter to elude excess current, to detect prey or to avoid predators (Froehlicher et al., 2009; Elder and Coombs, 2015). Hence if properly designed, water flows can be used to evaluate fish's physical and physiological condition, which allows the assessment of swimming performance and capacity as endpoints of swimming behavior in various growing phases.

Different swim tunnels or flumes with flowing water for studying fish swimming behavior, physiology and performance have been developed in recent years (Ward et al., 2002; Vieira et al., 2009; Fiaz et al., 2012). However, reluctance to implement fish flumes to assess fish swimming as a behavioral response to neurotoxic action has been shown. Factors such as cost, comprehensible and easy-to-implement methods, plus difficulties in flume miniaturization for early life stages (ELS) or small fish species, have stopped swim flumes from becoming practical tools for ecotoxicological testing (Weichert et al., 2017).

Hence, by using CPF as a known mode of neurobehavioral toxic action substance, we sought to evaluate the validity and sensitivity of a dynamic miniaturized swimming apparatus developed by our group (González-Doncel et al., 2015). This device, assisted by variable flow rates and arena lengths, allows fish movement and swimming strategies in different life stages of small fish model species that can be tracked to model surface gradients (i.e. gradient maps) of its positioning along the flume. Using medaka, swimming behavior was evaluated in three stages during its growing period when fish were exposed to CPF. The trends of surfaces in relation to the CPF concentration were analyzed and compared, and the overall results were compared with previous literature.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and chlorpyrifos analysis

CPF (CAS 2921-88-2) was obtained neat from Sigma (Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A concentrated stock solution (1 µg CPF/µl dimethyl sulfoxide [DMSO]; > 99.9%; Sigma Chemical Co.) was made and aliquoted in borosilicate chromatographic vials to store at -20 °C. This stock solution was diluted to 1:100 with dechlorinated system water used to maintain the medaka stock colony (see Section 2.2 Test organism and experimental design) to make a 10 µg of CPF/ml H₂O. Using this working solution, four nominal CPF water dilutions (12.5, 25, 50 and 100 µg/L) were selected as the treatment concentrations based primarily on published studies with comparable experimental procedures performing fish acute CPF exposures (see Section 4. Discussion). In all the CPF treatments, the DMSO concentrations did not exceed 0.01% v/v.

The actual concentrations and half-lives of CPF in the test chambers were assessed before performing the behavioral assays. To simulate comparable experimental conditions like those used in the behavioral assays, growing medaka fish (i.e. 20-40 day-old post-hatch -dph-; mean mass 6.53 ± 3.33 mg, expressed as mean ± S.D. wet weight -w.w.-) were maintained in groups of five with 50 ml of each CPF exposure dilutions (12.5, 25, 50 and 100 µg/L). Three replicates (test chambers) were included for each concentration and incubation period. The incubation conditions were those described below (see Section 2.2 Test organism and experimental design). The actual concentrations of the four nominal CPF dilutions were measured at 0, 6, 12 and 24 h after incubations started by collecting a volume (10 ml) from each replicate. The CPF analysis in each replicate was performed following the procedures described by López-Mancisidor et al. (2008). Briefly, CPF was extracted from samples by solid phase extraction (Strata-XTM 33 HLB cartridges 6 ml, 200 mg/ml; Phenomenex 8B-S100-FCH). Cartridges were conditioned with 6 ml of methyl *tert*-butyl ether/methanol (MTBE/MeOH, 90/10 v/v), 6 ml of methanol and 6 ml of Milli-Q water. A 10 ml sample volume was loaded in the cartridge, and CPF was eluted with 10 ml of MTBE/MeOH (90/10) into glass centrifuge tubes and evaporated to dryness before re-dissolution in 1 ml of MTBE/MeOH (90/10). Then CPF was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). One microliter of each sample was injected in the splitless mode into the GC system (6890 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipped with a 5973 network mass-selective detector and an Agilent 19091J-413, HP-5 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness column. Helium was maintained at a constant flow of 1.2 ml/min and the column temperature was programmed from 60 °C (initial equilibrium time of 1 min) to 300 °C with 30 °C/min increments and was maintained at 300 °C for 3 min. MS was operated in the selected ion-monitoring mode for the quantitative analysis (197, 199 y 314 m/z). Quantification was performed by the external standard procedure (fortified samples 6.25–100 µg CPF/L). The method limits of CPF quantification and detection were respectively set at 1 µg/L and 0.3 µg/L and were calculated as the concentration that gave a peak with a signal-to-noise ratio of 3–10.

2.2. Test organism and experimental design

Golden medaka embryos were obtained from our stock culture, maintained in a closed recirculating system under a constant light cycle of 15 h of light, and a temperature of 25 ± 1 °C. Three 48-hour CPF exposure challenges were considered in the growing medaka to evaluate swimming behavior, namely the 0–2 dph eleutheroembryo stage (*time point 0*), and the 20–22 and 40–42 dph juvenile stages (*time points 20* and *40*, respectively; Fig. 1).

For the time point 0 exposure challenge, approximately 100 synchronized-aged embryos were collected, separated and incubated at 25 °C until hatching. The resulting eleutheroembryos (mass 0.68 ± 0.014 mg w.w.) were distributed (n = 5) by stratified random assortment into 100-ml capacity glass chambers with 50 ml of all four CPF exposure dilutions (12.5, 25, 50 and 100 µg/L). For the time points 20 and 40 challenges, roughly 500 embryos were collected over a 2-day period. Once hatched, groups of 250 eleutheroembryos (0–2 dph aged)

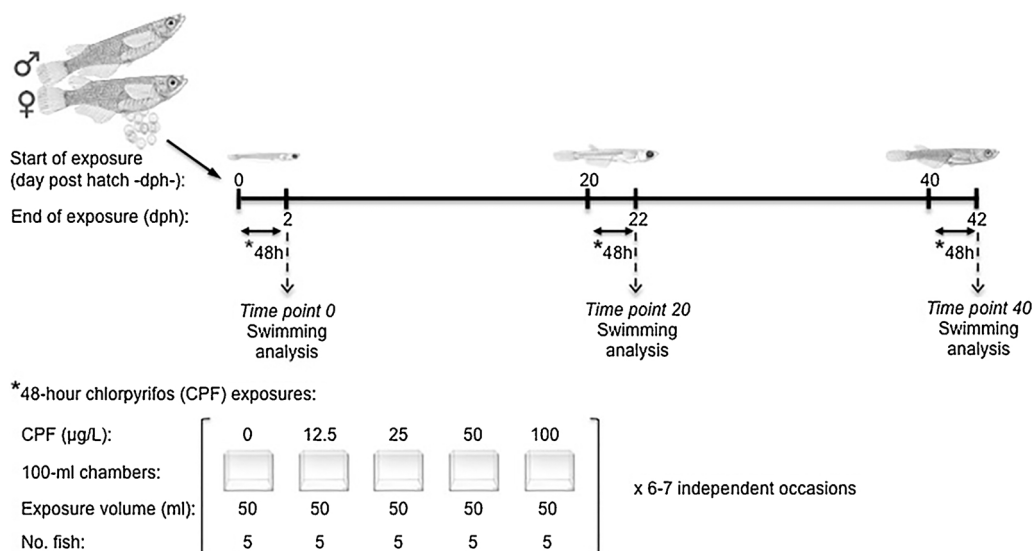


Fig. 1. Experimental design for the three CPF 48-h waterborne exposure challenges while medaka fish grew and the subsequent swimming trials. Fish pictures of developmental stages were obtained from Iwamatsu (1994). This procedure was repeated on six to seven independent occasions for each time point so that the 25 fish tested for swimming behavior on each occasion resulted in 150–175 fish for each time point (450–525 fish for the three time points; $n = 30\text{--}35/\text{treatment}$).

were transferred to two tanks with 8-L capacity of a flow through system (18 ml/min flow rate per tank; 15 l; 9 D; $25 \pm 1^\circ\text{C}$) that received the same water as that used for the stock culture. Eleutheroembryos were fed *ad libitum* twice daily (Spirulina powder) for the first 4–7 days. Thereafter, food (mix of Spirulina and ground Tetramin flakes) was adjusted to 15% body weight and every 10 days with fish development according to increasing fish weight. The basic water quality parameters were evaluated every 10 days to assure their feasibility for growing medakas. Twenty and 40 days later (time points 20 and 40, respectively), the groups of 30 fish/tank that displayed normal swimming and foraging activity (mass 5.37 ± 3.18 and 14.24 ± 9.19 mg w.w. for the time point 20 and 40 fish, respectively) were distributed ($n = 5$) by stratified random assortment into the 100-ml capacity glass chambers with 50 ml of all four CPF exposure dilutions. An additional chamber was included, which consisted in fish ($n = 5$) in the system water in combination with the vehicle (50 ml, 0.01% DMSO). All the incubation media were renewed early in the morning every 24 h including the day that the swimming behavioral trials were done. All the CPF exposures were performed with no food addition and were repeated on six to seven separate occasions ($n = 30\text{--}35$) from May 2016 to November 2017. The preliminary behavioral assays that used the swim flume showed that the solvent DMSO did not significantly affect swimming activity at the given concentration of 0.01%.

2.3. Swim flume design and setup

A miniaturized swim flume adapted to a closed recirculating system (González-Doncel et al., 2015), was used to assess swimming activity at time points 0, 20 and 40 (see Fig. S1, Supplementary Information). A constant flow along the flume was maintained by a gravity-fed water system. Briefly, the flume was made with Teflon tubing, opened longitudinally and placed over a lighting unit. A flowmeter, connected to a pair of valves, controlled the water flow along the flume. A thermostatic heater in a reservoir placed above the flume maintained the water temperature constant along the circuit ($26\text{--}27^\circ\text{C}$). An arena was delimited in the flume for testing fish swimming for which two round polyethylene terephthalate screens (500-µm opening), attached to clear flexible vinyl rings, were positioned at different distances away from one another depending on the particular time point and the pixel definition requirements according to the fish's size during the video recordings (see Section 2.4 *Swimming activity assessment*). The thickness of these rings, together with the narrow opening of the screens reduced, but did not eliminate water turbulence or cavitation in the arena (see

the flow laminarity tests below). The water from the flume was drained into a sump and an electrical pump drove the water up and back to the reservoir.

2.4. Swimming activity assessment

The swimming behavioral trials were performed at the end of all the three 48-h CPF exposure challenges (Fig. 1). The 3.2, 8.1 and 8.6 cm/s water velocities for time points 0, 20 and 40, respectively, were selected according to Brett's methods (Brett, 1964). By these methods a critical swimming speed is determined that forces fish to swim actively for extended periods. Modifications were made given the intrinsic limitations of the open design of this flume. Briefly, for each developmental period that corresponded to the three time points, pools of untreated fish ($n = 25$) in groups of five were subjected to water velocity increments, which ranged from 0.4 to 2.2 cm/s at 6-min intervals to record the progressive number of fatigued fish dragged to the downstream screen for > 5 s (Fig. S2, Supplementary Information). The 3.2, 8.1 and 8.6 cm/s water velocities selected for the swimming tests at time points 0, 20 and 40, respectively, were below the observed 60% fatigue percentages.

Three arena lengths, 150, 220 and 300 mm, available for swimming at respective time points 0, 20 and 40, were selected based on two aspects: first, the arena length available for swimming was ≥ 30 times the mean fish length for the tested developmental period (time point). This length should allow fish plenty of space to adopt swimming patterns including bursting-gliding, bursting-coasting or downstream drifting movements during the swimming trials. Second, the number of pixels that represented the fish for a specific video frame ranged between 3 and 6 square pixels. This pixel range allowed the video tracking software to precisely identify the fish trajectory.

Water behavior at velocities 3.2, 8.1 and 8.6 cm/s along the flume was evaluated by injecting a thin stream of a potassium permanganate solution at the port of entry. The dye that moved along the arena at 3.2 or at 8.1 cm/s revealed overall laminar flows (see the respective Videos S1 and S2, Supplementary Information). Increasing the water velocity to 8.6 cm/s resulted in a transitional flow pattern state with turbulence shedding primarily along the upstream sector of the arena (see Video S3, Supplementary Information). All in all, the three water velocities showed zones near the upstream screen with minor water retention generating wakes of light turbulences, and zones near the downstream screen with moderate water retention before leaving the flume.

Swimming activity was assessed in all four exposure challenges and in the solvent (0.01% DMSO) control group. Swimming trials were

performed during the same daily time interval to minimize potential variations due to differential diurnal activity. Individual fish were placed sequentially in the arena and were allowed to acclimate at a minimal water velocity (≤ 1 cm/s) until they adopted a stable position. Then the water flow was adjusted to the prescribed speed for each developmental period (time point) and locomotor activity was recorded for 6 min with a video camera placed stationary above the arena (Canon Legria HF R36 [Tokyo, Japan], 25 frames per second, HD; 1920×1080 pixels). Each CPF-exposure challenge (i.e. time point) comprised a full recording experimental time of approximately 1000 min for all fish in the four treatments and the solvent (0.01% DMSO) control [(25–40 fish/treatment \times 6 min recording time) \times 5 treatments \approx 16 h]. Consequently, the three exposure challenges summed approximately 3000 min of actual recording time.

2.5. Swimming data processing and quantification of the relative distances traveled

Videos were analyzed quantitatively with Ethovision XT 9 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). The three arenas for time points 0, 20 and 40 corresponding to two-dimensional surfaces of 3750, 5500 and 7500 mm², respectively, were divided into equal 5 \times 2.5 mm gridlines, which respectively gave data matrices of 300, 440 and 600 elements, respectively (Fig. 2). The average percentage of time spent by fish in each element (i.e. presence) per treatment was obtained in all four CPF-exposure challenges. Presence of fish along the arena was represented in the form of surface gradient maps using a probabilistic contour-mapping program for the two-dimensional spatial data based on a geostatistical approach that determines spatial correlations among elements (Surfer 2.0, Golden Software, Golden, Colorado, USA).

Under natural conditions, fish hold their position when the absolute velocities of fish and flowing water are equal in magnitude, but opposite in direction. Hence the swimming distances recorded by the tracking software were calculated and assumed to be relative distances.

2.6. Statistical data analysis

A numerical statistical comparison of fish positioning in different areas in the arena was made for each exposure challenge between the

solvent control group and each CPF treatment. The arena was divided into 15 areas, each comprising a specific number of the neighboring elements contained in the matrix (Fig. 2). This division criterion was based on the shear force between two layers moving at different speeds (i.e. moving water and the flume's walls) and proximity to the upstream and downstream screens perturbing the normal water velocity. The fish residence times in these areas were then obtained by adding the presence time values for each element within each area, averaged to a percentage value. The data for the residence values within areas and the relative distances were log-transformed and analyzed for both normality and homogeneity of variance. The Kruskal-Wallis test was applied and the Mann-Whitney U test with Bonferroni correction was performed to identify any significant differences between the CPF treatments and the solvent control ($P < 0.05$). All the statistical analyses were run with the Statistical Package for the Social Sciences Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). These residence data themselves are assumed to be discrete values in that they cannot show any spatial correlations among the individual presence data for each neighboring element in the matrices. Therefore, both endpoints, presence in the form of gradient maps and residence values within critical areas, offered complementary information.

3. Results

3.1. Analytical chlorpyrifos measurement

The half-lives and time-weighted average concentrations (TWACs) for the assayed CPF concentrations are presented in Fig. S3 (Supplementary Information). Regardless of concentration, the CPF present in solutions lowered to $> 45\%$ of the initial levels after 24-h of incubation. Hence, the CPF present in the exposure chambers did not remain stable despite the 24-hour renewals. The actual CPF levels at 0 h averaged from 19% to 56% of the respective 25 $\mu\text{g/L}$ and 50 $\mu\text{g/L}$ nominal concentrations. These deviations were always positive (i.e. the CPF concentration was higher than the respective nominal concentration) and were inevitably due to variations occurring during the experimental procedures. Despite evidence for CPF dissipation in the test chambers, for the sake of practicality the nominal concentrations were used to describe the experiments below.

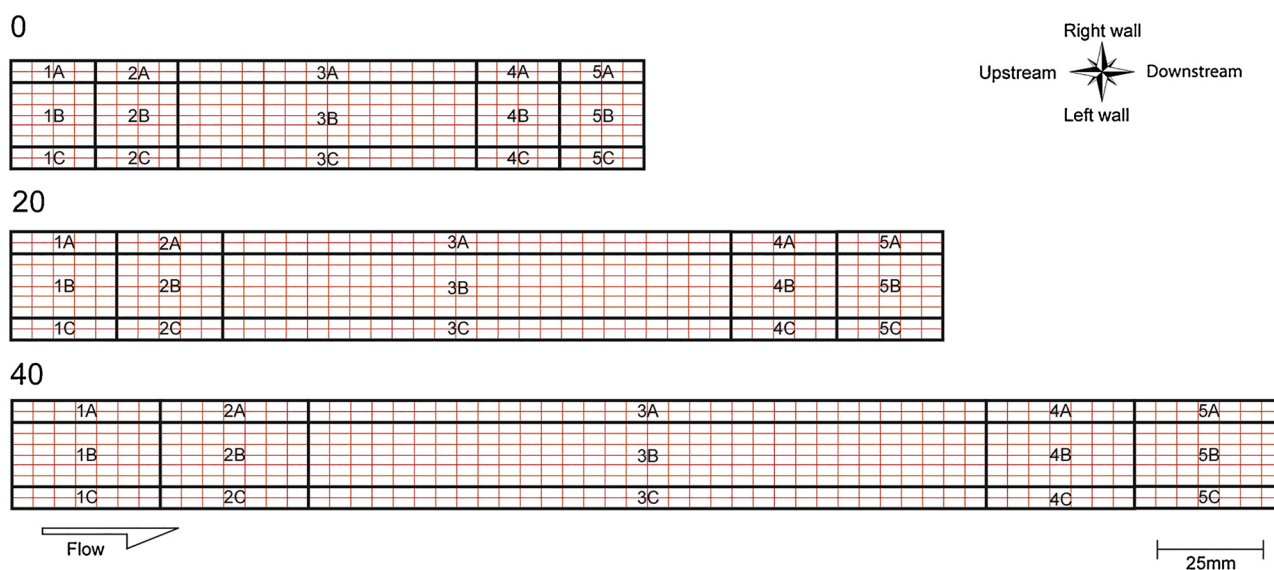


Fig. 2. Representation of the two-dimensional surfaces of the arenas delimited within the flume for the swimming trials at time points 0, 20 and 40. The thin and light gridlines show the 5 \times 2.5 mm elements that resulted in 300, 440 and 600 elements for each respective time point arena. This sectional division was implemented into a geostatistical approach to generate the surface gradients of fish position. The dark thick gridlines containing varying numbers of elements divide each arena into 15 areas, named accordingly. The arrow shows the water movement direction along arenas.

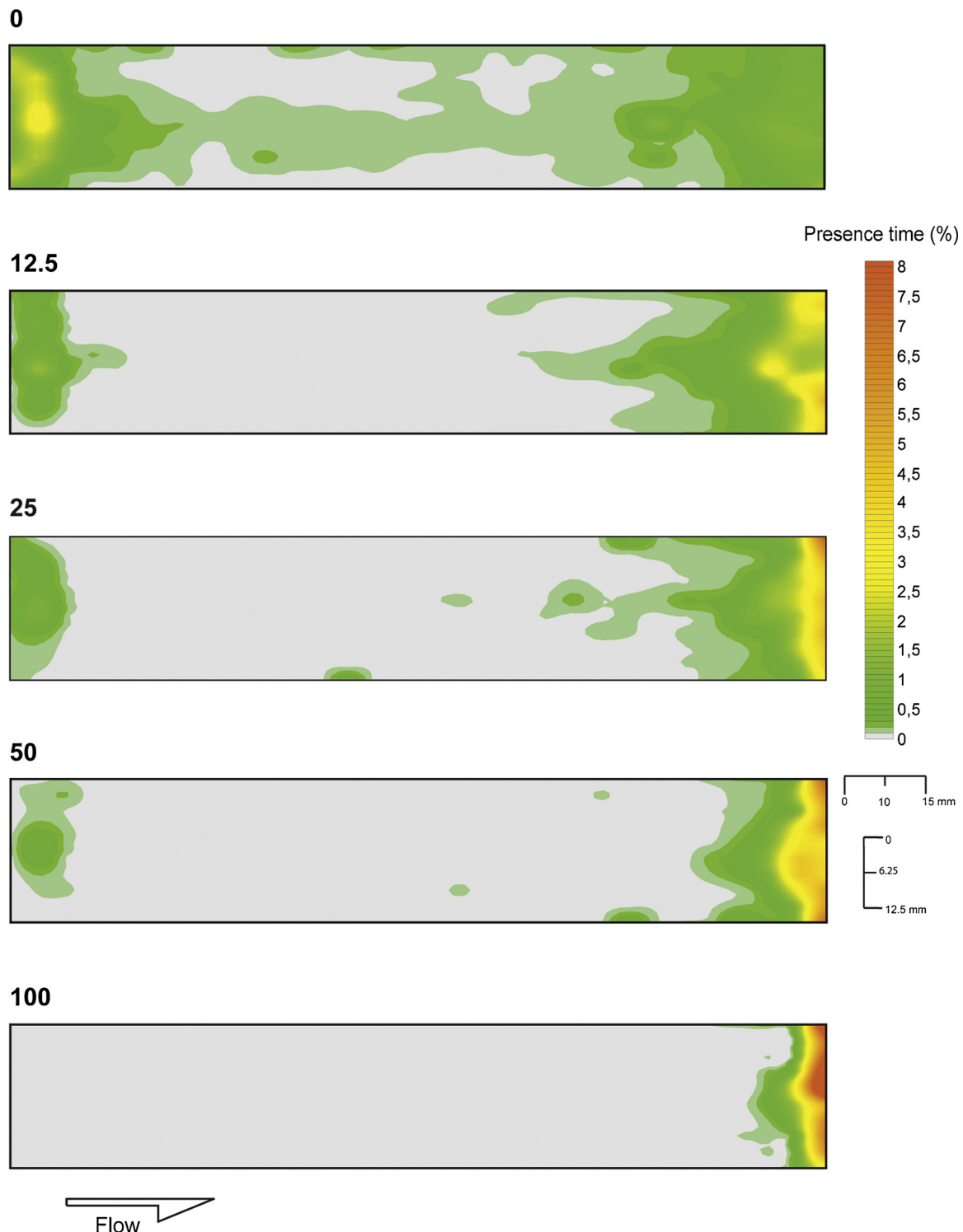


Fig. 3. Two-dimensional surface gradient maps for medaka eleutheroembryo (time point 0 exposure challenge) positioning along the arena. The “0” map corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “20”, “50” and “100” maps to the 48-h CPF exposures expressed as $\mu\text{g/L}$. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of $n = 30\text{--}35$ fish/treatment.

3.2. Swimming activity

The five two-dimensional gradient maps that corresponded to the time point 0 exposure challenge are shown in Fig. 3. A gradient color scale indicating the distribution of the presence time values on the percentage scale showed presence times from 0.0% to 8.0% of the overall recording time. The eleutheroembryos incubated with the solvent medium displayed a positional pattern with the highest presence

values seen primarily near the port of entry with percentages that went from 0.75 to 3.00% of the overall recording time (Fig. 3, 0). Although values were lower, the presence times from 0.25% to 0.75% were also seen along a wide region ahead of the downstream screen. Scattered zones halfway along both the arena and sides showed shorter fish presence ($\leq 0.1\%$). Yet the central region revealed somewhat higher presence time values (0.1–0.3%), which suggested that eleutheroembryos were unable to discern the walls as potential areas of shelter to

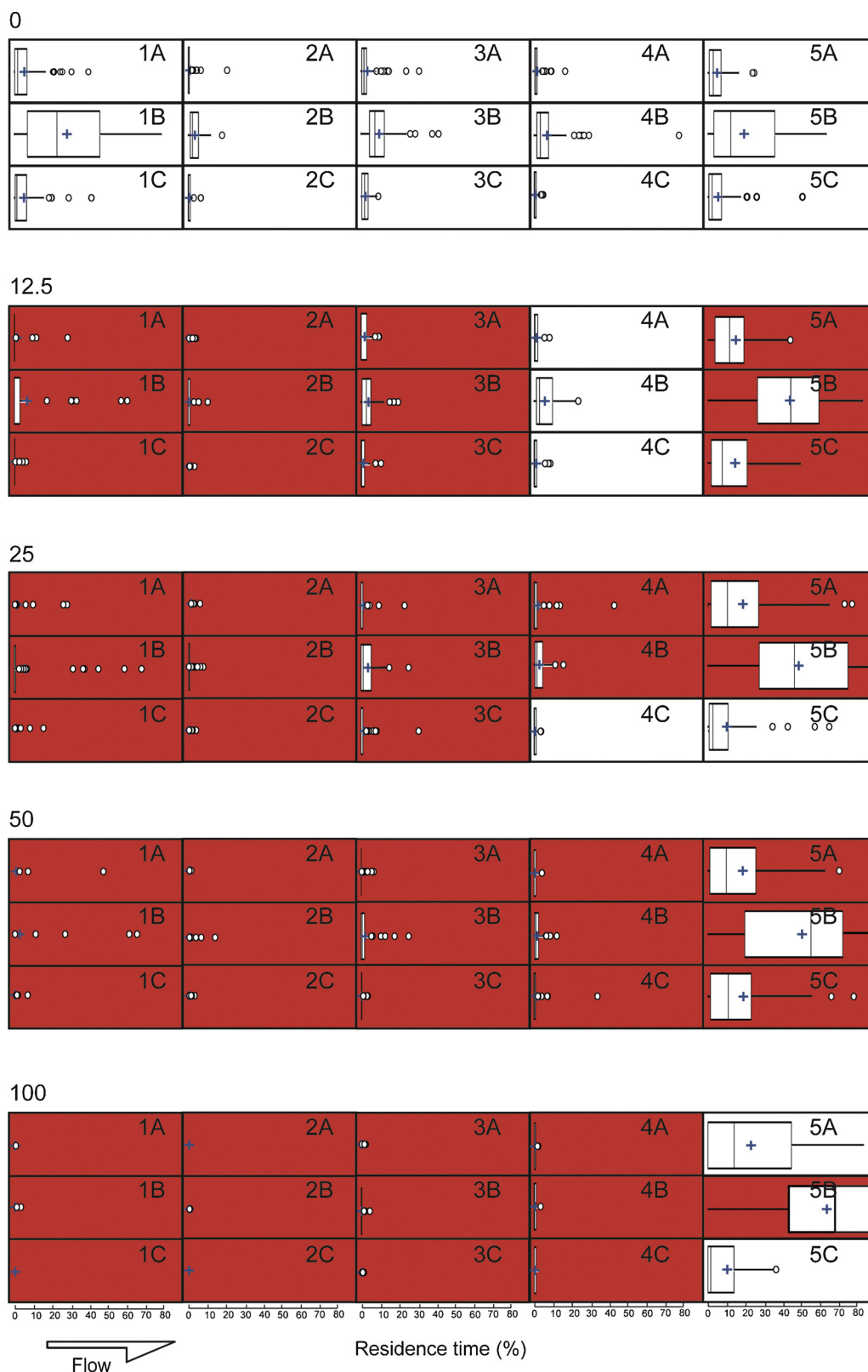


Fig. 4. The eleutheroembryo (time point 0 exposure challenge) swimming residence times in the 15 arena areas. For practical purposes, areas are represented as equal sizes (for actual proportions refer to Fig. 2.). The “0” arena corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “25”, “50” and “100” ones to the 48-h CPF exposures, expressed as µg/L. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally with the boxes that depict the probability distribution of the data through their (\pm 25th and 75th percentiles) quartiles. The whiskers on both sides indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles drawn to the largest and smallest data values within these ranges. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for “12.5” “25”, “50” and “100” were compared with the presence time values in the respective area of “0” in such a way that a red solid area indicates a significant difference ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence of $n = 30-35$ fish/treatment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hold their position against the current. The gradient map for the 12.5 µg CPF/L-treated eleutheroembryos showed a positional gradient along the arena that contrasted with that seen in the control group, where the higher swimming values were located in downstream zones (presence time values $\geq 1\%$; Fig. 3, 12.5). Similar positional patterns were seen for the higher CPF-treatment gradient maps, with increasing presence

time values next to the downstream screen with the CPF concentration. This tendency denoted a concentration-response pattern. A comprehensive solution for the statistical comparison of the median residence time values between the corresponding areas in the solvent control and the CPF-treated eleutheroembryos is presented in Fig. 4. Overall, the residence times in the different areas revealed wide data dispersion

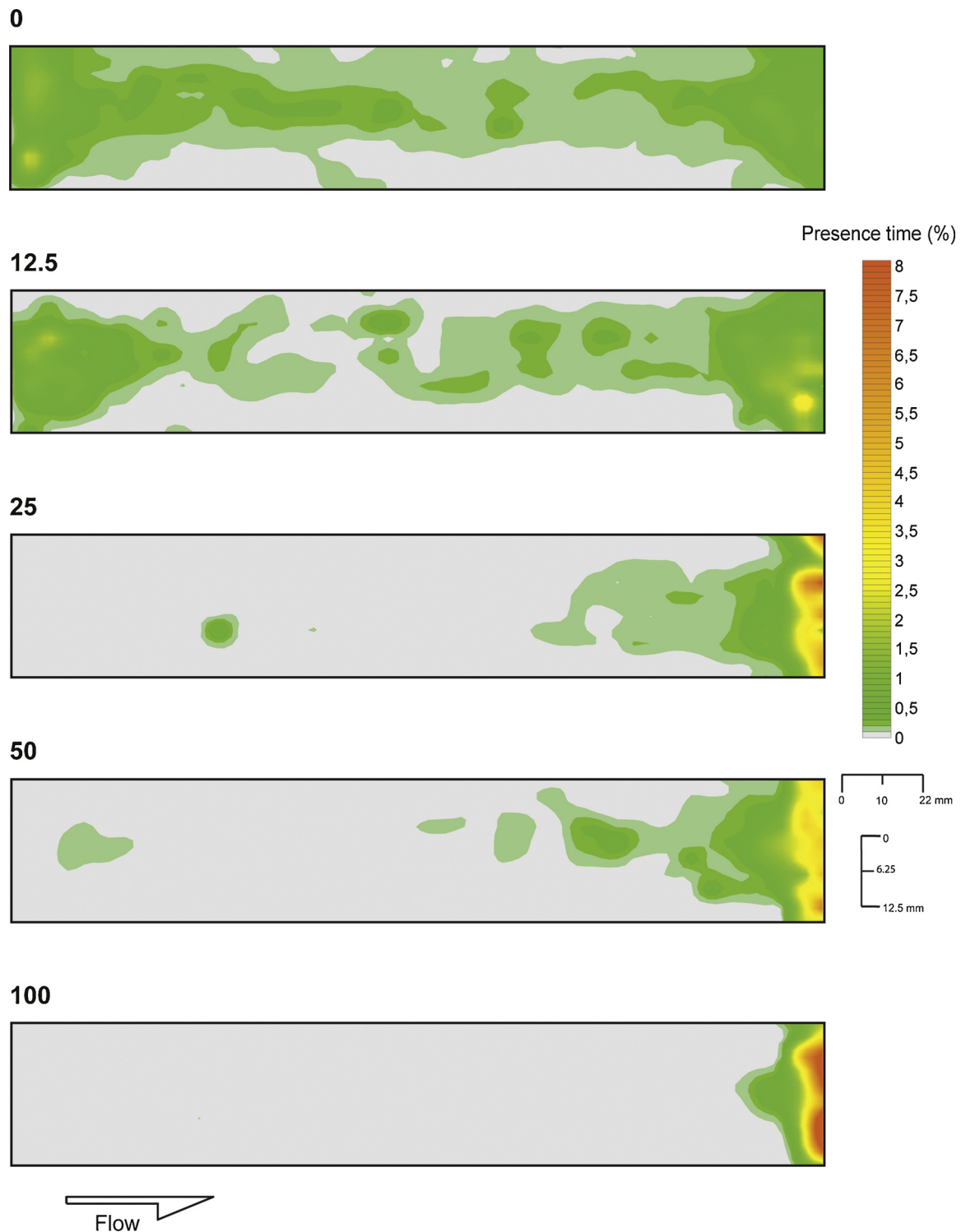


Fig. 5. Two-dimensional surface gradient maps for medaka positioning along the arena at time point 20. The “0” map corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “20”, “50” and “100” ones to the 48-h CPF exposures expressed as $\mu\text{g/L}$. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of $n = 30\text{--}35$ fish/treatment.

around the median values. Yet the statistical comparison with the $12.5 \mu\text{g CPF/L}$ -treated eleutheroembryos gave significant differences in 12 of the 15 areas that divided the arena, with a level of significance P that ranged from 0.001 (areas 1A to 2C, 3B and 5A and 5B) to 0.028 (area 3A) (Fig. 4, 12.5). Similarly, significant differences in the median residence values in the 25, 50 and 100 CPF were seen compared to the solvent control group in 13, 15 and 13 areas, respectively (P values ranging from ≤ 0.001 to 0.048 [specifically at $25 \mu\text{g CPF/L}$ for area

4A]) (Fig. 4, 25, 50 and 100). Altogether, these data supported the clear visual differences observed between the solvent control and the CPF gradient maps, and indicated the incapacity of eleutheroembryos to negotiate the 3.2 cm/s water velocity when exposed to $\geq 12.5 \mu\text{g CPF/L}$.

The gradient maps obtained from the swimming trials at time point 20 are presented in Fig. 5. The longer swimming presence times observed on the solvent control map (values of 2.5% of the overall

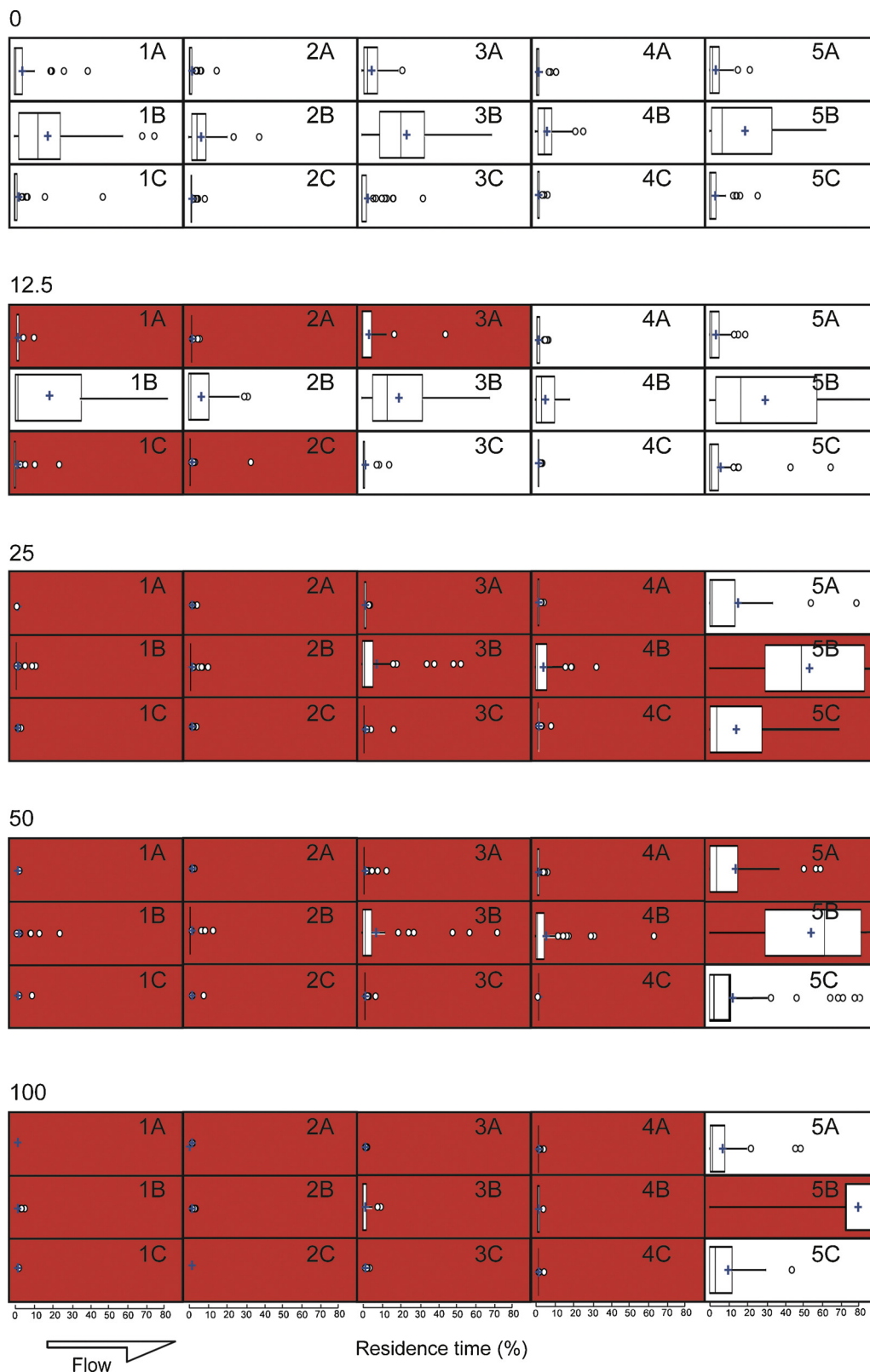


Fig. 6. Fish swimming residence times in all the 15 arena areas at time point 20. For actual proportions of the areas, refer to Fig. 2. The “0” arena corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “25”, “50” and “100” ones to the 48-h CPF exposures expressed as $\mu\text{g/L}$. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally with the boxes that depict the probability distribution of the data through their (\pm 25th and 75th percentiles) quartiles. The whiskers on both sides indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles drawn to the largest and smallest data values within these ranges. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for “12.5” “25”, “50” and “100” were compared with the presence time values in the respective area of “0” in such a way that a red solid area indicates a significant difference ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence of $n = 30\text{--}35$ fish/treatment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

recording time) were observed near the upstream screen, followed by the immediate central region near the downstream screen (0.5%–1.00%; Fig. 5, 0). Similar, but not the same, positional pattern was observed on the 12.5-CPF map where the longer presence (values of 2.5%) were primarily seen downstream (Fig. 5, 12.5). For the ≥ 25 CPF gradient maps, minimal or no fish swimming presence was seen

upstream and the longer presence time values (3.00–8.00%) were obtained next to the downstream screen with an increasing tendency with CPF treatment (Fig. 5, 25, 50 and 100). The statistical comparative analysis of the residence values for the corresponding areas between the solvent control and the 12.5-CPF group revealed significant differences in five areas upstream, next to the walls (Fig. 6). In these five areas, the

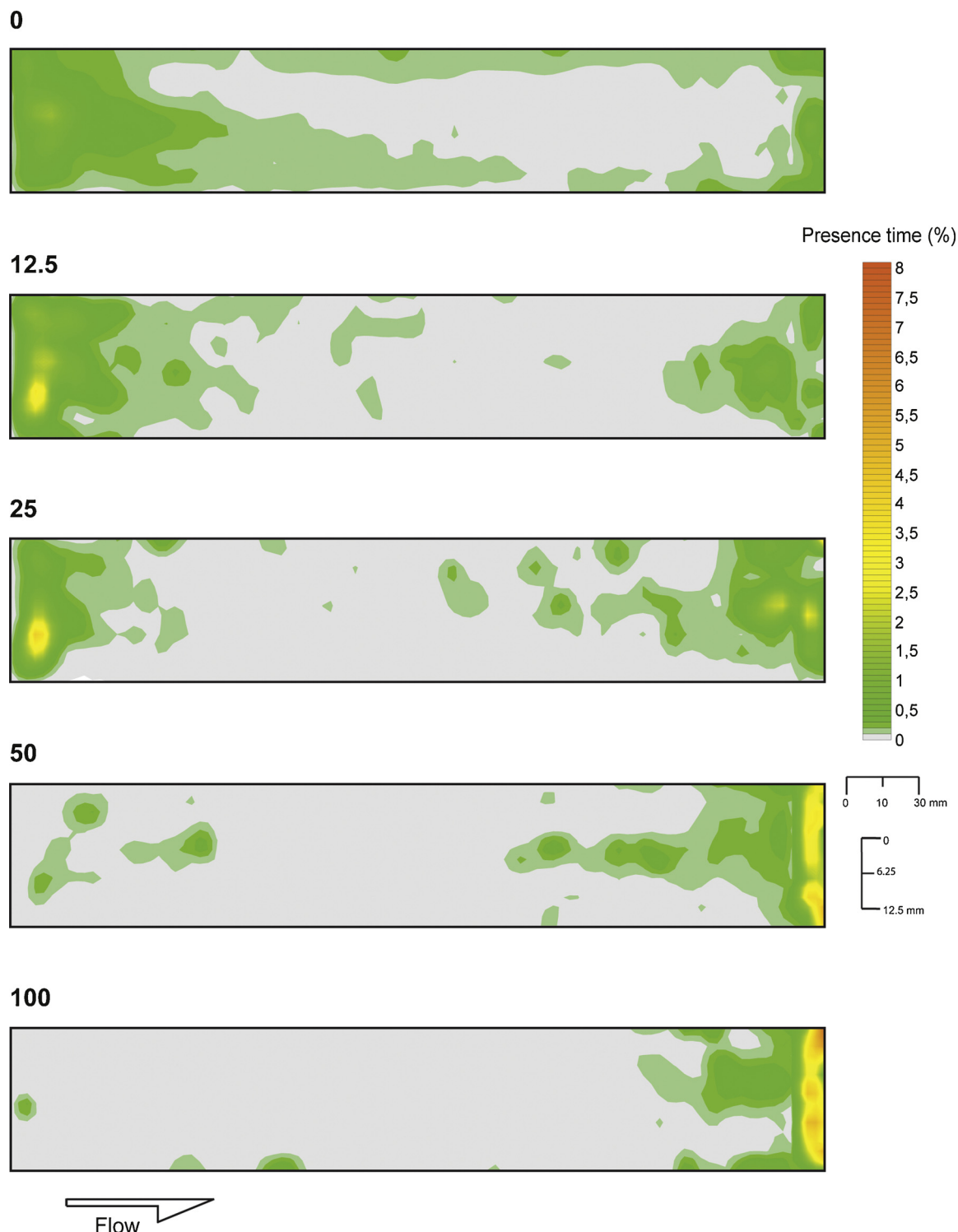


Fig. 7. Two-dimensional surface gradient maps for medaka positioning along the arena at time point 40. The “0” map corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “20”, “50” and “100” ones to the 48-h CPF exposure challenges expressed as µg/L. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of n = 30-35 fish/treatment.

control group obtained higher residence values (e.g. values in 1A, expressed as the median with the 1.5 interquartile ranges [Q1-Q3] in brackets, were 0.78 [11.37-0.00] vs. 0.00 [2.83-0.00] in the control; $P \leq 0.001$; Fig. 6, 0 and 12.5). Increasing the CPF concentration at this time point resulted in ≥ 13 areas with significantly shorter residence times (P values ranging from 0.001 to 0.038) (Fig. 6, 25, 50 and 100). These differences, supported by the gradient maps, suggest the existence of effects on swimming behavior from exposures to ≥ 12.5 µg

CPF/L versus the solvent control group.

The gradient maps for the time point 40-exposure challenge are shown in Fig. 7. The solvent control group map showed a positional pattern along the arena characterized by swimming presence near the upstream screen and the walls, which suggests the capacity of these more advanced stages to discriminate and negotiate by them avoiding the turbulence zones along the central region. The presence time values within these regions of preference ranged from 0.25% to 2.5% of the



Fig. 8. Fish swimming residence times in all the 15 arena areas at time point 40. For actual proportions of the areas, refer to Fig. 2. The “0” arena corresponds to the solvent (0.01% DMSO) control and the “12.5”, “25”, “50” and “100” ones to the 48-h CPF exposures, expressed as µg/L. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally with the boxes that depict the probability distribution of the data through their (± 25th and 75th percentiles) quartiles. The whiskers on both sides indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles drawn to the largest and smallest data values within these ranges. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for “12.5” “25”, “50” and “100” were compared with the presence time values in the respective area of “0” in such a way that a red-solid area indicates a significant difference ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence of $n = 30$ -35 fish/treatment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

overall recording time. Lower presence values, restricted to a smaller zone, were seen next to the downstream screen (presence time values $\leq 0.5\%$). The positional pattern seen on the gradient map for the 12.5-CPF-exposed fish differed from the solvent control group in such a way that shorter or no presence values were seen along and near the walls (Fig. 7, 12.5). Similarly, the fish exposed to 25 µg CPF/L displayed

almost no presence along the walls. These patterns indicate the incapacity of fish to hold their position by discerning zones of preference near the walls. Furthermore, the two higher CPF-gradient maps suggest the difficulty for fish to swim and hold their position upstream (Fig. 7, 50 and 100). The statistical comparative analysis between the 12.5-CPF group and the solvent control group showed three areas in the upstream

region and near the walls with significantly different residence time values (Fig. 8, 12.5) in areas 1B, 2C and 3C (i.e. 33.44 [87.64–0.00] ($P = 0.026$), 0.44 [2.08–0.00] ($P = 0.035$), and 0.49 [5.53–0.00] ($P = 0.002$) for 12.5 CPF vs. the 18.80 [75.03–0.00], 1.27 [6.70–0.00] and 3.14 [16.81–0.00], for 0 CPF). These differences were supported by the corresponding gradient maps and suggest effects on swimming behavior. The statistical comparison between the ≥ 25 -CPF groups and the solvent control fish gave significant differences in ≥ 9 areas (with P values ranging from 0.001 to 0.045 to), which confirmed the existence of different swimming behaviors in the 40 dph medaka fish challenged to CPF.

3.3. Relative distances traveled

The relative distances traveled along the arenas for time points 0, 20 and 40 CPF-exposure challenges during the 6-min recording time are shown in Fig. S4 (Supplementary Information). The relative distances covered by the solvent control eleutheroembryos (time point 0) averaged 3310 ± 130 mm (values expressed as mean \pm standard error mean). At time point 20 and 40, the distances in the control groups increased to 4014 ± 182 and 6321 ± 306 mm, respectively. The relative distances traveled by all the CPF-treated eleutheroembryos (i.e. time point 0) dropped to significantly lower values (i.e. ≤ 2245 mm). Shorter relative distances were also seen at ≥ 25 μg CPF/L for time point 20 and at ≥ 12.5 μg CPF/L for time point 40.

4. Discussion

The quantitative results obtained in the present study under dynamic conditions showed that CPF was toxic to medaka from brief exposures, such as 48 h. A concentration-response was seen which correlated with the developmental stage so that the higher the concentration and the earlier developmental window of challenge, the more affected the response to a forced swimming became. The extent of organogenesis is supported by differential physiological processes that are particular to each developmental period and may therefore influence the type and level of behavioral effects as those observed herein.

The selection of the CPF concentrations for our studies was done based on the published data from research works that have investigated the neurobehavioral toxicity of CPF in small fish models (e.g. Levin et al., 2003, 2004; Sledge et al., 2011; Tilton et al., 2011; Jin et al., 2015). Although finding a higher concentration in environmental samples is not likely, even higher concentrations have been used experimentally to evaluate either behavioral performance, or gene and enzyme expression, as biomarkers for CPF exposure (e.g. Richendrfer et al., 2012; Khalil et al., 2013, 2017; Pérez et al., 2013; Jin et al., 2015; Jeon et al., 2016). The lower concentrations considered in our research showed TWACs within similar orders of magnitude compared with those reported in laboratory studies (Levin et al., 2004; Khalil et al., 2013; Jin et al., 2015; Qiu et al., 2017) or in environmental surveys to detect CPF in aquatic systems worldwide. These environmental levels have ranged from < 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 10–44 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Kammerbauer and Moncada, 1998; Banks et al., 2005; Mugni et al., 2011; Ismail et al., 2012; López-Doval et al., 2012; Williams et al., 2014; Bonifacio et al., 2017).

The quantitative behavioral analysis presented herein using a miniaturized swim flume to generate graphical and statistical information allows the viewers to simultaneously visualize and understand the analysis results. Therefore, changes on natural swimming behavior or alterations in behavioral strategies for fish positioning in a water current can be discerned. Indeed, the low CPF concentrations were enough to elicit changes in swimming activity with differential patterns regardless of the developmental period challenged. Generally speaking, these CPF concentrations are comparable or well below those in the literature reported to have induced behavioral effects in small fish model species. In these studies, swimming activity has been generally

evaluated using still environments, where spontaneous or induced activity by different forms of artificial stimuli has been analyzed (e.g. Levin et al., 2004; Khalil et al., 2013; Pérez et al., 2013; Qiu et al., 2017). Research by Jin et al. (2015) done to examine potential CPF toxicity targets in zebrafish ELS, showed swimming alterations in response to light-dark transitions after 96-hour exposures to nominal 100 and 300 μg CPF/L. Levin et al. (2004) used a segmented 16-diameter cylinder to report greater sensitivity methods where zebrafish larvae swimming activity slowed from exposures to 100 μg CPF/L for up to 120-h. Selderslaghs et al. (2010) optimized a method with zebrafish ELS based on the evaluation of different descriptive parameters for locomotor activity analyzed on 6-well plates to evidence effects in eleutheroembryos from previous static 96-hour exposures to 39–100 μg CPF/L. Using 6-well plates as a platform for behavioral studies from 168-hour CPF exposures of zebrafish larvae, Richendrfer et al. (2012) found effects on anxiety-related behavior at ≥ 25 μg CPF/L. These authors argued that the lack of effects observed in other research works using comparable CPF concentrations but shorter exposure durations, could be due to the enzymatic machinery needing more prolonged times to break down CPF into its active metabolites. Although the 48-hour exposure challenge in our research was shorter than the exposure durations considered in the aforementioned research works, they sufficed to elicit alterations to forced swimming behavior, which suggests that this exposure duration was enough for fish to convert CPF into its toxic metabolite.

More advanced developmental zebrafish and medaka stages as small fish model species have also been used in behavioral toxicology assays with CPF. Yet the experimental approaches still relied on external artificial stimuli in static environments to induce fish swimming behavior. The CPF concentrations and exposure durations reported in these research works suggest comparable, or even less sensitive, methods than those found in our studies. Rice et al. (1997) observed adverse behavioral symptoms based on a spontaneous and startle response in 30 dph medaka from 48-hour non-renewal exposures to ≥ 100 μg CPF/L. Khalil et al. (2013) reported swimming movement and social behavior alterations in 90 dph medaka placed inside a circular glass aquarium from 192-hour CPF exposures to 12 $\mu\text{g}/\text{L}$. Qiu et al., 2017 resorted to a 96-hour exposure duration to 24 μg CPF/L to observe short-term impacts on 150 dph medaka swimming behaviors, namely anxiety and startle post-stimulus responses.

To date, the swim flume designs available for assessing the neurobehavioral effects of chemical substances have been adapted to test fish in advanced developmental stages characterized by comparatively large sizes and experienced swimming (Gravato and Guilhermino, 2009; Vieira et al., 2009). These variables facilitate tracking movement and, under normal health conditions, should result in more predictable fish movement within the flume. However, for recently hatched fish that have little living experience to develop cognitive swimming tactics and strength, the use of a flume to quantitatively monitor the locomotion behavior becomes technically challenging (Ward et al., 2002). This is notably worsened when attempts are made to track fish movement in a flume with enough space to adopt different behavioral strategies for negotiating water currents. Such factors have probably prevented swim flumes from being implemented in fish developmental neurobehavioral toxicology assays. While factors such as ease and reproducibility favor the use of current more traditional methods to analyze fish behavior in small models in early and growing periods, other aspects like confined space available for fish movement and type of external stimuli considered to induce response could question the environmental relevance of such behavioral responses. Swim flumes offer a higher level of basic behavioral response where a fish is forced to adopt swimming alternatives and opt for strategies based on spatial discrimination to thus enable continuous adaptation to this dynamic scenario. The present work shows how these alternatives and strategies can be translated into specific movement patterns so that swimming performance and swimming capacity can be simultaneously interpreted.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

These authors would like to thank P. García Hortigüela and V. Serrano Cabezas for helping with the video recording during the swimming trials sessions. The authors are also indebted to Dr. O. Andreu (Valencia University) for his technical support with the contour-mapping program. This work has been jointly supported by Spanish Government Grants CTM2013-44986-R and CTM2014-52388-R. The medaka fish used in the experiments were manipulated in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), and Directive 86/609/EEC on the protection of animals for experimental and other scientific purposes in the European Union.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.008>.

References

- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L., 2010. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology* 19, 1369–1381.
- Banks, K.E., Hunter, D.H., Wachal, D.J., 2005. Chlorpyrifos in surface waters before and after a federally mandated ban. *Environ. Int.* 31, 351–356.
- Barron, M.G., 2002. Environmental contaminants altering behavior. In: Dell’Omo, G. (Ed.), *Behavioural Ecotoxicology*. J. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 167–186.
- Baumann, P.C., Okihiro, M.S., 2000. Fish as a cancer model. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *The Laboratory Fish*. Academic Press, London, UK, pp. 591–616.
- Beauvais, S.L., Jones, S.B., Parris, J.T., Brewer, S.K., Little, E.E., 2001. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 84–90.
- Bonifacio, A.F., Ballesteros, M.L., Bonansea, R.I., Filippi, I., Amé, M.V., Hued, A.C., 2017. Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Gnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 188, 486–493.
- Brett, J.R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 21, 1183–1226.
- Brewer, S.K., Little, E.E., DeLonay, A.J., Beauvais, S.L., Jones, S.B., Ellersieck, M.R., 2001. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 70–76.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems – impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B* 369.
- Bunton, T.E., 1996. Experimental chemical carcinogenesis in fish. *Toxicol. Pathol.* 24, 603–618.
- Drummond, R.A., Russom, C.L., 1990. Behavioral toxicity syndromes: a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 37–46.
- Elder, J., Coombs, S., 2015. The influence of turbulence on the sensory basis of rheotaxis. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 201, 667–680.
- Fiaz, A.W., León-Kloosterziel, K.M., Gort, G., Schulte-Merker, S., van Leeuwen, J.L., Kranenborg, S., 2012. Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *PLoS One* 7 (4), e34072. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034072>.
- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K.J., Neuhaus, S.C., Segner, H., Eggen, R.I., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat. Toxicol.* 95, 307–319.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245–254.
- Gerhardt, A., 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology-prospects and limitations. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13, 481–491.
- Giddings, J.M., Williams, W.M., Solomon, K.R., Giesy, J.P., 2014. Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In: Giesy, J.P., Solomon, K.R. (Eds.), *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 119–162.
- González-Doncel, M., Sastre, S., SanSegundo, L., 2015. Dynamic system for the quantitative analysis of fish elutheroembryos and larvae swimming behavior. *European Patent P201530256*.
- Gravato, C., Guilhermino, L., 2009. Effects of benzo(a)pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers: growth and behavior. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 121–137.
- Ismail, B., Siti, H., Talib, L., 2012. Pesticide residue levels in the surface water of the irrigation canals in The Muda Irrigation scheme Kedah, Malaysia. *Int. J. Basic Appl. Sci.* 12, 85–90.
- Iwamatsu, T., 1994. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 11, 825–839.
- Jeon, H.J., Lee, Y.H., Mo, H.H., Kim, M.J., Al-Wabel, M.I., Kim, Y., Cho, K., Kim, T.W., Ok, Y.S., Lee, S.E., 2016. Chlorpyrifos-induced biomarkers in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 1071–1080.
- Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., Fu, Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 405–414.
- Kammerbauer, J., Moncada, A., 1998. Pesticide residue assessment in three selected agricultural production systems in the Choluteca River Basin of Honduras. *Environ. Pollut.* 103, 171–181.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Brewer, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *Methods in Aquatic Toxicology* (Chapter 32), vol. 2 Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Kato, S., Nakagawa, T., Ohkawa, M., Muramoto, K., Oyama, O., Watanabe, A., Nakashima, H., Nemoto, T., Sugitani, K., 2004. A computer image processing system for quantification of zebrafish behavior. *J. Neurosci. Methods* 134, 1–7.
- Khalil, F., Kang, I.J., Undap, S., Tasmin, R., Qiu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2013. Alterations in social behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemosphere* 92, 125–130.
- Khalil, F., Qiu, X., Kang, I.J., Abo-Ghanema, I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2017. Comparison of social behavior responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to lethal and sublethal chlorpyrifos concentrations at different exposure times. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 78–82.
- López-Doval, J.C., De Castro-Catalá, N., Andrés-Doménech, I., Blasco, J., Ginebreda, A., Muñoz, I., 2012. Analysis of monitoring programmes and their suitability for ecotoxicological risk assessment in four Spanish basins. *Sci. Total Environ.* 440, 194–203.
- López-Mancisidor, P., Carbonell, G., Marina, A., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2008. Zooplankton community responses to chlorpyrifos in mesocosms under Mediterranean conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 16–25.
- Law, J.M., 2003. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. *Toxicol. Pathol.* 31, 49–52.
- Levin, E.D., Chrysanthis, E., Yacisin, K., Linney, E., 2003. Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination. *Neurotoxicol. Teratol.* 25, 51–57.
- Levin, E.D., Swain, H.A., Donerly, S., Linney, E., 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 719–723.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., 1992a. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Vol. I: Monoaromatic Hydrocarbons, Chlorobenzenes, and PCBs. Boca Raton, FL.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., 1992b. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Volume II: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins, and Dibenzofurans. Boca Raton, FL.
- Marcucella, H., Abramson, C.I., 1978. In: Mostofsky, D.I. (Ed.), *Behavioral Toxicology and Teleost Fish. The Behavior of Fish and Other Aquatic Animals*. Academic, New York.
- Mugnì, H., Ronco, A., Bonetto, C., 2011. Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 350–354.
- Oliveira, C., Almeida, J.R., Guilhermino, L., Soares, A.M., Gravato, C., 2013. Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. *Chemosphere* 90, 936–944.
- Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A.M., Loureiro, S., 2013. Synergistic effects caused by atrazine and terbutylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 4671–4680.
- Qiu, X., Nomichi, S., Chen, K., Honda, M., Kang, I.J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2017. Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion anxiety, and startle responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 192, 148–154.
- Rice, P.J., Drewes, C.D., Klubertanz, T.M., Bradbury, S.P., Coats, J.R., 1997. Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine, and 2,4-dinitrophenol to 30-day-old Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 696–704.
- Richendrer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R., 2012. Developmental subchronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 458–465.
- Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J., 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32, 268–276.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- Selderslaghs, I.W., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H.E., 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 460–471.
- Sledge, D., Yen, J., Morton, T., Dishaw, L., Petro, A., Donerly, S., Linney, E., Levin, E.D., 2011. Critical duration of exposure for developmental chlorpyrifos-induced neurobehavioral toxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 742–751.
- Tanabe, S., Watanabe, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Nakanishi, S., Ono, H., Tanaka, H., 2004. PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in albatross from the North Pacific and

- Southern Oceans: levels patterns, and toxicological implications. Environ. Sci. Technol. 38, 403–413.
- Tilton, F.A., Bammler, T.K., Gallagher, E.P., 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 153, 9–16.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. Chemosphere 76, 1416–1427.
- Ward, D.L., Maughan, O.E., Bonar, S.A., 2002. A variable-speed swim tunnel for testing the swimming ability of age-0 fish. N. Am. J. Aquacult. 64, 228–231.
- Weichert, F.G., Floeter, C., Meza Artmann, A.S., Kammann, U., 2017. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances-Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. Chemosphere 186, 43–50.
- Williams, W.M., Giddings, J.M., Purdy, J., Solomon, K.R., Giesy, J.P., 2014. Exposures of aquatic organisms to the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos resulting from use in the United States. In: Giesy, J.P., Solomon, K.R. (Eds.), Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 77–117.

ANEXO III



Effects of dietary 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure on medaka (*Oryzias latipes*) swimming behavior[☆]



Salvador Sastre, Carlos Fernández Torija, Gregoria Carbonell, José Antonio Rodríguez Martín, Eulalia María Beltrán, Miguel González-Doncel*

Laboratory for Ecotoxicology, Department of the Environment, National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, A-6, Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2017
Received in revised form
19 July 2017
Accepted 30 August 2017
Available online 5 November 2017

Keywords:

BDE-47
Swimming behavior
Geostatistical analysis
Locomotor analysis
Polybrominated diphenyl ethers
Swim flume

ABSTRACT

A diet fortified with 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47: 0, 10, 100, and 1000 ng/g) was dosed to 4–7-day-old post-hatch medaka fish for 40 days to evaluate the effects on the swimming activity of fish using a miniaturized swimming flume. Chlorpyrifos (CF)-exposed fish were selected as the positive control to assess the validity and sensitivity of the behavioral findings. After 20 and 40 days of exposure, the locomotor activity was analyzed for 6 min in a flume section (arena). The CF positive control for each time point were fish exposed to 50 ng CF/ml for 48 h. Swimming patterns, presented as two-dimensional heat maps of fish movement and positioning, were obtained by geostatistical analyses. The heat maps of the control groups at time point 20 revealed visually comparable swimming patterns to those of the BDE-47-treated groups. For the comparative fish positioning analysis, both the arenas were divided into 15 proportional areas. No statistical differences were found between residence times in the areas from the control groups and those from the BDE-47-treated groups. At time point 40, the heat map overall patterns of the control groups differed visually from that of the 100-ng BDE-47/g-treated group, but a comparative analysis of the residence times in the corresponding 15 areas did not reveal consistent differences. The relative distances traveled by the control and treated groups at time points 20 and 40 were also comparable. The heat maps of CF-treated fish at both time points showed contrasting swim patterns with respect to those of the controls. These differential patterns were statistically supported with differences in the residence times for different areas. The relative distances traveled by the CF-treated fish were also significantly shorter. These results confirm the validity of the experimental design and indicate that a dietary BDE-47 exposure does not affect forced swimming in medaka at growing stages.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of pervasive and bioaccumulative organobromine compounds. Although they have been banned or phased out from production in most developed countries, they are still detected in the environment (Darnerud et al., 2001; Janssen, 2005). PBDE levels recorded in wild fish populations (Anderson and MacRae, 2006; Hahm et al., 2009)

have demonstrated that the aquatic environment is an important sink for the fate and transport of this group of contaminants. Despite their very low water solubility, studies on waterborne exposures of juvenile and adult fish to PBDEs have reported neurobehavioral insult, primarily alterations in locomotor behavior (Chen et al., 2012a, 2012b; Huang et al., 2015; McClain et al., 2012; Usenko et al., 2011; Zhao et al., 2014). Further research on diet as exposure route suggested disruptions in the locomotor behavior of juvenile fish stages (Chou et al., 2010).

The behavioral response of fish to chemical substances has become an interesting topic in recent decades for environmental monitoring. Of all the types of fish behavior, swimming is arguably the most simple, unbiased behavioral endpoint as it can be measured. Almost all published studies on the neurobehavioral effects of PBDEs in fish relied on the experimental set-ups generally

abbreviations: CF, chlorpyrifos; U_{crit} , critical swimming speed; dph, days post-hatch; PBDEs, polybrominated diphenyl ethers; BDE-47, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether; BDE-49, 2,2,4,5-tetrabromodiphenyl ether.

* This paper has been recommended for acceptance by Prof. von Hippel Frank A.

* Corresponding author.

E-mail address: miguelgd@inia.es (M. González-Doncel).

consisting of static and constrained environments, typically those of small dishes, to which external stimuli were applied (Chen et al., 2012a, 2012b; Chou et al., 2010; Zhao et al., 2014). These factors might limit the full swimming potential of fish disregarding its capabilities to adapt to and “explore” a wider dynamic environment without the need to add any artificial stimulus.

Fish generally show positive *rheotaxis*, which leads them to hold a position in the water stream. Hence, water flows can be used to evaluate the physical and physiological conditions of fish without any other *artificial* input to stimulate response or movement. This allows a more environmentally realistic assessment of locomotion and activity as endpoints of swimming behavior (Little and Finger, 1990). Different swimming flumes for studying the fish swimming behavior and physiology have been developed (Gamperl et al., 2002; Ellerby and Herskin, 2013). Thus, they have also demonstrated their utility in the evaluation of fish swimming after exposure to xenobiotics (Gravato and Guilhermino, 2009; Vieira et al., 2009). Most swim flume designs are adapted for testing fish whose size facilitates tracking movement. However, for juvenile stages that display relatively small sizes and high speeds, a quantitative monitoring of locomotion behavior becomes technically more difficult (Fiaz et al., 2012; Ward et al., 2002).

In a previous work, we addressed the effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) dosed to 4–7-day-old post-hatch medaka (dph) (*Oryzias latipes*) for 40 days (González-Doncel et al., 2016). Although an increase in the dose-response was observed with time, the overall increase during and after the exposure and the subsequent reproduction after the exposure were not affected. By using the same exposure approach, we herein sought to evaluate the effects on swimming activity at two developmental time points during the 40-day BDE-47 exposure, i.e., on days (i.e., time points) 20 and 40 since the dietary exposure commenced. Therefore, we used a dynamic miniaturized swimming apparatus (González-Doncel et al., 2015). This device forces the fish to swim and adopt strategies, thus allowing the tracking of fish movement to model *surface gradients* (i.e., heat maps) of its movement along the flume.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and preparation of test diets

Pure BDE-47 was purchased from ChemService, (West Chester, PA, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and *n*-hexane were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). A 0.01 µg BDE-47/µl *n*-hexane working solution, which was prepared from concentrated 1 µg BDE-47/µl DMSO stock solution, was aliquoted and stored at –20 °C. Chlorpyrifos (CF)-treated fish, which was chosen as the *positive behavioral control* (see 2.5 *Locomotor analysis*), was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). A 1 µg CF/µl DMSO stock solution was prepared, aliquoted, and stored at –18 °C. Using this stock solution, a nominal concentration of 50 ng CF/ml was selected for waterborne exposures on the basis of published data (Levin et al., 2004; Macaulay et al., 2015; Khalil et al., 2013) and preliminary experiments carried in our laboratory. The preparation of BDE-47 test diets has been described in previous studies (González-Doncel et al., 2016). Briefly, a volume of 5 ml of the BDE-47 working solution with 45 ml *n*-hexane was mixed with 50 g of a the blend diet made with bluish-green filamentous algae and flake food (2:3 ratio) sieved to 1000 µm. The mixture was allowed to dry to yield a spiked test diet that contained 1000 ng of BDE-47/g. A solvent control diet was also prepared by mixing 50 g of the blend diet with 50 ml of *n*-hexane. Successive dilutions resulted in 100 and 10 ng BDE-47/g diets. Diets were then ground, sieved to <200 µm, and stored at –20 °C.

2.2. BDE-47 measurement in test diets

BDE-47 concentration in the diet was analyzed by the methods described by Chen et al. (2010), with some modifications (González-Doncel et al., 2016). Quantification was performed by building a calibration curve with 10 food samples fortified with 4–1000 ng of BDE-47/g. Recoveries ranged from 72% to 117% and were calculated with seven batches of 1 g food fortified with five BDE-47 concentrations: 19, 78, 312, 1250, and 5000 ng BDE-47/g.

2.3. Dietary exposure to BDE-47

Golden medaka embryos were obtained from our stock culture. Approximately 2500 embryos were collected over a 4-day period. On each day, eggs were cleaned, separated, and incubated until hatching. The resulting eleuthero-embryos were fed with microfine Spirulina powder until they reached 4–7 dph. Groups of 200 larvae were then randomly distributed into 10 tanks with 8 l capacity of a flow-through system. The flow rate in each tank was set to obtain a minimum of three 100% daily renewals. The photoperiod was set to a constant light cycle of 15 l: 9 D. Five experimental groups, two tanks per group, namely a control diet; a solvent control diet; and 10, 100, and 1000 ng BDE-47/g diets, were used. An additional experimental group of two tanks consisting of fish fed with the solvent control diet was arranged for the CF waterborne exposures (see 2.5 *Locomotor analysis*). The daily food dose was adjusted to 15% body weight and every 10 days with fish development according to previously recorded fish weights (see González-Doncel et al., 2016). Water parameters were monitored every 10 days (mean ± S.D.): temperature (24–26 °C), pH (7.48 ± 0.16), dissolved oxygen (7.59 ± 0.82 mg/L), and conductivity (116.2 ± 4.02 µS/cm).

2.4. Swim flume design and set-up

A miniaturized swim flume (González-Doncel et al., 2015) was adapted to a closed recirculating system. The design was based on considering the small size of medaka at premature stages. The basic principles of the present flume system are similar to those of previous flumes that have been developed so far (Fiaz et al., 2012; Vieira et al., 2009; Ward et al., 2002). The novelty of the present flume stems from several design aspects, which allow it to accurately follow the course of early stages of small-sized fish species with no undesirable noise. The apparatus was gravity fed (Fig. 1). The flume, made with Teflon tubing (25 mm internal diameter and 1.5 mm thickness), was opened longitudinally and placed over a lighting unit coupled to a pair of rectangular bare steel plates placed diagonally along the sides of the light source (Fig. 1). A 20 l reservoir, which was placed above the flume level, and a flowmeter were connected to the flume. Two Labcock valves (Asahi Co., Tokyo, Japan) controlled the velocity of the water flow and two thermostatic heaters in the reservoir maintained the water temperature (26–27 °C) along the circuit. An arena was delimited in the flume for testing fish swimming for which two round screens (500-µm opening) were used. One screen was fixed downstream, while the other was positioned at different distances upstream depending on size, swim needs, and pixel definition requirements during video recordings (see section 2.5 *Locomotor analysis*). Water was drained into a 700-ml-capacity sump, which fed an electrical pump. A float switch in the sump turned the pump on and off under small water fluctuations to propel water up to the reservoir.

The linear velocity (cm/s) along the arena was calculated by dividing the flow rate indicated in the flowmeter (cm³/s) by the cross-sectional area (cm²) of the flume filled with water and measured for that specific flow (Fig. 2, A). For higher flow rates, the water velocities remained almost constant because of the increase

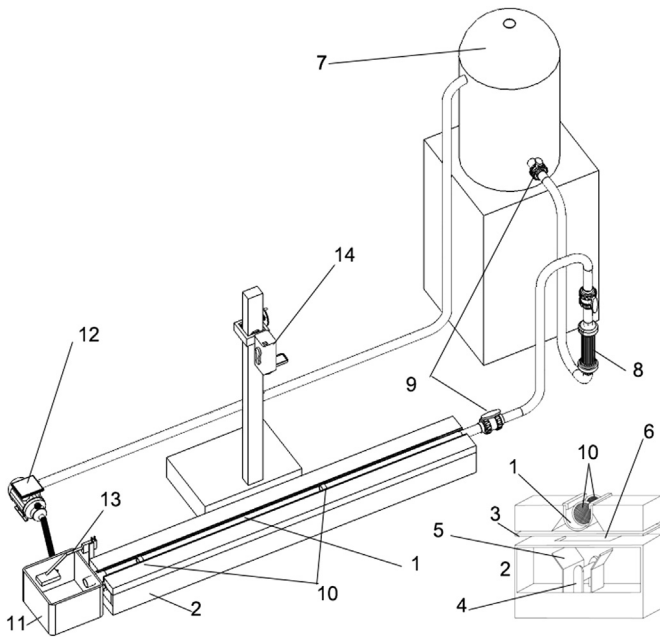


Fig. 1. Schematic illustration of the apparatus, which consists of the miniaturized swim flume coupled to a closed gravity-fed recirculating system. Briefly, the apparatus was made up of an open Teflon flume of variable length (1) *trans*-illuminated with a lighting unit (2) and a translucent white screen (3). The inset image shows the cross-section of these parts where the lighting unit consists of a light source (4) and two steel plates (5). The lighting unit was machined/opened on its top surface (6). A reservoir (7) provided the flume with water. A flowmeter (8) and two valves (9) controlled the water speed. Two screens (10) were fitted inside the flume to avoid fish escape. A sump (11) collected the water draining from the flume, and a pump (12), controlled by a float switch (13), pushed the water back into the reservoir (7). A video camera (14) was placed over the arena.

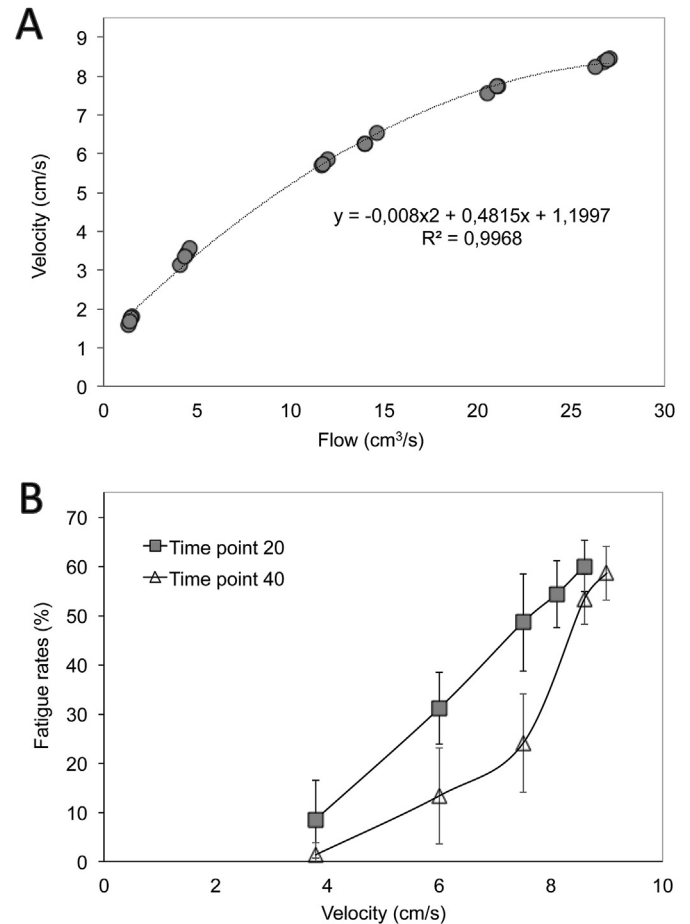


Fig. 2. The graph in "A" shows the correlation observed between water flow and the corresponding water linear velocity in the flume. The inserted equation corresponds to the calculated best-fit regression analysis with the resultant R^2 . The graph in "B" shows the fatigue rates observed for the time points 20 and 40 staged fish subjected to sequential 6-min swimming trials and water velocity increments. The values are the mean (\pm S.E.M.) of five independent groups, and each group consists of five fish.

in water column caused by the flow retention of screens and of the intrinsic limitations of a flume's open design. Consequently, the water velocity followed a polynomial trend with regard to the flow so that it did not increase beyond certain water flows (see Fig. 2, A).

To assess the laminarity of water flow along the flume, a thin stream of potassium permanganate solution was injected before the screen at the upstream end of the test section. Laminarity was tested at 8.1 and 8.6 cm/s. These water velocities were selected for testing fish swimming at time points 20 and 40 during the experimental period, respectively (see below, 2.5 *Locomotor analysis*). A visual analysis of the dye from the top of the flume at 8.1 cm/s revealed an overall laminar flow along the arena with the upstream screen creating a wake of light turbulence, while the downstream screen retaining the speed (see Supplementary Information, Video S1). The flowing dye was not symmetrical and became more noticeable near the upstream screen and along the right wall (see the cardinal points in Fig. 3). At 8.6 cm/s, the flow pattern changed to a transitional state, with random turbulence shedding along the central area of the arena (see Supplementary Information, Video S2). Water still tended to revert to a laminar flow as it moved toward the downstream screen.

Supplementary video related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.122>.

Supplementary video related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.122>.

2.5. Locomotor analysis

A Canon Legria HF R36 (Tokyo, Japan) video camera with 25 frames per second (HD; 1920 \times 1080 pixels; Fig. 1) placed

stationary above the arena was used to record the swimming activity at time points 20 and 40. Two arena lengths of 220 and 300 mm, respectively, available for swimming at time points 20 and 40, were selected to consider two aspects. First, the arena length should be at least 30 times the average control fish length at each time point (see González-Doncel et al., 2016) to allow fish bursting, coasting, or downstream drifting movements. Second, to accurately track fish movement, the number of pixels that represent the fish for a specific video frame should be 3–6 square pixels. Two water speeds were selected for time points 20 and 40. Classically, Brett's benchmark critical swimming speed (U_{crit}) was used to determine the water velocity at which a fish can be subjected to swim (Brett, 1964). However, the open flume design limited the U_{crit} implementation; therefore, Brett's method was followed with modifications. For each time point, pools of untreated fish ($n = 25$) in groups of five were transferred to the flume and were allowed to acclimate for approximately 2 min at minimal water speed (≤ 1 cm/s). Fish were then subjected to successive water velocity increments of 3.8 cm/s at 6-min intervals, and the number of fatigued fish was progressively recorded. Fatigue was defined to occur when a fish was dragged to the downstream screen for >5 s. The highest possible water speed tested in this open flume allowed around 60% exhaustion at both time points (Fig. 2, B). The two water speeds selected for the swimming tests, 8.1 and 8.6 cm/s, were

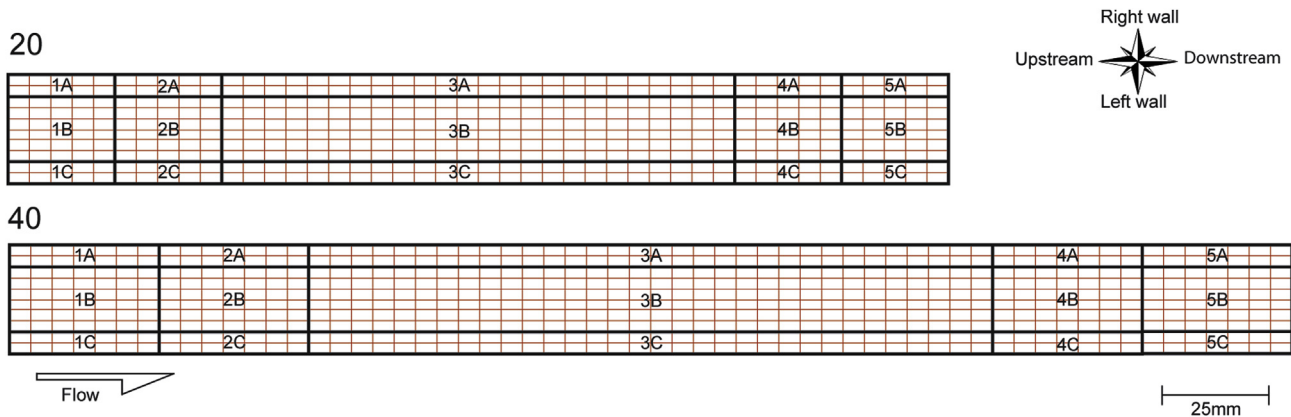


Fig. 3. Representation of the two-dimensional surfaces of the arenas delimited in the flume for time points 20 and 40. The thin gridlines show 5×2.5 mm elements, leading to 440 and 600 elements in the arenas for time points 20 and 40, respectively to generate the surface gradients. In addition, the thicker gridlines divide each arena into 15 proportional areas.

immediately below the highest fatigue rates observed for time points 20 and 40, respectively.

Swimming activity was assessed in groups of 15 fish/tank ($n = 30$ fish/treatment) randomly selected for time points 20 and 40. For each time point, fish were placed individually in the arena and allowed to acclimate for at least 1 min. Thereafter, the water flow was adjusted to the prescribed speed, and locomotor activity was monitored for 6 min (see Supplementary Information, Video S3 and Video S4). To evaluate the actual significance of the behavioral findings of the swimming tests from the BDE-47-exposed fish, CF-exposed fish were included as the *positive control*. Groups of 15 fish/tank ($n = 30$ fish) were randomly selected for time points 20 and 40 from the additional experimental group fed with the solvent control diet. These groups were exposed in 250 ml glass beakers and 100 ml system water to 50 ng CF/ml for 48 h at 24-h renewals before recording their swimming activity. A 48-h exposure time was selected to adjust the swimming trials for CF-exposed fish to those for the BDE-47-exposed fish. These CF-exposed fish were then discarded from the experimental setup once swimming trials were finished.

Supplementary video related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.122>.

Supplementary video related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.122>.

The full recording experimental time reached 1080 min for all the fish that corresponded to the six treatments, including the CF positive control [(30 fish/treatment \times 6 min) \times 6 treatments = 18 h] for each time point. Therefore, swimming recordings were divided into 3 consecutive days so that swimming trials were done on days 19–21 for time point 20 and on days 39–41 for time point 40. Five fish per tank (10 fish/treatment) were recorded daily. The BDE-47-treated fish used for the swimming trials at time point 20 were returned to their respective tanks to continue with dietary exposures.

2.6. Geostatistical analysis for swimming data processing and the quantification of relative distances traveled

The 6-min videos were transferred to a computer in which an animal movement tracking software (Ethovision XT 9, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) was used to quantitatively analyze movement. The two arenas for time points 20 and 40, which corresponded to two-dimensional surfaces of 5500 and 7500 mm², respectively, were divided into equal 5×2.5 mm gridlines, which resulted in data matrices with 440 and

600 elements, respectively (Fig. 3). The average percentage of time spent by fish in each element (i.e., *presence*) was obtained for the 30 fish in each treatment.

To contour the surface gradients for the presence of fish along the arenas, we adopted *geostatistics* (Chilés and Delfiner, 1999). Experimental semivariograms were calculated to analyze the spatial autocorrelation of fish positioning and to determine the range of spatial dependence. A variogram γ was calculated using the relative locations of samples (Goovaerts, 1997), which can be defined as follows:

$$\gamma(h) = \frac{1}{2n} \sum_{i=1}^{i=n} [Z(u_i) - Z(u_{i+h})]^2$$

where $Z(u_i)$ is the Z value at location u_i and $Z(u_i + h)$ is the Z value at a location separated from u_i by distance h .

The variogram model was used to produce the map for fish positioning strategies by the ordinary kriging method (Chilés and Delfiner, 1999). All the geostatistical analyses were performed using the ISATIS V10.0 and the Geostatistical Analyst extension for ArcGIS 9.3.

In a flowing river, fish hold their position when the absolute velocities of fish and water are equal in magnitude but opposite in direction. Therefore, the distances that fish swam during the 6-min videos calculated from the information obtained by the tracking software were calculated and assumed as *relative distances*.

2.7. Comparative statistical analysis

A numerical analysis of fish positioning within different *areas* in the arenas was performed for each experimental treatment so that they could be statistically compared. The criterion of division into areas was based primarily on the Hagen–Poiseuille law, which considers the *shear force* between two layers moving at different speeds (i.e., the moving water and the flume's walls). In addition, the variations in water flow and the turbulences observed near the ports of entrance and exit could be critical for swimming acceptance or rejection depending on the level of regularity or predictability of the turbulences (Ellerby and Herskin, 2013). Considering the tools available, we could not quantitatively establish this level of turbulence. From this result, the flume's arenas for time points 20 and 40 were divided into 15 areas and arranged as shown in Fig. 3. The fish *residence* times in all these areas were then obtained by adding the presence time values for each element within each area,

which were averaged to a percentage value in relation to the recoding time.

For all the data (i.e., residence values within areas and relative distances), a log transformation was applied to normalize distributions and stabilize variances. Values were then analyzed for normality (the Kolmogorov–Smirnov “D” test) and homogeneity of variance (Bartlett’s test). A non-parametric (Kruskal–Wallis) test was applied in all cases, and the Mann–Whitney *U* test with Bonferroni correction was performed to identify any significant differences between both controls and between any of the treatments and the respective solvent control ($P < 0.05$). The solvent control diet group was selected as a reference after observing comparable trends in fish residence times for the different areas in the arena in relation to the respective non-solvent control. All the statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Although the statistical analysis is essential for describing differences between treatments, these categorical data ignore the spatial correlations among sampling points, which may reveal, important information once properly represented, i.e., in the form of heat maps (Chilés and Delfiner, 1999; Goovaerts, 1997). Hence, both endpoints, *presence* and *residence*, within arenas may complement each other.

2.8. Growth based on body length and width

Fish body lengths and widths were assessed at the two time points. Groups of 15 individuals/tank ($n = 30$ fish/treatment) were randomly selected once each swimming trial was completed. Individual fish were induced to a lethargic state by immersing them in ice-cold water and were positioned dorsally under an Olympus SZX12 dissecting microscope (Tokyo, Japan) and photographed. Body lengths were measured from the rostral-most portion of the head to the caudal-most portion of the tail fin. Body widths were assumed as the distances between the outer sides of the two otic vesicles. Measurements were made using the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

3. Results

3.1. Quantification of BDE-47 in test diets

The BDE-47 concentrations analyzed in the fortified diets were comparable to their respective nominal concentrations (see Supplementary Information, Table 1), with recovery rates between 93% and 106% with respect to nominal concentrations.

3.2. Swimming activity and relative distances traveled

The two-dimensional heat maps that corresponded to the time point 20 swimming trials are shown in Fig. 4. A scale of gradients for presence time was selected, which ranged from 0% to 4.4% of the overall recording time. Fish fed with the control diet showed a positional pattern within the arena, which revealed swimming “acceptance” toward the upstream region and near the left wall (Fig. 4 and 0a). The downstream region also showed comparatively high presence time values (Fig. 4 and 0a). The presence time values along these regions ranged from 0.3% to 1% of the overall 6-min recording time. The heat maps also showed a tendency of the control fish to swim away from the central arena region. A comparable swimming pattern was seen for fish fed with the solvent control diet (Fig. 4 and 0b). Similar swimming patterns were visually interpreted from the BDE-47-treated fish heat maps. The heat map for the CF-exposed fish corresponding to the time point 20 showed a positional pattern along the arena characterized by swimming “acceptance” toward zones near the downstream

Table 1

Medaka length and width according to the BDE-47 oral exposure treatment and time point.^a

BDE-47 (ng/g)	Time point 20		Time point 40	
	Length (mm)	Width (mm)	Length (mm)	Width (mm)
	(mean ± SD)	(mean ± S.D.)	(mean ± S.D.)	(mean ± S.D.)
0a ^b	7.03 ± 0.94	1.06 ± 0.13	8.93 ± 2.42	1.38 ± 0.44
0b ^c	7.11 ± 0.84	1.07 ± 0.12	10.26 ± 1.77	1.59 ± 0.32
10	7.26 ± 0.83	1.09 ± 0.11	9.30 ± 2.21	1.44 ± 0.40
100	6.93 ± 1.00	1.04 ± 0.13	8.70 ± 1.66	1.34 ± 0.30
1000	7.15 ± 0.89	1.07 ± 0.12	9.19 ± 2.47	1.42 ± 0.45

^a Values represent the mean (±SD) of $n = 30$ embryos measured per treatment.

^b Non-solvent control diet treatment.

^c Solvent (*n*-hexane) control diet treatment.

screen. Indeed, the presence time values in most regions within the arena were below 0.1%. This pattern suggested the inability of fish to hold position or to select regions of preference upstream (Fig. 4, CF). This heat map showed a clear differential swimming pattern with respect to that from the fish fed with the solvent control diet (Fig. 4 and 0b).

The descriptive statistics presented in Fig. 5 reveals a wide variability in data dispersion around the median residence values. The statistical comparison between the corresponding areas in the control and solvent control did not find significant differences (Fig. 5 and 0a vs. 0b). These results, together with the heat maps, indicate the existence of comparable swim patterns. In general, no significant differences were observed between the residence time values in any of the areas for the BDE-47-treated fish and the corresponding areas for the solvent control fish (Fig. 5). The only exception was in area 2C in the 1000 ng BDE-47/g group where the residence value was comparatively higher than that for the corresponding solvent control (i.e., 5.56 [1.85–11.74] vs. 2.56 [0.63–5.69]; values are expressed as the median with the 1.5 interquartile ranges [Q1–Q3] within brackets) ($P = 0.030$). This single difference was insufficient to identify the actual swimming pattern differences between the treated and the control fish. The statistical comparison between the residence time values in the areas of the CF-exposed fish and the corresponding areas for the solvent control fish revealed significant differences in a total of 11 areas ($P \leq 0.001$); (Fig. 5, CF). These differences, and the contrasting heat maps, revealed different swimming patterns with respect to the control fish.

The heat maps obtained from the swimming tests at time point 40 are shown in Fig. 6. Higher swimming presence time values of 0.3–1% for the control fish were identified primarily upstream and downstream and adjacent to the left wall (Fig. 6 and 0a). Overall, these zones of higher presence decreased in size compared to those observed in the time point 20 swimming tests. As a result, larger zones with presence time values of $\leq 0.15\%$ were seen mostly along the arena. The fish fed with the solvent control diet also showed the highest swimming time percentage values (i.e., 0.3–1%) in small zones upstream and downstream the arena adjacent to the left wall (Fig. 6 and 0b). This map apparently contrasted with that seen in the non-solvent control fish. However, the overall statistical comparative analysis of the residence values for the corresponding areas between both groups did not reveal significant differences (Fig. 7). The only exception was the 2B area where the non-solvent control fish showed a significantly higher swimming residence time (i.e., 9.06 [3.35–15.01] than the solvent control fish (2.60 [2.44–8.01]; $P \leq 0.015$) (Fig. 7 and 0b). In line with both control groups, the heat maps for the fish fed with BDE-47 revealed increased difficulty to hold their position revealing comparatively more constrained zones of high presence upstream and

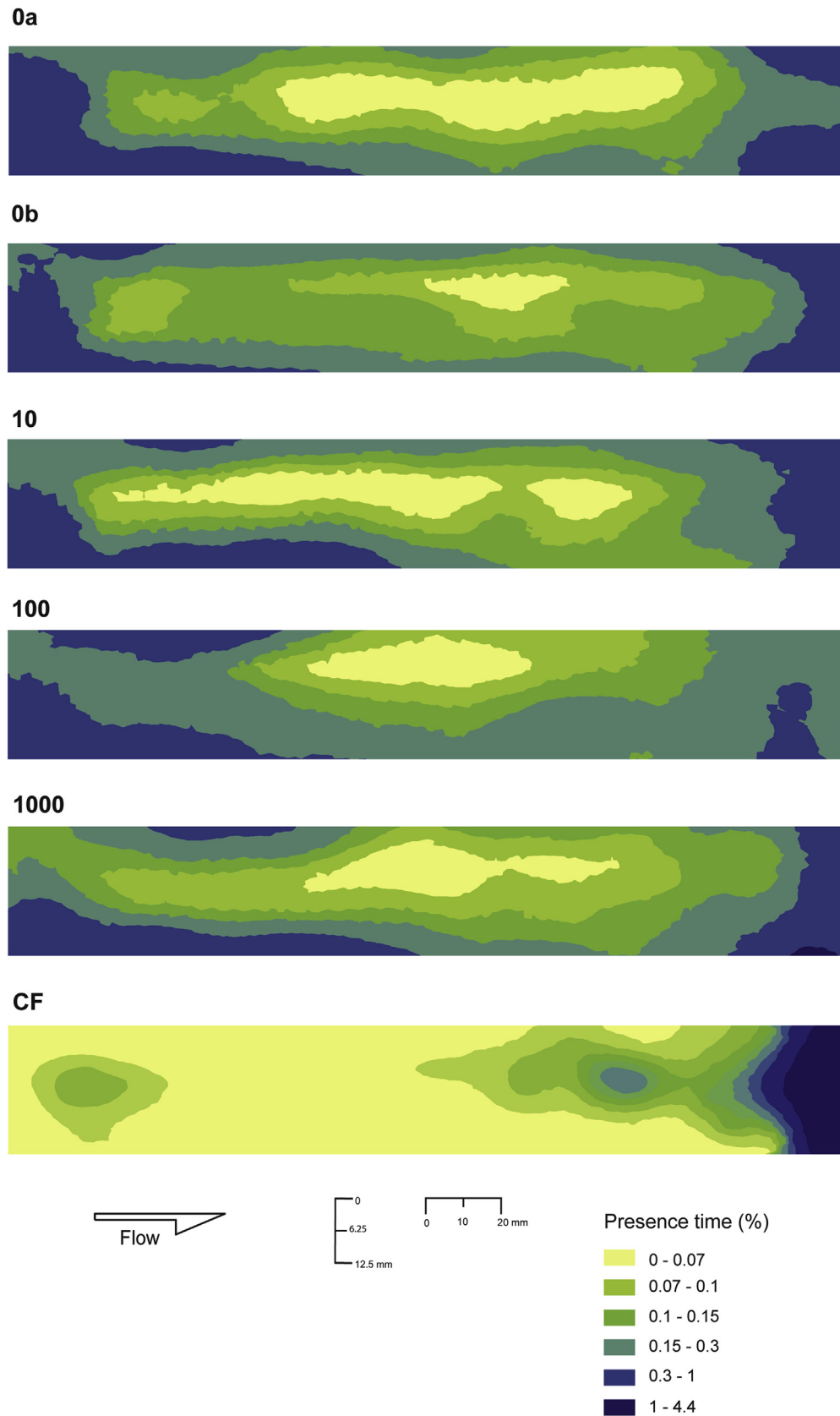


Fig. 4. Two-dimensional surface gradient maps for medaka positioning inside the arena at time point 20. 0a and 0b correspond to the non-solvent control or the solvent (*n*-hexane) control, respectively, and the 10, 100, and 1000 to the BDE-47 dietary exposures are expressed in ng/g. The CF arena corresponds to the positive control consisting of fish incubated with 50 ng CF/ml for 48 h. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of two replicates (15 fish/replicate; $n = 30$).

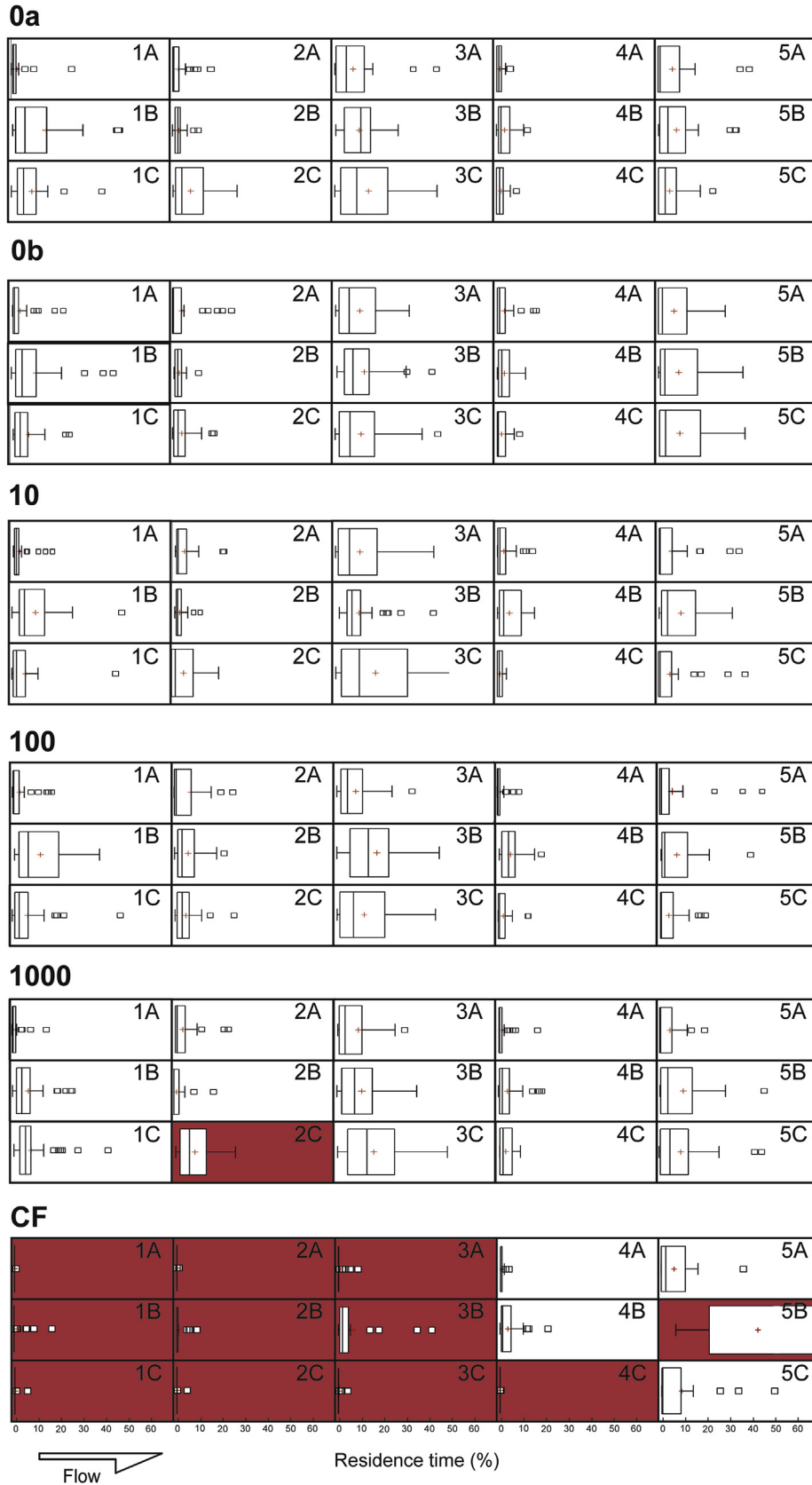


Fig. 5. Fish swimming residence times in all 15 areas of the arena at time point 20. For practical purposes, all the areas are represented as having equal sizes (Fig. 3 shows the actual proportions). The 0a and the 0b arenas correspond to the non-solvent control or the solvent (*n*-hexane) control, respectively, and the 10, 100, and 1000, to the BDE-47 exposures are expressed in ng/g. The CF arena corresponds to the positive control consisting of fish incubated with 50 ng CF/ml for 48 h. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally, with the boxes depicting the probability distribution of the data through their (± 25 th and 75th percentiles) quartiles. The whiskers on both sides indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles drawn to the largest and smallest data values within these ranges. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for 0a, 10, 100, 1000, and CF were compared with the presence time values in the respective area of 0b. A red solid area denotes a significant difference from the respective area in 0b ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence of two replicates (15 fish/replicate; $n = 30$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

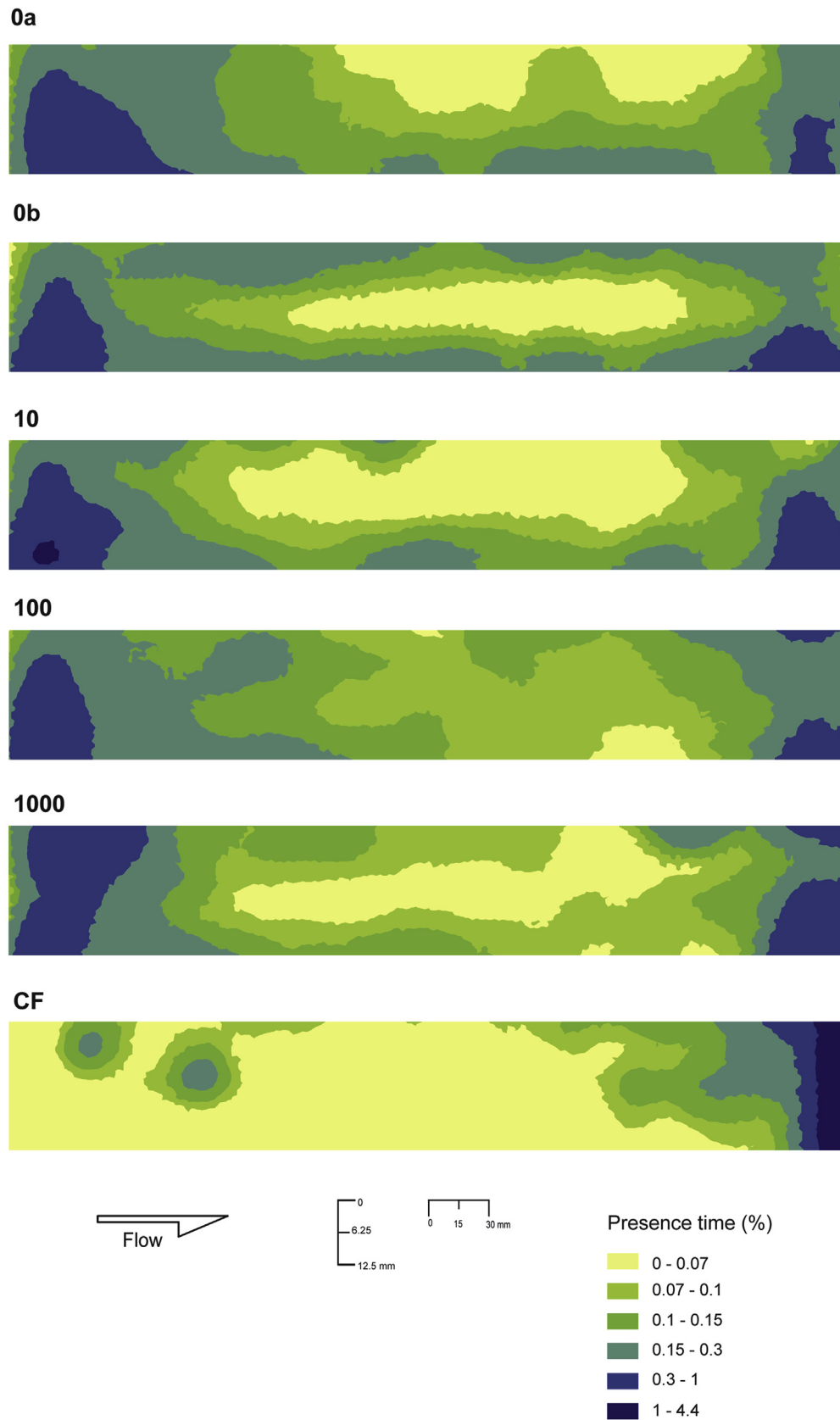


Fig. 6. Two-dimensional surface gradient maps of medaka positioning inside the arena at time point 40. 0a and 0b correspond to the non-solvent control or the solvent (*n*-hexane) control, respectively, and the 10, 100, and 1000 to the BDE-47 exposures are expressed in ng/g. The CF corresponds to the positive control consisting of fish previously incubated with 50 ng CF/ml for 48 h. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of two replicates (15 fish/replicate; $n = 30$).

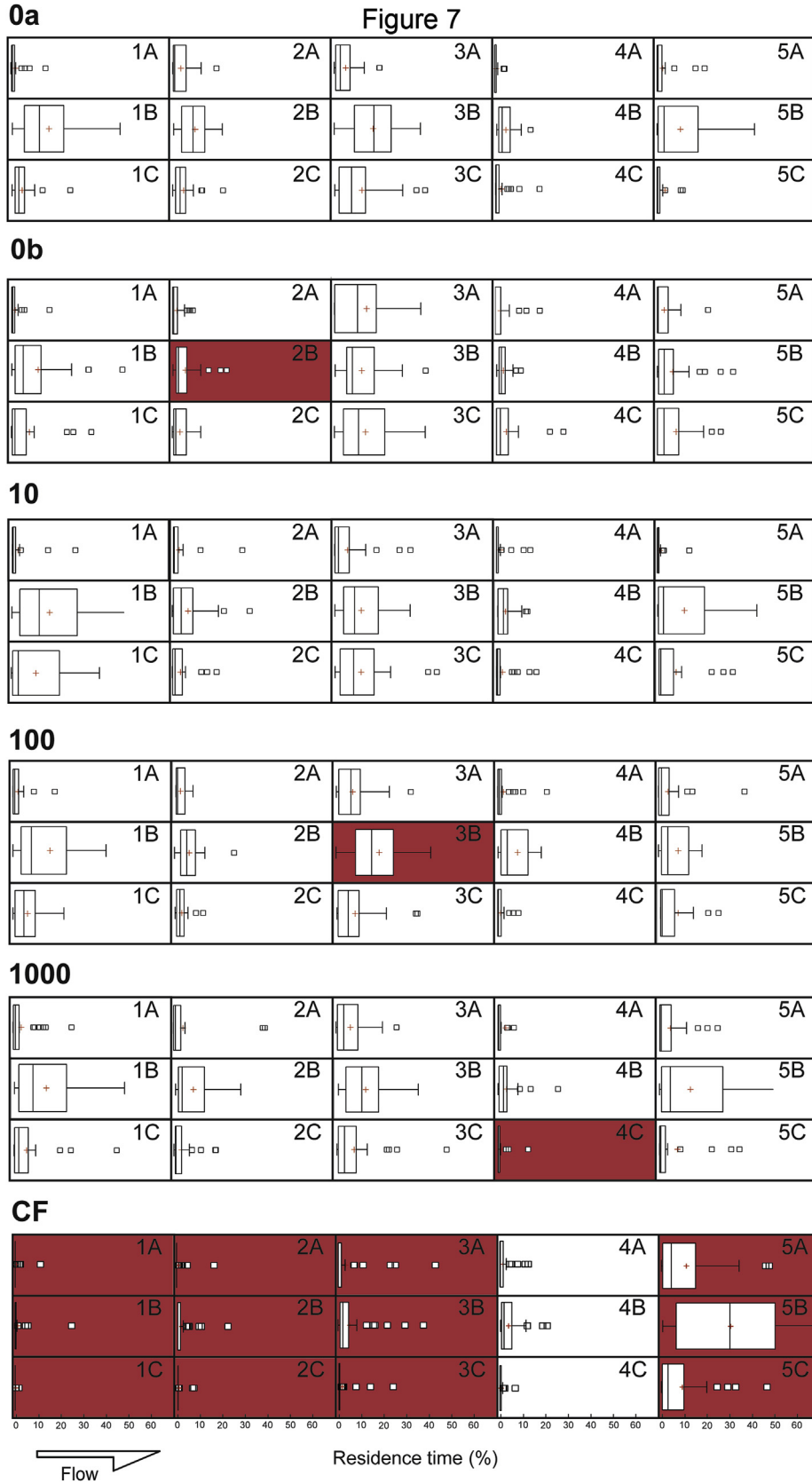


Fig. 7. Fish swimming residence times in all 15 areas of the arena at time point 40. For practical purposes, all the areas are represented as having equal sizes (for actual sizes, refer Fig. 3). The 0a and the 0b arenas correspond to the non-solvent control or the solvent (*n*-hexane) control, respectively, and the 10, 100, and 1000 to the BDE-47 exposures are expressed in ng/g. The CF arena corresponds to the positive control consisting of fish incubated with 50 ng CF/ml. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally, with the boxes depicting the probability distribution of the data through their (± 25 th and 75th percentiles) quartiles. The whiskers on both sides indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles drawn to the largest and smallest data values within these ranges. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for 0a, 10, 100, 1000, and CF were compared with the presence time values in the respective area of 0b. A red solid area in 0b denotes a significant difference from the respective area in 0a and in 10, 100, 1000, and CF from the respective area in 0b ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence of two replicates (15 fish/replicate; $n = 30$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

downstream the arena compared with the time point 20 gradient maps. The residence time values spent in the different areas from fish treated with the 10 ng BDE-47/g did not show significant differences with the respective areas for the solvent control fish (Fig. 7 and 0b vs. 10). The overall image of the heat map from the 100 ng BDE-47/g group showed two constrained areas with the narrowest presence time range (i.e., values $\leq 0.07\%$ of the overall recoding time; Fig. 6 and 100). Although higher, the adjacent areas still showed low presence values (i.e. $\leq 0.15\%$). Indeed, the statistical comparative analysis of the residence values between this treatment and the solvent control group revealed a large central area only from the 100 ng BDE-47/g treatment (i.e., Fig. 7; area 3B) with a significantly higher residence time value (i.e., 15.71 [8.61–25.56]) that observed in 0b (i.e., 7.67 [7.48–17.55]; $P = 0.038$). The heat map of the 1000 ng BDE-47/g treatment group showed similar presence patterns, which were supported by the statistically comparable residence times with the corresponding areas from the solvent control group (Fig. 7). The only exception was found in area 4C, with a significantly lower residence value observed for the 1000 ng BDE-47/g group (i.e., 0.18 [0.00–0.80]) than that for 0b (1.81 [0.05–5.32]; $P = 0.043$). Nevertheless, these two differences in 100 and in 1000 ng BDE-47/g were not enough to conclude significant swimming pattern changes caused by the BDE-47 dietary exposure. The heat map for CF-exposed fish at time point 40 showed the higher presence time range values of 1.0–4.4% within a zone next to the downstream screen (Fig. 6, CF). As with time point 20, this pattern revealed a dragging force with lack of actual capacity of CF-exposed fish to swim against the water flow. The statistical comparison made between the corresponding 15 areas in the CF-exposed fish and the solvent control fish showed significant differences in a total of 12 areas ($P \leq 0.002$) (Fig. 7, CF). These differences, together with the heat maps, clearly show the existence of differential swim patterns.

The relative distances traveled at time points 20 and 40 during the 6-min recording time are shown in Fig. 8. At time point 20, the relative distances in the non-solvent and the solvent control were 4359 ± 283 and 4095 ± 217 mm (values expressed as mean \pm standard error mean), respectively. These values were comparable to those observed in the BDE-47-treated fish. At time point 40, the relative distances increased and followed mainly the

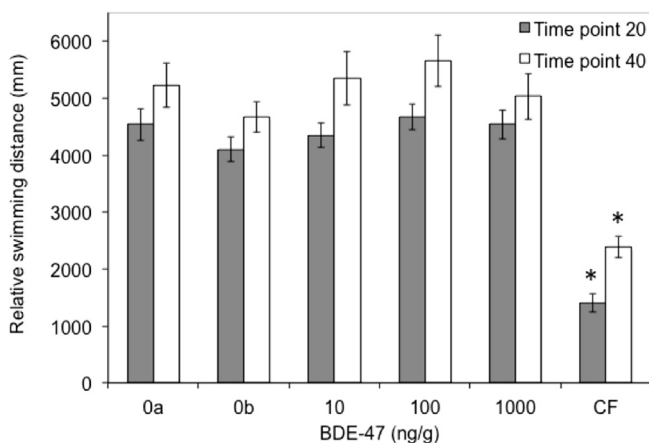


Fig. 8. Relative swimming distances traveled along arenas at time points 20 and 40. Values for 0a, 0b, and CF correspond to the non-solvent control, the solvent (*n*-hexane) control, or the positive control (50 ng CF/ml), respectively. An asterisk (*) indicates significant differences from the respective solvent control for a specific time point ($P < 0.05$). Values represent the mean (\pm S.E.M.) of two independent replicates (15 fish/replicate; $n = 30$).

same pattern as that at time point 20 for all the treatments. The relative distances traveled by the CF-exposed fish at time points 20 (1407 ± 163 mm) and 40 (2379 ± 185 mm) were comparatively lower than those traveled by the solvent control fish ($P < 0.05$).

3.3. Body lengths and widths

The fish lengths and widths are shown in Table 1. At time point 20, no differences in fish widths or thicknesses were observed between the control groups and BDE-47-exposed groups. In general, during this developmental period, the fish thickness occupied 4.2% of the total flume width. At time point 40, the fish thicknesses were comparable in all cases and occupied $>5.3\%$ of the flume width. Lack of differences in the overall body size between the control groups and the BDE-47-exposed groups at both time points eliminated this phenotypic variable as a potential factor, affecting swimming behavior.

4. Discussion

Despite the high K_{ow} of the lower brominated congeners, numerous studies have been conducted that report on the neurobehavioral disorders of PBDEs after waterborne exposures at early (pre- and post-hatch) developmental stages of fish. By using this exposure approach, different types of basic motor behaviors have been used as endpoints made in still environments and within relatively small enclosures. For instance, using video analyses, Zhao et al. (2014) observed hypoactivity in zebrafish (*Danio rerio*) larvae placed in 96-well plates under alternating 10-min light/dark conditions from embryonic exposures to nominal 500 μg BDE-47/l. McClain et al. (2012) determined that 15,546 μg 2,2,4,5-tetrabromodiphenyl ether (BDE-49)/l exposure negatively affected larval zebrafish neurobehavioral function in a touch-escape response quantified in Petri dishes. Usenko et al. (2011) reported comparable effects on spontaneous embryonic movement and subsequent swimming rates analyzed in 48-well plates from exposures of dechorionated zebrafish embryos to six independent PBDE congeners at concentrations that was within the 635–20,000 $\mu\text{g}/\text{l}$ range. Using 24-well plates as receptacles, Chen et al. (2012a) observed changes in activity response to light stimuli from 118-h-duration zebrafish embryolarval exposures to a commercial waterborne PBDE mixture (i.e., DE-71, 31–228 $\mu\text{g}/\text{l}$). Studies by Chen et al. (2012b) with dechorionated zebrafish embryos exposed statically to concentrations that were 20–40 times higher than that in the aforementioned study (i.e., 608–9700 μg BDE-47/l) concluded effects on spontaneous movement, reduced touch response, free swimming speed, and changes in overall swimming behavior analyzed in 24-well plates. Although experimentally comparable, these reports reveal the wide disparity in behavioral outcomes when considering the different PBDE congeners and the huge differences in the assayed concentrations. In addition, previous studies conducted in our laboratory with medaka embryos questioned the efficiency of these waterborne exposures, particularly for BDE-47 because of its unachievable waterborne presence (González-Doncel et al., 2014).

Arguably, the most feasible route of PBDE exposure is through contaminated food ingestion (Fraser et al., 2009). To date, there is very limited information on the effects of dietary PBDEs on fish basic behavior including locomotor swimming activity. Only Chou et al. (2010) performed a zebrafish behavioral testing in 6-well plates that contained 10 ml of water from dietary exposure through pelleted food from 21 to 90 dph using the same concentrations as those in our experiments. Although an intrinsic mathematical dependence of endpoints was observed, between the total swimming distance and percent time active, the values these

authors reported for both endpoints were significantly lower in the high dose group than in the *non-solvent* control group. However, no significant differences were observed with what should be the actual control group to compare, that is, the solvent (methanol) control group. Hence, no conclusive evidence was obtained from these results. Our findings agree with Chou et al. (2010) investigation because the swimming patterns, residence times, and relative distances for the BDE-47-treated groups were comparable to those for the solvent (*n*-hexane) control.

To date, no flumes have been developed that strictly allow the evaluation of swimming activity of early or pre-mature stages of fish whose size or low pigmentation might hinder accurate fish tracking. The swimming apparatus described herein, coupled to a computer image processing system and the *geostatistical* implementation, allows representing swimming activity in the form of heat maps. These heat maps discern between swim patterns by differentiating between zones of *acceptance* and others of *rejection* negotiated by fish to optimize energy losses. Under these critical environmental conditions of flow and speed, chances are that any affected fish locomotor ability would reveal altered swimming strategies. The results obtained in the present study do not indicate significant effects of dietary BDE-47 on swimming capacity or changes in the behavioral strategies of growing medaka fish.

In our investigation, the addition of a CF-positive control has shown the validity of the dynamic approach presented toward a sensitive and more environmentally realistic scenario of fish early swimming behavior. Indeed, the results obtained using our experimental swimming device, from 48-h duration exposures to 50 ng CF/ml are comparable, or even more sensitive than those published in previous investigations with longer exposure times where still conditions and external stimuli were used to stimulate fish activity. Levin et al. (2004) reported altered swimming behavior, calculated from movement recordings using a segmented 16-diameter cylinder, after 120-h exposure of zebrafish embryos and hatchlings to 100 ng CF/ml. A research by Khalil et al. (2013) with 3-month old medaka fish placed on a circular glass aquarium showed swimming movement and social behavior alterations after 192-h exposure to 12 ng CF/ml. Recently, Macaulay et al. (2015) selected a 350 ng CF/ml and 192-h exposure as a positive control for a study with larval and juvenile zebrafish to evaluate the effects of a PBDE metabolite on swimming activity induced by light–dark cycles. Therefore, the 50-ng CF/ml and a 48-h exposure were sufficient to elicit significant swimming alterations in medaka at time points 20 and 40.

Within the risk assessment framework, it is necessary to invest in developing strategies and methods for reliable fish behavior analyses, which can be implemented in current standard toxicity tests. Although the current analyses of the different endpoints of fish behavior conducted under static conditions may offer advantages, such as ease and experimental reproducibility, the limited space available for fish movement and the input of artificial external stimuli may lead us to question the actual environmental representativeness of such data. Swim flumes foster a high level of functioning through a dynamic and more environmentally realistic environment and thus offer fish the opportunity to opt for different swimming strategies to cope with a water flow. The present work showed how these strategies can be translated into specific movement patterns.

Acknowledgements and funding

The authors are grateful to C. del Río, C. González, and I. Atiénzar for the valuable help with fish maintenance and technical support during videotaping. We also appreciate Dr. W. M. Rauw (Dpt. Animal Breeding, INIA) and A. Kraaijkamp (Noldus Information Technology BV) for their technical support with the tracking software.

This work was jointly supported by the Spanish Government Grants CTM2013-44986-R and CTM2014-52388-R. The medaka fish used in the experiments were manipulated in accordance with Directive 86/609/EEC on the protection of animals for experimental and other scientific purposes in the European Union. The contents presented in this work are solely the authors' responsibility and do not necessarily represent the official views of supporting Governmental Institutions.

Appendix A. Supplementary data

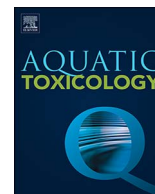
Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.122>.

References

- Anderson, T., MacRae, J.D., 2006. Polybrominated diphenyl ethers in fish and wastewater samples from an area of the Penobscot River in Central Maine. *Chemosphere* 62, 1153–1160.
- Brett, J.R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 21, 1183–1226.
- Chen, T.H., Cheng, Y.M., Cheng, J.O., Chou, C.T., Hsiao, Y.C., Ko, F.C., 2010. Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 377–383.
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L., Zhou, B., 2012a. Acute exposure to DE-71: effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2338–2344.
- Chen, X., Huang, C., Wang, X., Chen, J., Bai, C., Chen, Y., Chen, X., Dong, Q., Yang, D., 2012b. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 120–121, 35–44.
- Chilés, J.P., Delfiner, P., 1999. *Geostatistics: Modeling Spatial Uncertainty*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Chou, C.T., Hsiao, Y.C., Ko, F.C., Cheng, J.O., Cheng, Y.M., Chen, T.H., 2010. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 98, 388–395.
- Darnerud, P.O., Eriksen, G.S., Jóhannesson, T., Larsen, P.B., Viluksela, M., 2001. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 1), 49–68.
- Ellerby, D.J., Herskin, J., 2013. Swimming flumes as a tool for studying swimming behavior and physiology: current applications and future developments. In: Palstra, A.P., Planas, J.V. (Eds.), *Swimming Physiology of Fish*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 345–375.
- Fiaz, A.W., León-Kloosterziel, K.M., Gort, G., Schulte-Merker, S., van Leeuwen, J.L., Kranenbarg, S., 2012. Swim-Training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 7 (4), e34072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034072>.
- Fraser, A.J., Webster, T.F., McClean, M.D., 2009. Diet contributes significantly to the body burden of PBDEs in the general U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 117, 1520–1525.
- Gamperl, A.K., Rodnick, K.J., Faust, H.A., Venn, E.C., Bennett, M.T., Crawshaw, L.I., Keeley, E.R., Powell, M.S., Li, H.W., 2002. Metabolism, swimming performance, and tissue biochemistry of high Desert redband trout (*Oncorhynchus mykiss* ssp.). Evidence for phenotypic differences in physiological function. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 413–431.
- González-Doncel, M., Torija, C.F., Beltrán, E.M., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Carbonell, G., 2014. Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. *Aquat. Toxicol.* 148, 184–194.
- González-Doncel, M., Sastre, S., San Segundo, L., 2015. Dynamic system for the quantitative analysis of fish eleutheroembryos and larvae swimming behavior. *European Patent P201530256*.
- González-Doncel, M., Carbonell, G., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Beltrán, E.M., Torija, C.F., 2016. Effects of dietary 2,2', 4,4'-Tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 16, 141–152.
- Goovaerts, P., 1997. *Geostatistics for Natural Resources Evaluation*. Oxford University Press, USA.
- Gravato, C., Guilhermino, L., 2009. Effects of benzo(a)pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers, growth and behavior. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 121–137.
- Hahn, J., Manchester-Neesvig, J.B., DeBord, D., Sonzogni, W.C., 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Lake Michigan forage fish. *J. Gt. Lakes. Res.* 35, 154–158.
- Huang, Y., Zhu, G., Peng, L., Ni, W., Wang, X., Zhang, J., Wu, K., 2015. Effect of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on sexual behaviors and reproductive function in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 102–108.
- Janssen, S., 2005. Brominated Flame Retardants. Rising Levels of Concern. *Health Care without Harm*, Arlington, VA, p. 39. https://noharm.org/sites/default/files/lib/downloads/bfrs/BFRs_Rising_Concern.pdf. Accessed: February 2017.
- Khalil, F., Kang, I.J., Undap, S., Tasmin, R., Qiu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2013.

- Alterations in social behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemosphere* 92, 125–130.
- Levin, E.D., Swain, H.A., Donerly, S., Linney, E., 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 226, 719–723.
- Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behaviour as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19.
- Macauley, L.J., Bailey, J.M., Levin, E.D., Stapleton, H.M., 2015. Persisting effects of a PBDE metabolite, 6-OH-BDE-47, on larval and juvenile zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 52, 119–126.
- McClain, V., Stapleton, H.M., Tilton, F., Gallagher, E.P., 2012. BDE 49 and developmental toxicity in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 155, 253–258.
- Usenko, C.Y., Robinson, E.M., Usenko, S., Brooks, B.W., Bruce, E.D., 2011. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1865–1872.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416–1427.
- Ward, D.L., Maughan, O.E., Bonar, S.A., 2002. A variable-speed swim tunnel for testing the swimming ability of age-0 fish. *N. Am. J. Aquacult* 64, 228–231.
- Zhao, J., Xu, T., Yin, D.Q., 2014. Locomotor activity changes on zebrafish larvae with different 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) embryonic exposure modes. *Chemosphere* 94, 53–61.

ANEXO IV



Research paper

Bioaccumulation, maternal transfer and effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure on medaka fish (*Oryzias latipes*) offspring



Miguel González-Doncel^{a,*}, Salvador Sastre^a, Gregoria Carbonell^a, Eulalia María Beltrán^a, Cristina González Anaya^a, José Enrique García-Mauriño^b, Carlos Fernández Torija^a

^a Laboratory for Ecotoxicology, Department of the Environment, National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, A-6, Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain

^b Department of Cell Biology, School of Medicine, Complutense University, Ciudad Universitaria, E- 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Polybrominated diphenyl ethers
BDE-47 accumulation
Reproduction
Maternal transfer
Swimming behavior

ABSTRACT

A previous study conducted in our laboratory with growing medaka (*Oryzias latipes*) showed the capacity of BDE-47 (10–1000 ng/g) to bioaccumulate during a 40-day oral exposure. However, the results did not provide evidence for effects during or after the exposure period. In this study, breeding medakas were fed a diet for 40 days that contained 1000 ng of BDE-47/g. At predefined time points, females (time points 10, 20, 30 and 40), males (time points 30 and 40) and pools of laid eggs (time points 10, 20, 30 and 40) were sampled and collected for: 1) the BDE-47 quantitative analysis in adults in the < 24-h-old post-fertilization (hpf) embryos, and in the < 24-h-old post-hatch (hph) eleutheroembryos; 2) the evaluation of fecundity, fertility and hatching. Additional pools of embryos collected at time point 40 were evaluated for: 1) the active swimming behavior of the 48 hph offspring in the eleutheroembryonic stage; 2) the BDE-47 quantification in the 240 hph resultant larvae. BDE-47 accumulated in parents rapidly, and concentrations remained constant at higher levels in males (values within the 50–60 ng/g wet weight – w.w.- range) compared with females (70 ng/g w.w. range). The BDE-47 concentrations detected in embryos and eleutheroembryos ranged from 200 to 500 ng/g w.w. for time points 10–40. Reproductive capacity, hatching and ensuing swim bladder inflation were not affected by parental BDE-47 dietary exposure, nor was the active swimming behavior in eleutheroembryos. The BDE-47 concentration in the 240 hph larvae lowered to levels close to those detected in parents. Despite the efficient BDE-47 maternal transfer, these results offered no evidence for BDE-47 effects on fish reproduction or in the early life stages of offspring.

1. Introduction

Brominated flame retardants (BFRs), among which polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) traditionally stand out, are organobromine compounds characterized by an inhibitory effect on combustion. PBDEs are presented in three industrial-scale commercial mixtures that predominantly contain an average of five (penta-bromodiphenyl ether [BDE]), eight (octa-BDE), or ten (deca-BDE) bromine atoms. Although penta-BDE and octa-BDE have been banned from production, these groups of compounds have attracted the most attention due to their potential to persist and bioaccumulate in the biota, with the 2,2',4,4'-

tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) found in aquatic wildlife at comparatively high concentrations (Valters et al., 2005; Meng et al., 2008; Montie et al., 2010).

BDE-47's high log K_{ow} suggests an accumulation capacity in lipid-rich tissues (US EPA, 2008). Besides, while a log K_{ow} is a good predictor of the partitioning tendency of a compound between water and lipids, its actual potential to bioaccumulate also depends on the balance among the animal's capacity to assimilate, metabolize and excrete the chemical (Newman and Unger, 2003). In females, the added potential of substance translocation into eggs acts as another variable for the chemical's final net accumulation in the body of fish. Hence, it is during

Abbreviations: b.w., body weight; BFRs, brominated flame retardants; dph, day-old post-hatch; RM, embryo-rearing medium; hpf, hour-old post-fertilization; hph, hour-old post-hatch; l.w., lipid weight; PBDEs, polybrominated diphenyl ethers; ID, identification of tanks; BDE-47, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether; PBB-80, 3,3',5,5'-tetrabromo-1,1'-biphenyl; w.w., wet weight

* Corresponding author.

E-mail address: miguelgd@inia.es (M. González-Doncel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.024>

Received 26 May 2017; Received in revised form 24 July 2017; Accepted 26 September 2017

Available online 28 September 2017

0166-445X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

fish reproductive periods that BDE-47 active accumulation results in transfer from gravid females to eggs. Based on BDE-47 exposure levels, the chances are that this indirect exposure route could result in developmental effects in fish early life stages (ELS) (Därnerud, 2003). Therefore, information on the consequences of embryonic exposure to BDE-47 via maternal transfer would be valuable from an environmental risk assessment perspective given this realistic exposure scenario approach and the particular sensitivity of these life stages.

To date some studies have relied on waterborne exposures and have reported BDE-47 toxicity in pre- and post-hatch stages of fish ELS (Lema et al., 2007; Usenko et al., 2011). However, the efficiency of these waterborne exposures has been concluded to be environmentally unrealistic (González-Doncel et al., 2014). It is generally accepted that the main exposure route of predators to highly lipophilic contaminants is the consumption of contaminated food (Streit, 1998) and, by extension, that of their offspring through active maternal transfer. Yet, very few studies with fish and BDE-47 dietary exposures have reported either its toxicokinetics (Stapleton et al., 2004; Muirhead et al., 2006; Tomy et al., 2004) or its maternal transfer (van de Merwe et al., 2011; Wen et al., 2015). The efficiency of bioaccumulation and maternal transfer in zebrafish (*Danio rerio*) from dietary exposures to BDE-47 encapsulated in brine shrimp (*Artemia* spp.) has been demonstrated via lipid mobilization during oogenesis (van de Merwe et al., 2011). A recent research work has revealed sex-related differences in the accumulation and effective BDE-47 transfer from adult zebrafish females to eggs (Wen et al., 2015). Based on these observations, it remains unknown whether this BDE-47 maternal transfer would bring about effects in offspring and in their capacity to eliminate the contaminant once BDE-47 is translocated during oogenesis from parental exposure. In a previous research we observed the ability of fish to eliminate BDE-47 following 40-day BDE-47 (10–1000 ng/g) dietary exposures (González-Doncel et al., 2016). We also reported no effects in medaka (*Oryzias latipes*) growing phases, nor on their fecundity, fertility and hatching rates 60 days after exposures finished. The observed effective BDE-47 depuration observed could result in negligible maternal transfer into eggs, which would support the lack of effects seen on fertilization and embryo development. In the present work, we aimed to investigate the accumulation, dynamics and translocation of a 40-day BDE-47 parental exposure from gravid female medaka fish to eggs, eleutheroembryos and larvae. To assess the effects on offspring, we examined the overall egg laying capacity, fertility, hatching success and eleutheroembryo behavior in forced swimming terms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and preparing test diets

BDE-47 was purchased neat from ChemService, (West Chester, PA, USA). A concentrated stock solution (1 µg BDE-47/µl DMSO; > 99.9%; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was made and stored at –20 °C. This stock solution was diluted to 1:100 with *n*-hexane (> 95%; Sigma–Aldrich) to make a 0.01 µg BDE-47/µl *n*-hexane (> 95%;

Sigma–Aldrich) working solution, and was stored at –20 °C. Chlorpyrifos (CF), selected as a positive behavioral control (see 2.5 Assessment of locomotor activity in eleutheroembryos), was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA), dissolved in DMSO to make a 1 mg/ml stock solution, and stored at –20 °C. The diet with BDE-47 was prepared as previously described and its nutritional composition is detailed elsewhere (González-Doncel et al., 2016). Briefly, a blended diet of bluish-green filamentous algae (*Spirulina*; Argent Laboratories, Redmond, WA, USA) and fish flake food (Sera Vipran, Heinsberg, Germany) was ground and passed through a 1000-µm sieve. Then 50 g of the blend product were initially wetted with 5 ml of the BDE-47 working solution to which additional 45-ml *n*-hexane were added to help evenly distribute BDE-47. The mixture was stirred and allowed to dry, which yielded a spiked test diet that contained 1000 ng of BDE-47/g. A solvent control diet was prepared by mixing 50 g of the diet with 50 ml of *n*-hexane.

Based on our previous observations of the bioaccumulation dynamics of dietary BDE-47 exposure in growing medaka fish (González-Doncel et al., 2016), the 1000 ng/g concentration was selected for the present research. Diets were ground and passed through ≤ 620-µm. Portions were transferred to eppendorf tubes in the proper amounts for daily feeding, and were stored at –20 °C.

2.2. Dietary BDE-47 exposure and experimental design

One hundred sexually mature medakas (40 males and 60 females; 165-day-old post-hatch –dph–; mean mass 0.49 ± 0.08 g expressed as the mean ± SD) were obtained from our stock culture housed in a recirculating system. An experimental setup was arranged and included twelve 8-L capacity tanks of a flow-through system, which received the same water as that used for the stock culture. The flow rate in each tank was adjusted to 18 ml/min, which involved a minimum of three 100% daily water renewals. The photoperiod was set as a constant light cycle of 15L: 9 D.

Fish were distributed in the tanks by random assortment at the 2:3 male:female ratio. This setup comprised three experimental groups of four tanks each also placed by random assortment in the flow-through system (Fig. 1). The first group, designated as the “SC-R” experimental group, corresponded to the fish fed with the solvent (*n*-hexane) control diet. The second and third groups of tanks, namely “1000-R” and “1000-A”, included the fish fed with the 1000 ng BDE-47/g diet. The tanks for the first (SC-R) and the second (1000-R) experimental groups contained five fish per tank and were used solely for the reproduction and offspring studies. The 1000-A experimental group contained 15 fish per tank and was subjected to the BDE-47 bioaccumulation and maternal transfer studies (see 2.3 BDE-47 quantification in test diets, adult fish, embryos, eleutheroembryos and larvae). At the end of the experimental period (i.e. time point 40) the pools of the remaining eleutheroembryos that had been collected from the three experimental groups were subjected to swimming performance tests under dynamic conditions (see 2.5 Assessment of locomotor activity in eleutheroembryos).

The solvent (*n*-hexane) control and the 1000 ng of BDE-47/g diets

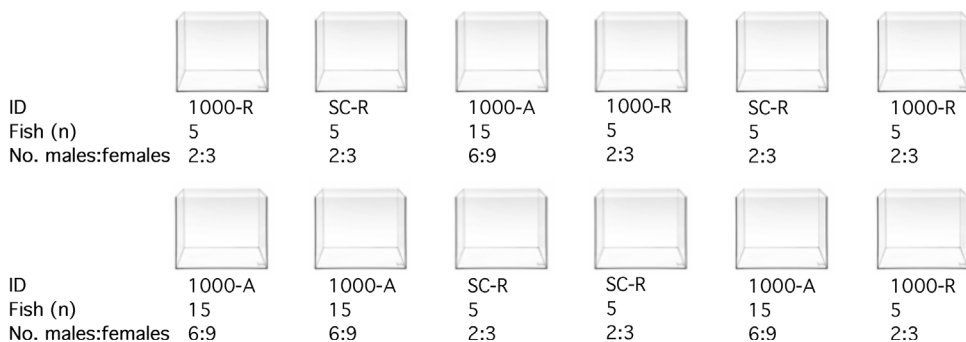


Fig. 1. Experimental setup of the BDE-47 dietary exposure of breeding medakas. Fish and tank identification (ID) was done by random assortment. There were three experimental groups with four tanks each: tanks with the fish fed with the solvent control diet (SC-R) or with the BDE-47 diet (1000-R), intended for reproduction studies; tanks with the fish fed with the BDE-47 diet intended for the BDE-47 bioaccumulation studies (1000-A).

were administered during a 40-day period via automatic feeders. These feeders dispensed food gradually from 09:00 h to 12:00 h. Fish were fed with the diets on a daily 5% body weight (b.w.) basis, supplemented with live brine shrimp (Instar I) twice daily at least 3 times a week. During the 40-day exposure period, the amount of diet was adjusted every 10 days according to the number of fish that remained in each tank and the fish weights recorded at each sampling time point. Water quality parameters were monitored every 10 days (mean \pm SD): temperature (24–26 °C), pH (7.48 \pm 0.16), dissolved oxygen (7.59 \pm 0.82 mg/L), and conductivity (116.2 \pm 4.02 μ S/cm).

2.3. BDE-47 quantification in the test diet, adult fish, embryos, eleutheroembryos and larvae

The actual concentration in the nominal 1000 ng of BDE-47/g blended diet was analyzed following the method described by González-Doncel et al. (2016). Briefly, after adding 400 ng of 3,3',5,5'-tetrabromo-1,1'-biphenyl (PBB-80) congener (717711, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) as an internal standard, 1 g of fish food was extracted 3 times with 5 ml of dichloromethane for 10 min in an ultrasonic bath. Extracts were recovered by centrifugation (3500 rpm, 5 min) and were treated with 2 ml of concentrated sulfuric acid 3 times. Then, extracts were cleaned in an acid silica gel column (6 g silica gel: concentrated H₂SO₄ on a 3:2 w.w), evaporated and dissolved in 0.2 ml of *n*-hexane. The BDE-47 concentration was determined by a GC/MS analysis as described by González-Doncel et al. (2014). Quantification was performed by building a calibration curve with 10 food samples fortified with 4–1000 ng of BDE-47/g. Recoveries ranged from 72% to 117% and were calculated with seven batches of 1 g food, which was fortified at five levels: 19, 78, 312, 1250 and 5000 ng of BDE-47/g.

The BDE-47 accumulation in adult fish was evaluated at the predefined time points throughout the experimental period. Female fish, one from each tank from the 1000-A experimental group, were collected at time points 10, 20, 30 and 40. Additionally, one male was collected from the same tanks at time points 30 and 40 as a reference to compare to the accumulation values seen in females throughout period from the mid-stage to the end of the study. Hence by the end of the experimental period these tanks ended up containing nine fish: *i.e.* four males and five females. To diminish the presence of food in the digestive system, fish were collected early in the morning before feeding started. Individual fish were overdosed with tricaine methanesulfonate (\geq 200 μ g/ml, Argent Laboratories, Redmond, WA, USA), blot-dried, weighed and transferred to 1.5-ml eppendorf conical tubes, and frozen immediately at -20 °C for later BDE-47 quantifications in fish whole bodies (see below).

The BDE-47 maternal transfer in the < 24-h-old post-fertilization (hpf) embryos (*i.e.* egg phase), and in the < 24 hph eleutheroembryos, was evaluated at the 10, 20, 30 and 40 sampling time points. Around 3 h after the daylight cycle had started, clusters of eggs were collected from the females that were from the 1000-A experimental group. Four groups of 35 fertilized eggs from each tank were rinsed with MilliQ water, separated, blot-dried and transferred to eppendorf tubes where they were frozen until the BDE-47 quantification (see below). The remaining embryos from each corresponding tank were transferred to 6-well culture plates that contained 5 ml of embryo-rearing medium (RM) (Rugh, 1962), and were incubated (25 \pm 1 °C; 15L: 9D) with daily RM renewals until hatching took place. The resultant < 24 hph eleutheroembryos from each tank were overdosed with tricaine methanesulfonate, transferred to eppendorf tubes in groups of 30, and were weighed and frozen at -20 °C for the BDE-47 analytical quantification.

The BDE-47 remaining from the maternal exposures in the 10 dph larvae was quantified from the eggs collected at the end of the experimental period (*i.e.* sampling time point 40). The additional groups of eleutheroembryos from the 1000-R experimental groups were transferred to form groups of 20 in the 8-L tanks in the flow-through system and were fed *ad libitum* with microfine Spirulina for 10 days.

These follow-up groups of larvae were then overdosed with tricaine methanesulfonate the following morning, transferred into eppendorf tubes, and were weighed and frozen at -20 °C for the BDE-47 quantification.

2.4. Evaluation of reproductive and hatching success

An effects assessment on reproductive capacity (fecundity and fertility) was made at the same predefined time points used for the BDE-47 quantification (*i.e.* 10, 20, 30 and 40). Clusters of eggs were collected from each individual female in the SC-R and 1000-R experimental groups, cleaned, separated in Petri dishes that contained system water, and were counted and checked for fertilization under a dissecting microscope. Having recorded the fertilization percentages, groups of 20 embryos from each tank were transferred to four wells of the 6-well culture plates that contained 5 ml of RM. Plates were incubated (25 \pm 1 °C; 15L: 9D) with daily renewals until hatching occurred to record the hatching time and the number of hatched embryos. Swimbladder inflation was checked among the 72 hph eleutheroembryos.

2.5. Assessment of locomotor activity in eleutheroembryos

At the end of the experimental period (*i.e.* time point 40), the 48 hph eleutheroembryos, which originated from the remaining eggs collected from the solvent (*n*-hexane) control (SC-R) and the 1000 ng of BDE-47/g (1000-R and 1000-A) groups were assessed for swimming activity. A miniaturized swim flume (González-Doncel et al., 2015) was fabricated and adapted to a closed recirculating system (see Video S1, Supplementary information). The flume area in which fish were tested for swimming activity was made with Teflon tubing, which opened longitudinally and was placed over a lighting unit. Two screens, placed 150 mm away from one another, delimited the flume for swimming (*i.e.* arena). A flowmeter controlled the velocity of the water in the flume. A thermostatic heater, placed in a reservoir above the flume, maintained the water temperature at 26–27 °C before entering the flume. For the swimming tests, the water velocity was set at 3.2 cm/s according to Brett's methods (Brett, 1964), but with modifications given the open design of this flume. Briefly, pools of 25 untreated 48 hph eleutheroembryos in groups of five were transferred to the flume and subjected to successive water flow increments of approximately 0.6 cm/s at 6-min intervals. The number of fatigued fish was progressively recorded by considering that one fish had reached exhaustion when it was dragged to the downstream screen and remained there for > 5 s. Overall, the obtained fatigue values showed wide variability (Fig. 2). The 3.2 cm/s

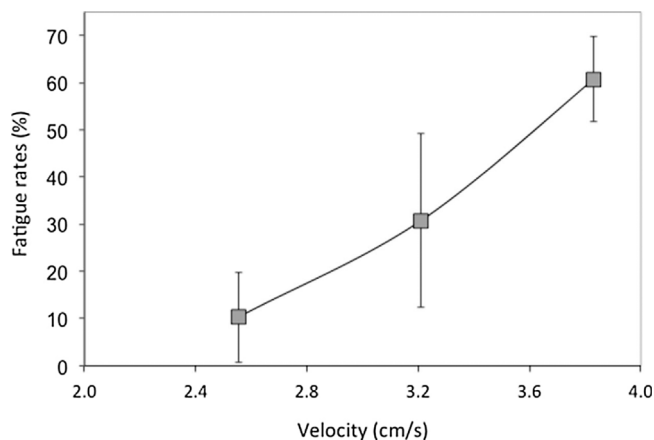


Fig. 2. The graph shows the fatigue percentage observed in the 48 hph medaka eleutheroembryos subjected to sequential 6-min swimming trials with 0.6 cm/s water velocity increments. The values in this graph are the mean (\pm SEM) of five independent groups where each group consists of five fish.

selected for the swimming tests in the medaka eleutheroembryos fell immediately below the observed 60% fatigue percentage. This water velocity acted as a natural external stimulus and forced fish to swim actively against the water current to hold their position. The water flow behavior along the flume was evaluated by injecting a thin stream of a potassium permanganate solution at the port of entrance. This procedure revealed an overall consistent laminar flow along the arena (see Video S2, Supplementary information).

To evaluate the actual meaning of the behavioral findings in the BDE-47-maternally exposed eleutheroembryos, a positive control (CF) was included in these swimming tests. For this purpose, we relied on the 48 hph eleutheroembryos from the SC-R group that was previously incubated with CF (25 ng/ml) for 48 h with 24-h renewals. The chemical was selected in reference to the published data that used external artificial stimuli in static environments to stimulate fish swimming behavior (Levin et al., 2004; Macaulay et al., 2015; Khalil et al., 2013).

Groups of 30–40 fish were randomly selected from the BDE-47 and from the solvent (*n*-hexane) control-maternally exposed medaka eleutheroembryos. A comparable sample size of eleutheroembryos was considered for the positive (CF) control. Fish were placed individually in the arena and allowed to acclimate by remaining in a stable position. Thereafter the water flow was adjusted to the prescribed 3.2 cm/s and locomotor activity was monitored for 6 min. Videos were analyzed quantitatively with the Ethovision XT (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). The arena was divided into equal 5×2.5 mm gridlines, and resulted in a data matrix of 300 elements (Fig. 3). The average percentage of time spent by all the fish in each element (*i.e. presence*) was obtained for each treatment. Presence of fish along the arena was represented in the form of surface gradient maps (*i.e. heat maps*) using a contour-mapping program for the spatial data based on probabilistic models (Surfer, Version 2.0, Golden Software, Golden, Colorado, USA).

Considering the absolute velocities of fish in one direction and water in the opposite direction, the distances that fish swam in the arena were calculated from the information obtained by the tracking software, and were assumed to be *relative* distances.

2.6. Lipid quantification in fish tissues, embryos, eleutheroembryos and larvae

The lipid content in the individual breeding medaka males and females that remained in the *n*-hexane control and in the BDE-47 treatment groups was calculated at the end of the experimental period by the Bligh and Dyer's method as described by Iverson et al. (2001). Briefly, fish were homogenized in 3×3 ml MilliQ water (T25 digital Ultra-Turrax disperser, IKA, Staufen, Germany) and extracted with 2×3 ml *n*-hexane. Lipid content was determined gravimetrically after evaporating a measured aliquot of the combined *n*-hexane phase brought to dryness. The same procedure was used to quantify the lipid

content in the pools of the ≤ 5 dpf embryos (each pool contained 600 embryos), in the ≤ 48 hph eleutheroembryos (400 individuals/pool), and in the groups of the 10 dph larvae (50 larvae/pool). This large number of individuals could only be achieved from the stock colony. Therefore for these early stages, we were unable to calculate the lipid content in the *n*-hexane controls vs. the treated groups. Each determination was made in quadruplicate.

2.7. Comparative statistical analysis

For the fertility and reproduction studies, the continuous and proportional data were log- and arc-sin-transformed, respectively to normalize the distributions. Data were then analyzed for normality by the Kolmogorov-Smirnov D test and by Bartlett's test for homogeneity of variance. Since the data did not fit a normal distribution or their variances were heterogeneous, the Kruskal-Wallis median and the Jonckheere-Trepsa tests were applied for the continuous data, while the Mann-Whitney *U* test with Bonferroni correction was performed to identify any significant differences between treatments and the respective solvent (*n*-hexane) control ($P < 0.05$).

For the swimming tests, a numerical analysis of fish positioning in the different *areas* in the arena was done for each experimental treatment to statistically compare them. The criterion of division into areas was primarily based on considering the *shear force* between two layers moving at different speeds (*i.e.* moving water and the flume walls) and the proximity to the upstream and downstream screens. Accordingly, the water velocity in a flume slows down as it comes closer to walls and its laminarity is perturbed near screens. Based on such evidence, the arena was divided into 15 areas (Fig. 3), and each comprised a specific number of neighboring elements within the matrix. The fish *residence* times in these areas were then obtained by adding the presence time values for each element within each area, averaged to a percentage value in relation to the recoding time. Data (*i.e.* the residence values within areas and relative distances) were log-transformed and analyzed for normality and for homogeneity of variance. The Kruskal-Wallis test was applied in all cases, and the Mann-Whitney *U* test with Bonferroni correction was performed to identify any significant differences between treatments (BDE-47 and CF) and the *n*-hexane solvent control ($P < 0.05$). This *n*-hexane solvent control was selected as a reference after observing comparable endpoints values with the DMSO solvent control group included in the experiments with the CF exposures. All the statistical analyses were run with the Statistical Package for the Social Sciences Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Although the statistical analyses are essential for describing differences between treatments, the residence values ignore any spatial correlations among sampling points, which contain, and may reveal, important information once represented in the form of heat maps (Goovaerts, 1997). Hence both endpoints, *presence* in the form of heat maps and *residence* offer complementary information.

3. Results

3.1. BDE-47 quantification in test diet

The actual BDE-47 concentration in the fortified diet was $1,025.8 \pm 81.7$ ng/g (mean \pm SD), which was comparable to the nominal concentration. Hence the averaged recovery rates ranged from 92% to 108% of the respective 1000 ng of the BDE-47/g nominal concentration.

3.2. BDE-47 quantification in adult fish, embryos, eleutheroembryos and larvae

The BDE-47 concentrations in the whole body tissues that accumulated at the different time points during the 40-day BDE-47 exposure in the sexually mature medaka males and females are presented in

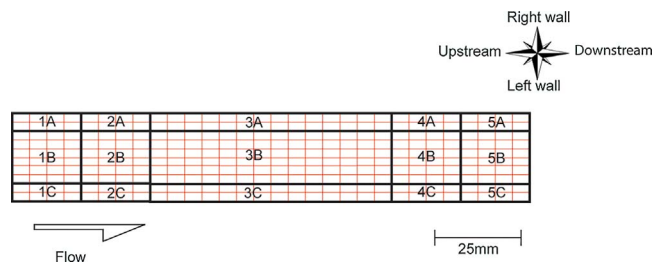


Fig. 3. The two-dimensional surface of the arena delimited in the flume for the swimming tests with the 48 hph eleutheroembryos. The thin gridlines show equal 25×5 mm elements that led to 300 elements. This divisional approach was used to generate the surface gradients of fish positioning. The thicker gridlines divide the arena into 15 proportional areas, named accordingly. The black arrow represents the water flow direction along the arena. The right and left sides are in relation with fish positioning swimming against the water flow.

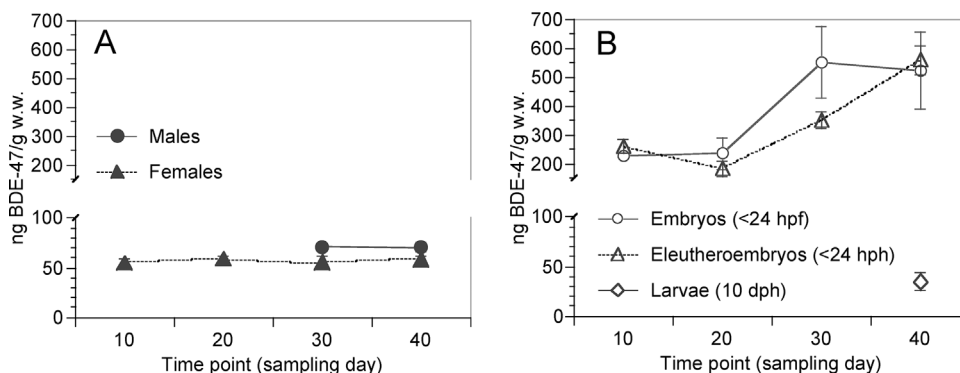


Fig. 4A. According to the sampling days, the BDE-47 levels in the whole body fish tissues of females remained constant and were comparable throughout the dosing period. They ranged from 54.63 ± 4.91 to 58.79 ± 3.76 ng of BDE-47/g w.w. (values expressed as mean \pm standard error mean) for time point 10 and 20, respectively. The BDE-47 that accumulated in male tissues was comparatively higher than that detected in the females, with levels of 71.28 ± 3.21 and 70.54 ± 4.82 ng of BDE-47/g w.w. at time point 30 and 40, respectively.

The BDE-47 concentrations among the < 24 hpf embryos from the eggs collected at the four time points and the corresponding levels remaining in the resultant < 24 hph eleutheroembryos, are presented in Fig. 4B. On the whole, the BDE-47 that accumulated in the < 24 hpf embryos increased with time and concentrations ranged from 228.45 ± 17.50 to 520.06 ± 133.74 ng of BDE-47/g at time point 10 and 40, respectively. A comparable tendency was seen after hatching, in such a way that the resultant < 24 hph eleutheroembryos contained mean BDE-47 concentrations of 260.57 ± 23.28 , 182.62 ± 26.83 , 350.68 ± 30.41 , and 558.13 ± 51.18 ng of BDE-47/g w.w. at time points 10, 20, 30 and 40, respectively.

The resultant 10 dph larvae from the eggs collected at the end of the experimental period (i.e. time point 40) revealed a sharp drop in the BDE-47 whole body content with levels of 34.77 ± 8.93 ng BDE-47/g w.w. (Fig. 4B).

3.3. Fertility and reproduction dynamics

Reproductive success, expressed as the total number of eggs collected from each female at each parental BDE-47 exposure time point, is presented in Fig. 5A. Statistically significant ($P < 0.05$) differences were seen only for the eggs collected at time point 10 with a significantly lower value for the control group (i.e. $22.50 [31.50-11.50]$ vs. $30.50 [42.88-17.88]$; values are expressed as the median with the 1.5 interquartile ranges [Q1-Q3] between brackets). However, no further differences were observed between the solvent control and the BDE-47 group on sampling days 20, 30 and 40 (Fig. 5A). The fertility percentages in both the control and the BDE-47-treated groups were comparable with median values $\geq 93\%$ (Fig. 5B). Similarly, hatching exceeded 95% in both groups from all the sampling time points (Fig. 5C). Among the resultant eleutheroembryos, neither hatching time nor swim bladder inflation was affected by parental BDE-47 dietary exposure (Fig. 5D and E).

3.4. Assessment of locomotor activity in eleutheroembryos

Two data matrices of the elements of the colored two-dimensional heat maps for the two groups of 48 hph eleutheroembryos from the eggs collected at time point 40 in each experimental group (i.e. from the SC-R group, and the 1000-R and 1000-A groups) came about from a geostatistics approach from the 6-min videos. Thus, the heat maps that corresponded to the solvent (*n*-hexane) control and the 1000 ng of the

Fig. 4. The dynamics of the BDE-47 levels measured in the medaka fish from a 40-day BDE-47 oral treatment. (A) The BDE-47 levels analyzed in males and females at different time points during the exposure period. Values represent the mean (\pm SEM) of four fish for each sampling time point ($n = 4$). (B) The BDE-47 translocated into embryos and eleutheroembryos from the eggs collected at the four time points during the exposure period. The graph also shows the BDE-47 that remained in the 10 dph larvae from the eggs collected on the last sampling day (i.e. time point 40). Values are the mean (\pm SEM) of three groups of embryos, each group collected from the three individual females per tank ($n = 12$).

BDE-47/g groups of the eleutheroembryos are shown in Fig. 6. A scale of gradients for presence time was selected, which ranged from 0.1% to 8.6% of the overall recording time. The fish fed with the solvent control diet revealed a positional pattern with swimming “acceptance” toward the upstream central region (Fig. 6, 0). The presence of percentage values in this zone ranged from 3.4% to 8.6%. The gradient map also revealed a tendency of the solvent control fish to swim near the downstream screen. However, values were $\leq 1.8\%$ of the overall recording time, which suggested the incapacity of fish to hold their position more upstream during the whole recording time. The central region of the arena showed the shortest presence times ($< 0.2\%$). A comparable pattern was seen in the gradient map from the 1000 ng of BDE-47/g maternally-treated eleutheroembryos (Fig. 6, 1000). The heat map for the CF-exposed eleutheroembryos showed a positional gradient along the arena where swimming was primarily located toward the downstream zones (presence time percentage values $\geq 1.8\%$; Fig. 6, CF). Presence time values were $\leq 1\%$ in the zones next to the upstream screen. Overall this map suggested the incapacity of the CF-eleutheroembryos to hold a stable position in the upstream zones, which indicated a differential swimming pattern compared with the map obtained from the solvent (*n*-hexane) control eleutheroembryos.

For the numerical comparisons between the swimming behaviors in the control and the BDE-47 and the CF-treated fish, 15 larger areas in the arena were arranged to obtain fish residence times (expressed as percentage values) for each area. Despite the wide variability in the data dispersion observed around the median residence values, the statistical comparison of the residence times in the corresponding areas between the solvent (*n*-hexane) control and the BDE-47-eleutheroembryos did not reveal significant differences (Fig. 7, 0 vs. 1000). These results, combined with the gradient maps, suggest the existence of comparable swim patterns. The statistical comparison between the corresponding areas in the solvent (*n*-hexane) control and the CF-exposed eleutheroembryos showed significant differences, more specifically in eight areas, and primarily upstream and secondly downstream ($P < 0.05$). These data support the visual differences in the corresponding heat map and suggest incapacity of the CF-eleutheroembryos to negotiate the 3.2 cm/s water velocity.

The relative distances travelled by the eleutheroembryos from the solvent (*n*-hexane) control and the 1000 ng of BDE-47/g groups are shown in Fig. 8. Both groups showed comparable values. The relative distances travelled by the CF-exposed eleutheroembryos were comparatively lower than those seen in the solvent control fish ($P < 0.05$).

3.5. Lipid quantification in fish tissues, embryos, eleutheroembryos and larvae

The lipid content in medaka fish, based on both gender and on different early developmental stages, is shown in Table 1. Despite the observation that there were no statistical differences between the solvent control and the BDE-47-treated fish, the results suggested that the presence of BDE-47 in diet tended to decrease the lipid content in males

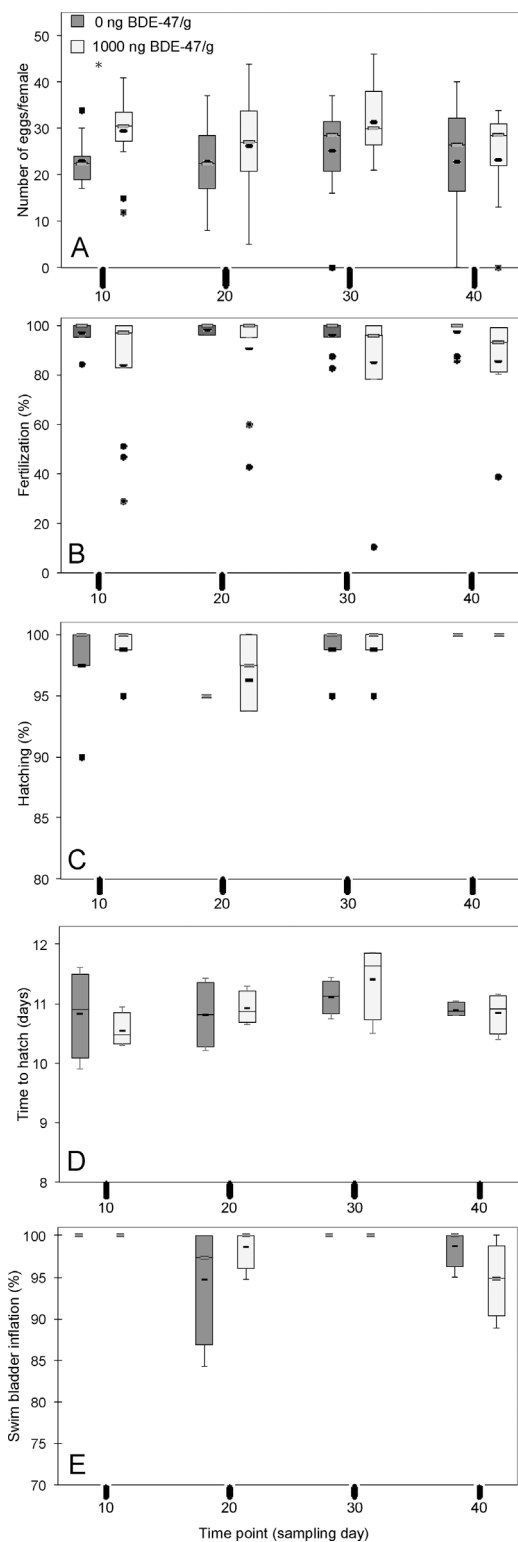


Fig. 5. Effects of a 40-day dietary BDE-47 parental exposure on medaka reproductive success and in offspring from the eggs collected at four time points during the exposure period: (A) number of eggs per female; (B) fertilization success; (C) hatching success; (D) days to hatch; and (E) eluetheroembryonic swim bladder inflation. Boxes represent the 25th and 75th percentiles of the probability distributions, and the whiskers on both sides indicate the lowest and highest data still within the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles, respectively. Any data not included between whiskers is plotted as an outlier with a dot. The thin lines crossing the boxes indicate the medians and the thick lines inside the boxes are the means. The 0 ng/g treatment corresponds to the fish fed with the solvent (*n*-hexane) control diet. Values are the response of four groups of 20 embryos, each group collected from three individual females per tank (12 females; $n = 80$ embryos). An asterisk (*) indicates significant differences between the treatment and the solvent control group for a specific time point ($P < 0.05$).

and females. By considering these measured lipid contents, the BDE-47 levels detected in whole body tissues could be lipid-normalized and compared to the corresponding ones in the literature for other fish species.

4. Discussion

In our previous research we concluded the absence of significant effects on the development and subsequent reproductive capacity of 40-day BDE-47 dietary exposures to 4–7 dph medaka followed by an 80-day depuration period (González-Doncel et al., 2016). Lack of effects could be explained by the efficient BDE-47 depuration rates observed after dosing had ended, so that very limited or no BDE-47 translocation into eggs would occur. In the present research we relied on reproductively mature medaka fish and used the same BDE-47 dietary exposure method. The BDE-47 levels detected herein during the female medaka reproductive period were comparatively lower than the concentrations we previously analyzed in the growing phases when the same BDE-47 concentration was fed (González-Doncel et al., 2016; *i.e.* 58.47 ng of BDE-47/g in adult females vs. 636 ng of BDE-47/g w.w. in the 44–47 dph individuals, respectively). These differences could be due primarily to the differences in the contaminated daily dosed food (*i.e.* 5% vs. 15% b.w.), and could also be due to additional variables, such as the effective BDE-47 maternal translocation into eggs and energy costs for reproduction. Yet, the BDE-47 levels detected in male fish were also considerably lower than those analyzed in the growing medaka (González-Doncel et al., 2016). Besides the differences observed in the daily feeding regimes between both experiments, the variables that involved lipid mobilization to support reproductive efforts and additional physiological and experimental variables, including specific lipid profiles related to fish age and differential stocking fish densities in exposure tanks, could contribute to the observed differences. The addition of non-contaminated *Artemia* as a dietary supplement in the present study may also play an important role given the differences seen in the BDE-47 accumulation levels between both experiments. While being beyond the scope of the present work, further research addressing these questions is encouraged in our laboratory.

In the present research, the BDE-47 egg:female concentration ratios ranged from 3.98 to 9.95 for the time points 20 and 30, respectively, which indicates a significant contaminant transfer to medaka eggs. Generally speaking, our results also revealed an overall increase in the BDE-47 maternal transfer to embryos with exposure time, BDE-47 persisted in the animals to the eluetheroembryo stage. Previous research works with fish have also demonstrated similar efficiencies in the maternal transfer of PBDEs. Nyholm et al. (2008) evidenced active translocation to zebrafish eggs of eleven BFRs after a 42-day zebrafish parental exposure *via* freeze-dried chironomid feed on a daily 2% b.w. basis. Calculations of the actual dosed amounts were not possible as information on the actual BFRs values present in the chironomid diet was not available. However, these authors calculated the egg:fish concentration ratios for all the BFRs to be between 0.26 and 7.3. Wen et al. (2015) determined zebrafish BDE-47 egg:liver ratios for 20-day exposures from 1.7 to 170 ng of BDE-47/g fish/day.

A literature search revealed that studies, which report information on BDE-47 bioaccumulation and its maternal transfer are scarce. In the few there are, the most common BDE-47 exposure approach has been its encapsulation in brine shrimp (*Artemia*). Muirhead et al. (2006) dosed BDE-47 encapsulated in *Artemia* to breeding pairs of fathead minnows (*Pimephales promelas*) over 25 days. By considering average weights of 2000 mg and 5000 mg for 126 dph female and male adult fathead minnows, respectively (Sohoni et al., 2001), and by assuming comparable feeding rates, this dietary approach indicated single daily doses of 2.9 μ g and 7.2 μ g of BDE-47/g fish/day, respectively. Instead, by assuming that males and females consumed differential feeding rates according to their body weights, the estimated daily doses would be 4.1 μ g of BDE-47/g fish/day for both sexes. Regardless of the

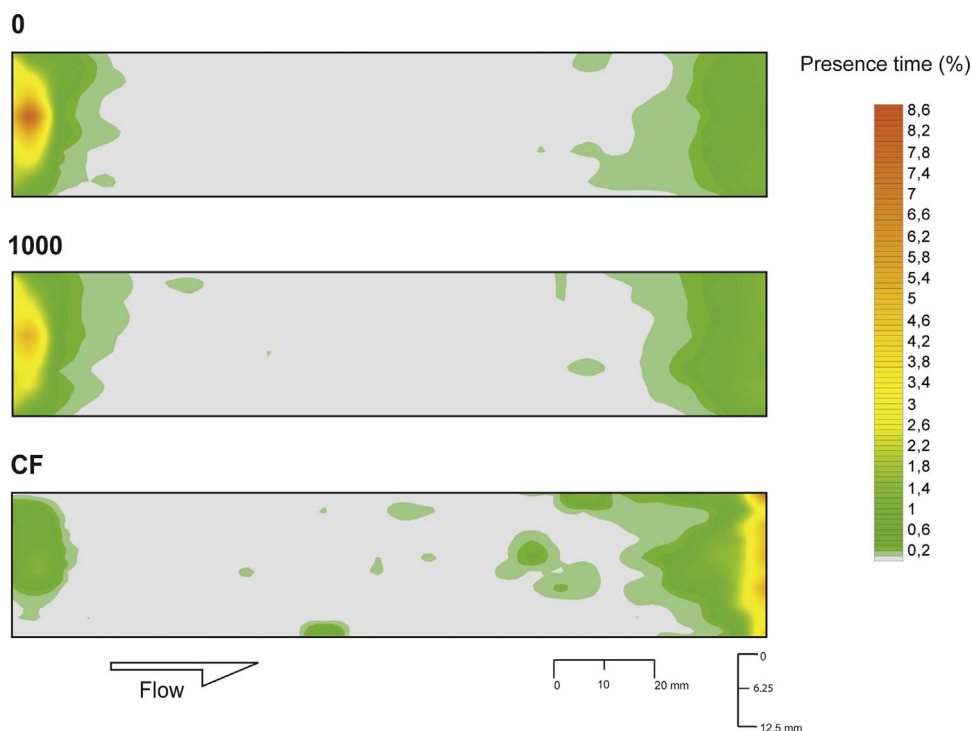


Fig. 6. The two-dimensional surface gradient maps for the 48 hph medaka eleutheroembryo positioning inside the arena as a result of a 40-day dietary BDE-47 parental exposure. The arena marked “0” corresponds to the solvent (*n*-hexane) control and the arena marked as “1000” denotes the BDE-47 exposure expressed in ng/g. The “CF” arena corresponds to the positive control, which consists in the 48 hph eleutheroembryos previously incubated with 25 ng of CF/ml for 48 h. Data represent the percentage of the presence time values of the total recording time of $n = 30$ –40 fish/treatment.

physiological needs related to gender-specific factors, the daily BDE-47 intake values fell within the $\mu\text{g/g}$ range in all cases. This dietary approach resulted in accumulation levels in females of up to $60 \mu\text{g}$ of BDE-47/g within 6 days of exposure, which was 4–6 times higher than in males. Using the same BDE-47 encapsulation method, van de Merwe et al. (2011) exposed 3-month-old marine medaka (*Oryzias melastigma*) breeding pairs to a daily dose of $1.2 \mu\text{g}$ of BDE-47/fish, but their study provided no fish weight information. When considering comparable *Artemia* daily feeding rates by either male or female marine medakas and their respective mean weights of 370 mg and 470 mg for the typical ≥ 5 –6 month-old golden medaka fish observed in our studies, the estimated BDE-47 intakes were $3.21 \mu\text{g}$ (male) and $2.55 \mu\text{g}$ (female) of BDE-47/g fish/day. These authors also reported effective BDE-47 off-loading from female fish into eggs with concentrations that reached the 25 ng/egg by day 18. Since they did not report any marine medaka egg mean weight, we referred to our average golden medaka egg weight of 0.28 mg , obtained after a 6-h drying period at room temperature, to estimate an accumulation of $89.92 \mu\text{g}$ of BDE-47/g in a marine medaka egg as reported in the van de Merwe et al. (2011) studies.

In our research, the use of a blended diet with 1000 ng of BDE-47/g to orally expose breeding medaka fish involved single daily doses of 45.55 and 57.28 ng of BDE-47/g fish for females and males, respectively, by assuming that all fish consumed comparable amounts of the dispensed food. Wen et al. (2015) also relied on a spiked commercial fish food to investigate the maternal transfer and distribution of BDE-47 and its analogs in adult zebrafish (mean mass of 0.56 g) to a 1% b.w.-basis daily dose of 170 ng of BDE-47/g fish for 20 days. Their results suggested sex-related differences in BDE-47 accumulation, which is comparable to that observed in our study and the effective transfer from females to eggs. Under these conditions, the above authors did not observe effects on either reproduction or offspring. The use of *Artemia* as a vehicle for BDE-47 exposure resulted in actual daily doses with orders of magnitude above that considered in our work or in the work by Wen et al. (2015) using a blended diet as a vehicle for oral exposures. These differences will thus greatly increase when extending these single daily doses to several days, and considerably higher BDE-47 levels are expected to be detected in parental bodies of fish. Muirhead et al. (2006) for instance reported how breeding fathead

minnows accumulated BDE-47 over 80-fold more than the levels observed in our medaka assays. Likewise, Lema et al. (2008) found higher BDE-47 burdens with up to $20.07 \mu\text{g/g}$ or $107.60 \mu\text{g/g}$ of fish in female minnows exposed for 21 days to estimated daily doses of 0.34 (low dose) or 1.76 (high dose) μg BDE-47/g fish, respectively, and by assuming proportional feeding rates for male and female minnows b.w. These accumulation values were also orders of magnitude above those detected in our studies. Thus, the evidence for toxic effects reported by these authors in the reproductive phase may suggest severe disorders of the overall homeostasis of fish, which could affect normal physiological processes that remain unaltered in a lower or at a more environmentally realistic exposure scenario.

Based on the lipid content measured in the exposed males and females, and in embryos, eleutheroembryos and larvae, the corresponding lipid normalized peak BDE-47 concentrations during the 40-day dietary exposures would be the equivalent to 1.63 (time point 30), 1.69 (time point 20), 46 (time point 40), 107.16 (time point 40), and $1.84 \mu\text{g/g}$ of lipid weight (l.w.), respectively. These values were generally higher than, but within the same order of magnitude as, those documented from the environmental monitoring of PBDEs in wild fish species. Hale et al. (2001) found concentrations that ranged from $< 5 \times 10^{-3}$ to $47.9 \mu\text{g}$ of total PBDEs/g l.w. in fish collected from two watersheds in the state of Virginia (USA), and showed that BDE-47 contributed with 40–70% of the total amount (i.e. < 20 – $34 \mu\text{g}$ of BDE-47/g l.w.). Fish collected from different sites along the Penobscot River in central Maine (USA) revealed BDE-47 concentrations that averaged $> 3 \mu\text{g/g}$ l.w. (Hale et al., 2001). Another survey conducted in the San Francisco Bay (USA) found the highest PBDE levels in halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and striped bass (*Morone saxatilis*) with concentrations reaching 1.29 and $1.02 \mu\text{g}$ BDE-47/g l.w., respectively (Lunder and Sharp, 2003). In the marine environment, Law et al. (2003) reported BD-47 concentrations in fish collected along the Saint Lawrence Estuary (Canada), which ranged between 0.04 and $0.58 \mu\text{g/g}$ l.w. in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) and Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*), respectively. Based on these and additional published data from environmental samples, the accumulation and maternal transfer levels observed in our study should not be of significant environmental concern.

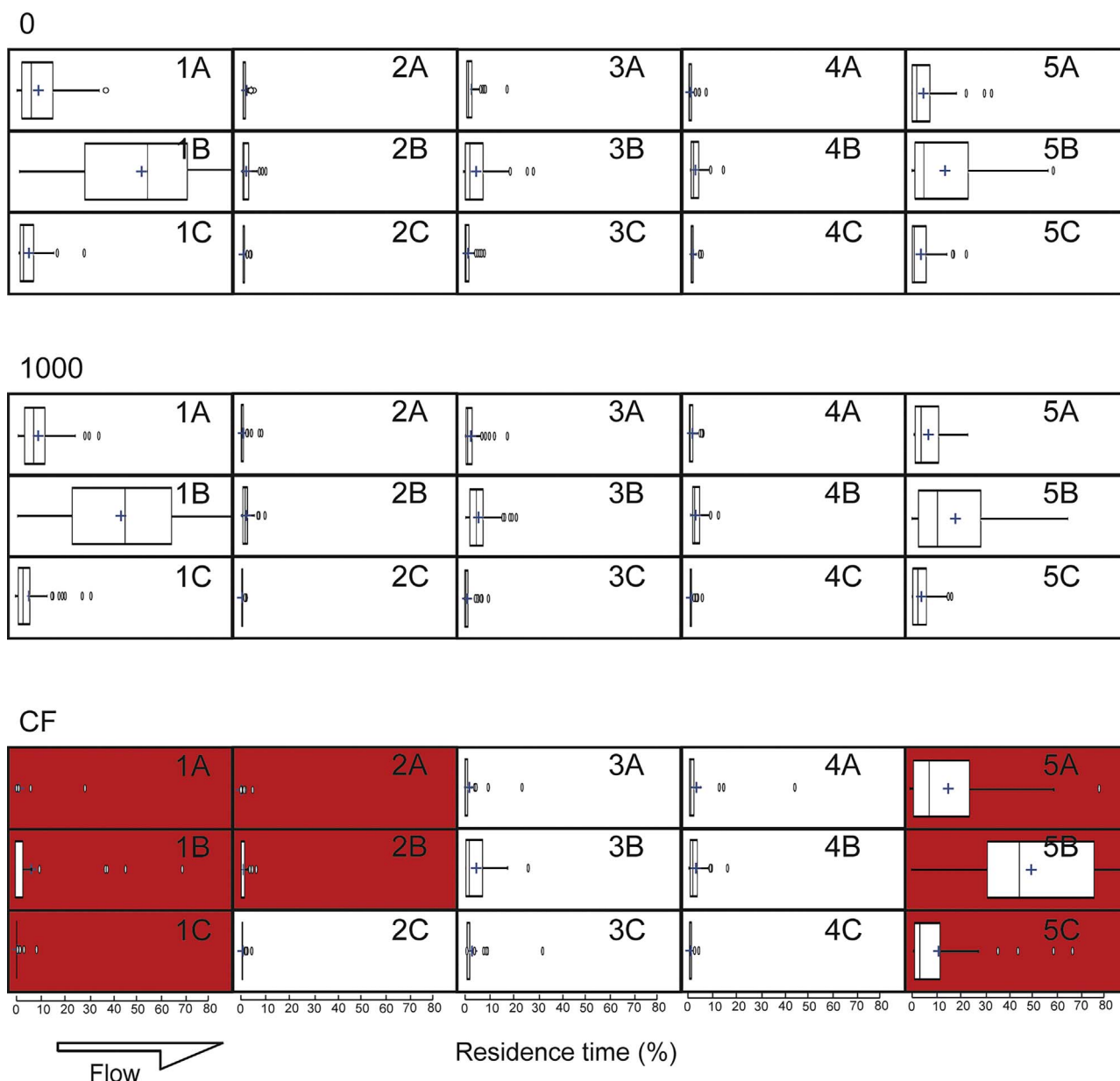


Fig. 7. The eluetheroembryo swimming residence times in the 15 areas of the arena as a result of a 40-day dietary BDE-47 parental exposure. For practical purposes, all the areas are represented as equal sizes (refer to Fig. 2 for actual sizes). The arena marked “0” corresponds to the solvent (*n*-hexane) control and the arena marked as “1000” to the BDE-47 exposure, expressed in ng/g. The “CF” arena corresponds to the positive control and consists in the 48 hph eluetheroembryos previously incubated with 25 ng of CF/ml for 48 h. The box-and-whisker plots for each area are inserted horizontally with the boxes that depict the probability distribution of the data through their (± 25th and 75th percentiles) quartiles. Whiskers indicate the 1.5 interquartile ranges of the lower and upper quartiles. Any data beyond these ranges are plotted as dots. The presence time values in each area for “1000”, and “CF” were compared with the presence time values in the respective “0” area. A red-solid area in “1000” or in “CF” denotes a significant difference from the respective “0” arena ($P < 0.05$). Data represent the percentage of residence for a 6-min recording time of $n = 30$ –40 fish/treatment.

As far as we know, this is the first approach to investigate the dynamics of BDE-47 uptake and maternal transfer with advanced studies on reproduction and offspring. Our research showed that while the BDE-47 translocation from females to eggs is effective, concentrations dropped considerably 10 days after hatching from levels that remained throughout embryo development up to the eluetheroembryo stage (< 24 hph). A comparable BDE-47 elimination tendency was observed in the growing medaka 10 days after the 40-day exposure period (González-Doncel et al., 2016). Altogether, the above observations demonstrate the efficiency of growing and post-eluetheroembryonic phases to metabolize BDE-47 once exposures end.

The BDE47 analyses run in males and females suggested a non-significant decrease in lipid content compared with the solvent control males and females. While being beyond the scope of this study, further

research is needed to elucidate the physiological reasons for these differences. Regardless of the presence of BDE-47 in diet, the analytical results also indicated a tendency for higher lipid content in males vs. females, which suggests that female medakas need more energy than males, presumably for active lipid mobilization for vitellogenin synthesis, the formation of the energy-rich oil globules present in eggs, and spawning activity (Craig et al., 2000).

Fish ELS include periods of life that can be particularly sensitive to the organic compounds present in the water column. While some studies have demonstrated the effectiveness of the BDE-47 maternal transfer, to date no information is available on the effects in offspring early development from fish maternal exposures to BDE-47. Eggs and eluetheroembryos revealed BDE-47 concentrations to be 4–10 times higher than those found in the exposed parents. However, our study

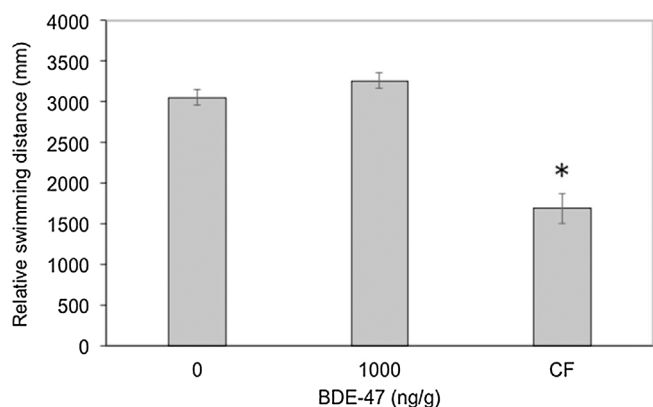


Fig. 8. The relative swimming distances traveled along arenas by the 48 hph eleutheroembryos. Values for 0, 1000, and CF correspond to the solvent (*n*-hexane) control, the BDE-47 exposure expressed in ng/g, and the positive control (25 ng CF/ml), respectively. An asterisk (*) indicates significant differences from the solvent control ($P < 0.05$). Values represent the mean (\pm S.E.M.) of $n = 30$ –40 fish/treatment.

Table 1
Medaka fish lipid content during different developmental periods^a.

Developmental period [ng BDE-47/g]	Number of individuals per sample	Lipid (%)
≈ 200 dph male [0 ^b]	1	6.47 \pm 1.48
≈ 200 dph female [0 ^b]	1	5.40 \pm 0.49
≈ 200 dph male [1000]	1	4.38 \pm 1.29
≈ 200 dph female [1000]	1	3.48 \pm 0.52
≤ 5 dpf embryos [0 ^c]	600	1.13 \pm 0.39
48 hph eleutheroembryos [0]	400	0.52 \pm 0.21
10 hph larvae [0]	50	1.89 \pm 0.37

^a Values are expressed as wet weight and represent the mean (\pm SD) of four replicated samples.

^b The individuals fed with the *n*-hexane control diet.

^c Values are expressed based on a 0.28 mg egg weight obtained after 6 h of drying at room temperature.

showed no significant effects on fecundity, fertility, or hatching. Except for the CF-positive control group, the data obtained for the BDE-47-eleutheroembryo swimming behavior were comparable with those from the solvent control group, which suggests lack of effects on swimming activity and capacity. Furthermore, the drop in the BDE-47 levels observed when medaka reached the larval stage (*i.e.* 10 dph) indicated active metabolism and the elimination of the parent substance. By assuming BDE-47's water stability, waterborne-based ecotoxicological data on BDE-47 for zebrafish ELS have reported severe developmental effects, including thyroid-related gene expression (15255 μ g of BDE-47/L; Chan and Chan, 2012), structural alterations in axonal growth (608–9700 μ g of BDE-47/L; Chen et al., 2013), and diminished swimming activity (500 μ g of BDE-47/L, Zhao et al., 2013; 20,000 μ g of BDE-47/L, Usenko et al., 2011). These observations contrast with the lack of molecular or pathological effects from comparable BDE-47 zebrafish ELS exposures (≤ 5000 μ g of BDE-47/L; Zheng et al., 2012). Yet these studies have not confirmed the waterborne stability of BDE-47 during exposures. BDE-47 is characterized by low water solubility (11 μ g/L) (EPI Suit, 2013). Indeed, in a previous research work we concluded the unfeasibility to maintain BDE-47 in solution under semi-static exposure conditions (González-Doncel et al., 2014). These observations were supported by the low toxicity of BDE-47 observed during and after the exposure period.

This study and our previous ones are the result of the environmental concern caused by PBDEs in general. However, overall results are not conclusive about whether the BDE-47 concentrations determined in natural aquatic environments, either dissolved or bound to suspended particulate matter, may result in a real risk to fish populations

(Anderson and MacRae, 2006; Peng et al., 2009). This “absence of evidence” has also been admitted after demonstrating the improbability of achieving in aquatic environments the BDE-47 experimental concentrations approached in the majority of published studies that report effects on fish (Lema et al., 2007; Usenko et al., 2011).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments and funding

The authors would like to thank C. del Río and I. Atiénzar for helping with fish maintenance, their critical advice for the experimental design, and in interpreting the results. The authors also appreciate Dr. O. Andreu (Valencia University) for his support with the contour-mapping program. This work has been jointly supported by Spanish Government Grants CTM2013-44986-R and CTM2014-52388-R. Fish were manipulated in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), and Directive 86/609/EEC on the protection of animals for experimental and other scientific purposes in the European Union.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.024>.

References

- Anderson, T.D., MacRae, J.D., 2006. Polybrominated diphenyl ethers in fish and wastewater samples from an area of the Penobscot River in Central Maine. *Chemosphere* 62, 1153–1160.
- Brett, J.R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 21, 1183–1226.
- Chan, W.K., Chan, K.M., 2012. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquat. Toxicol.* 108, 106–111.
- Chen, C.Y., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., 2013. Influence of water quality parameters on occurrence of polybrominated diphenyl ether in sediment and sediment to biota accumulation. *Chemosphere* 90, 2420–2427.
- Craig, S.R., MacKenzie, D.S., Jones, G., Gatlin, D.M., 2000. Seasonal changes in the reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 190, 89–102.
- Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* 29, 841–853.
- Estimation Program Interface (EPI), 2013. Suite. <http://epa.gov/oppt/exposure/pubs/-suite.htm> (Accessed 02 July 2013).
- González-Doncel, M., Fernández-Torija, C., Beltrán, E.M., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Carbonell, G., 2014. Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. *Aquat. Toxicol.* 148, 184–194.
- González-Doncel, M., Sastre, S., San Segundo, L., 2015. Dynamic system for the quantitative analysis of fish eleutheroembryos and larvae swimming behavior. European Patent P201530256.
- González-Doncel, M., Carbonell, G., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Beltrán, E.M., Torija, C.F., 2016. Effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 178, 141–152.
- Goovaerts, P., 1997. *Geostatistics for Natural Resources Evaluation*. Oxford University Press, USA.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Mainor, T.M., Duff, W.H., Gaylor, M.O., 2001. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Virginia freshwater fishes (USA). *Environ. Sci. Technol.* 35, 4585–4591.
- Iverson, S.J., Lang, S.L.C., Cooper, M.H., 2001. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36, 1283–1287.
- Khalil, F., Kang, I.J., Undap, S., Tasmin, R., Qiu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2013. Alterations in social behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal chlorpyrifos exposure. *Chemosphere* 92, 125–130.
- Law, R.J., Alae, M., Allchin, C.R., Boon, J.P., Lebeuf, M., Lepom, P., Stern, G.A., 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ. Int.* 29, 757–770.
- Lema, S.C., Schultz, I.R., Scholz, N.L., Incardona, J.P., Swanson, P., 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat. Toxicol.* 82, 296–307.
- Lema, S.C., Dickey, J.T., Schultz, I.R., Swanson, P., 2008. Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-

- regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environ. Health Perspect.* 116, 1694–1699.
- Levin, E.D., Swain, H.A., Donerly, S., Linney, E., 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 719–723.
- Lunder, S., Sharp, R., 2003. Tainted catch: toxic fire retardants are building up rapidly in San Francisco Bay fish- and people. *Environ. Work. Group* (Accessed 09 June 2016). http://static.ewg.org/reports/2003/TaintedCatch.pdf?_ga=1.222986203.1133464914.1465483987.
- Macaulay, L.J., Bailey, J.M., Levin, E.D., Stapleton, H.M., 2015. Persisting effects of a PBDE metabolite, 6-OH-BDE-47, on larval and juvenile zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 52, 119–126.
- Meng, X.Z., Yu, L., Guo, Y., Mai, B.X., Zeng, E.Y., 2008. Congener-specific distribution of polybrominated diphenyl ethers in fish of China: implication for input sources. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 67–72.
- Montie, E.W., Letcher, R.J., Reddy, C.M., Moore, M.J., Rubinstein, B., Hahn, M.E., 2010. Brominated flame retardants and organochlorine contaminants in winter flounder harp and hooded seals, and North Atlantic right whales from the Northwest Atlantic Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1160–1169.
- Muirhead, E.K., Skillman, A.D., Hook, S.E., Schultz, I.R., 2006. Oral exposure of BDE-47 in fish: toxicokinetics and reproductive effects in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 40, 523–528.
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2003. *Fundamentals of Toxicology*, second ed. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Nyholm, J.R., Norman, A., Norrgren, L., Haglund, P., Andersson, P.L., 2008. Maternal transfer of brominated flame retardants in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73, 203–208.
- Peng, X., Tang, C., Yu, Y., Tan, J., Huang, Q., Wu, J., Chen, S., Mai, B., 2009. Concentrations, transport, fate, and releases of polybrominated diphenyl ethers in sewage treatment plants in the Pearl River Delta, South China. *Environ. Int.* 35, 303–309.
- Rugh, R., 1962. *Experimental Embryology; Techniques and Procedures*, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN.
- Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., Sumpter, J.P., 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 35, 2917–2925.
- Stapleton, H.M., Letcher, R.J., Li, J., Baker, J.E., 2004. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1939–1946.
- Streit, B., 1998. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. EXS, vol. 86 Birkhäuser, Basel pp. 353–387.
- Tomy, G.T., Palace, V.P., Halldorson, T., Braekevelt, E., Danell, R., Wautier, K., Evans, B., Brinkworth, L., Fisk, A.T., 2004. Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Environ. Sci. Technol.* 38, 1496–1504.
- US EPA, 2008. Toxicological review of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/005F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Usenko, C.Y., Robinson, E.M., Usenko, S., Brooks, B.W., Bruce, E.D., 2011. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1865–1872.
- van de Merwe, J.P., Chan, A.K., Lei, E.N., Yau, M.S., Lam, M.H., Wu, R.S., 2011. Bioaccumulation and maternal transfer of PBDE 47 in the marine medaka (*Oryzias melastigma*) following dietary exposure. *Aquat. Toxicol.* 103, 199–204.
- Valters, K., Li, H., Alae, M., D'Sa, I., Marsh, G., Bergman, A., Letcher, R.J., 2005. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5612–5619.
- Wen, Q., Liu, H.L., Zhu, Y.T., Zheng, X.M., Su, G.Y., Zhang, X.W., Yu, H.X., Giesy, J.P., Lam, M.H., 2015. Maternal transfer, distribution, and metabolism of BDE-47 and its related hydroxylated, methoxylated analogs in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 120, 31–36.
- Zhao, J., Xu, T., Yin, D.Q., 2013. Locomotor activity changes on zebrafish larvae with different 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) embryonic exposure modes. *Chemosphere* 94, 53–61.
- Zheng, X., Zhu, Y., Liu, C., Liu, H., Giesy, J.P., Hecker, M., Lam, M.H., Yu, H., 2012. Accumulation and biotransformation of BDE-47 by zebrafish larvae and teratogenicity and expression of genes along the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12943–12951.

