

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE BRANQUIA, HÍGADO Y RIÑÓN DE PERCA CRIOLLA (*Percichthys trucha*, Valenciennes, 1833) PARA SU USO EN BIOMONITOREO AMBIENTAL

M. E. Palma Leotta*^a, M.N. Caliri^a, A.R. Cáceres^b.

^a Laboratorio de Genética, Ambiente y Reproducción (GENAR), Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina.

^b Laboratorio de Fisiopatología ovárica y Neurobiología. Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU-CONICET), Mendoza, Argentina.

*Corresponding author, E-mail: mae.leotta@gmail.com, phone: 0261 – 152074508. Fax: (54) 0261-4056200. Address: Av. Acceso Este, Lateral Sur, 2245, San José, Guaymallén, Mendoza, Argentina CP: 5519

Recibido: Octubre 2017. Aprobado: Diciembre 2017.

Publicado: Diciembre 2017.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar la descripción histológica de los principales órganos blanco de contaminantes ambientales en *Percichthys trucha*, pez nativo y ampliamente distribuido en ríos y lagos del sur de Argentina. Se capturaron sesenta especímenes adultos sanos de tamaño y peso similar, en Embalse El Nihuil, Mendoza, Argentina. Se describieron macroscópicamente las branquias, el hígado y el riñón y se fijaron en formalina neutra bufferada al 10% para su inclusión y tinción con hematoxilina eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Masson y azul de Alcian. Se utilizó un microscopio trinocular con cámara y software de imagen para la evaluación microscópica. Cada branquia se compone de cuatro arcos con dos filamentos. Cada filamento está constituido por un núcleo de cartilago y una mucosa con repliegues (lamelas) de epitelio plano simple con células caliciformes PAS y Azul Alcian positivo. La posición y la distancia entre las lamelas mantienen la simetría, al igual que el grosor del epitelio. El hígado está encapsulado con tejido pancreático interpuesto. Los lóbulos hepáticos no están bien delimitados, pero se identifican las áreas portales. Las trabéculas están formadas por dos placas de hepatocitos con una cara sinusoidal para absorción y otra biliar para excreción. Los hepatocitos contienen grandes cantidades de lípidos y reservas de glucógeno PAS positivas. El riñón tiene nefronas bien desarrolladas. Se describen los centros melano-macrófagos. Se tomaron medidas microscópicas. Estos resultados sirven de referencia para determinar biomarcadores histopatológicos de contaminación acuática, herramienta útil y económica para el monitoreo biológico.

Palabras claves: Biomarcadores, peces, patología, ecotoxicología, contaminación acuática.

HISTOLOGY AND HISTOCHEMISTRY OF THE GILLS, LIVER AND KIDNEY OF CREOLE PERCH (*Percichthys trucha*, Valenciennes, 1833) FOR ENVIRONMENTAL BIOMONITORING USE

ABSTRACT

The aim of this research was to perform the histological description of the main target organs of environmental contaminants in *Percichthys trucha*, a native and widely distributed fish in rivers and lakes of southern Argentina. Sixty healthy adult specimens of similar size and weight were captured in El Nihuil dam, Mendoza, Argentina. Gills, liver and kidneys were macroscopically described and fixed in 10% buffered neutral formalin for inclusion and staining with hematoxylin eosin, Schiff periodic acid (PAS), Masson trichrome and Alsian blue. For microscopic evaluation, a trinocular microscope with a camera and image software were used. It was determined that each gill is composed of four arches with two filaments. Each filament consists of a cartilaginous nucleus and a mucosa with folds (lamellae) of simple plane epithelium with PAS and Alsian Blue positive goblet cells. The position and distance between the lamellae is symmetric, as well as the thickness of the epithelium. The liver is encapsulated with interposed pancreatic tissue. The hepatic lobes are not well defined, but the portal areas are easily identified. The trabeculae consist of two hepatocyte plates with one sinusoidal side for absorption and one biliary side for excretion purposes. Hepatocytes contain large amounts of lipid and PAS positive glycogen reserves. The kidney has well developed nephrons. The melanocyte-macrophage centers are described.

Microscopic measurements were taken. These results help to determine alterations than can be of importance as histopathological biomarkers of aquatic contamination, constituting a useful tool for biological monitoring.

Keywords: Biomarkers, fish, pathology, ecotoxicology, aquatic pollution.

INTRODUCCIÓN

La determinación de la extensión y severidad de la contaminación acuática es a menudo dificultosa. Los análisis químicos pueden no ser suficientes para mostrar los complejos efectos que ocurren en sitios contaminados. En el caso particular de los ambientes acuáticos, el biomonitorio mediante el estudio de biomarcadores en especies nativas es una herramienta útil [1]. La integridad biótica de un sistema ecológico suele reflejarse en la salud de los organismos que allí residen. Los peces son considerados indicadores representativos de la salud general de sistemas acuáticos porque integran los efectos de muchos contaminantes que actúan en el ecosistema y reflejan los impactos secundarios del estrés crónico, debido a su posibilidad de biomagnificar y bioacumular [2].

Las branquias son los órganos respiratorios en los peces, encargados de realizar el intercambio gaseoso. El conocimiento de su morfología y fisiología resulta de gran importancia ya que aportan nociones valiosas para determinar lesiones y enfermedades causadas por diversos agentes contaminantes. Estos órganos junto con los riñones, el hígado y la piel, son considerados como órganos primarios u órganos blancos, útiles para evaluar el efecto de la polución [3] y, por lo tanto, son importantes para ser utilizados como biomarcadores histopatológicos [4]. Los daños morfológicos de los filamentos que forman parte de la estructura de las branquias son considerados como un indicador de importancia ecológica, usados frecuentemente frente a eventos de exposición a metales, sólidos suspendidos y otras sustancias tóxicas que interfieren con la alimentación, crecimiento y desarrollo del individuo [5, 6].

El hígado en los peces realiza funciones tanto hepáticas como pancreáticas; es el órgano metabolizador por excelencia de todas las sustancias que llegan por vía sanguínea, por lo cual, este órgano sirve como referente histológico para el análisis del daño tisular causado por sustancias contaminantes del medio ambiente como plaguicidas, metales pesados y otros [7].

El riñón de los peces también puede mostrar alteraciones en forma aguda y crónica ante contaminantes acuáticos. La hipertrofia de las células intersticiales muestra la exposición crónica a factores estresantes y sirve como indicador de calidad del agua [8].

El uso de biomarcadores histopatológicos en peces para vigilar la polución en ecosistemas es reconocido para metales pesados [9], hidrocarburos [10] y plaguicidas [11]. Muestran el efecto de cambios bioquímicos, moleculares y celulares en el organismo como resultado de la exposición a contaminantes y son indicadores en el presente de efectos biológicos que se manifiestan en el futuro. Pueden formar parte de programas de riesgo e impacto ambiental, de bajo costo y son suficientes para tomar decisiones en conservación [12].

Percichthys trucha (Percichthyidae) es un pez endémico, ampliamente distribuido en ríos y embalses del sur de la provincia de Mendoza y república argentina (desde el río Tunuyán 33°S como límite norte, hasta el río Santa Cruz 50°S límite sur) al este de la Cordillera de los Andes. A diferencia de otras especies silvestres, existe información disponible sobre características biológicas y genéticas de estos peces [13, 14 y 15].

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar los órganos blanco (branquias, hígado y riñón) de alteraciones que se producen por biomagnificación y bioacumulación de contaminantes ambientales con el fin de determinar las

estructuras arquitecturales normales para la especie y sentar las bases para la posterior determinación de biomarcadores histopatológicos para su uso en monitoreo ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de muestreo de peces está basada en la técnica propuesta por el Consejo Internacional de Exploración Marítima (ICES) [3, 16] y fue aceptada por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Investigación y Docencia (CICUALID) de la Universidad Juan Agustín Maza.

El lugar de muestreo fue el Embalse el Nihuil, Mendoza, Argentina, de 9600 has de superficie. Se calculó el “n” muestral sobre los datos de la población de percas en el embalse [17]. Se calaron redes agalleras de 4 por 4 cm de enmalle y 25 mt de longitud. Se midieron variables ambientales al momento del muestreo: temperatura ambiente y temperatura del agua (con termómetro de mercurio), pH del agua (con pHmetro Adwa AD12 y método colorimétrico McolorpHast TM) y oxígeno disuelto (con oxímetro Hanna HI9146). Una vez capturados los peces se eutanasiaron por punción medular [18], se midió su longitud (con cinta métrica) y peso (con balanza electrónica Acculab GS 2001). Se extrajeron escamas para el cálculo de edad mediante microscopía óptica [19]. Se efectuó la necropsia para la evaluación macroscópica de alteraciones, determinación de sexo y toma de muestra para estudios histológicos de branquias, hígado y riñón. Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio en formalina neutra bufferada al 10 % para su inclusión en parafina mediante las técnicas histológicas propuestas por ICES [16]. Se utilizó un micrótopo de deslizamiento Reichert para lograr cortes de 4- 5 μm de grosor y se realizaron las siguientes tinciones: hematoxilina eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Masson y azul de Alcian [20]. Para la evaluación microscópica y el procesamiento digital de imágenes se utilizó un microscopio trinocular Nikon

Eclipse E200 con cámara 391CU. 3.2M CCD y software de imagen Micrometrics S. E. Premium y PhotoScape v3.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sesenta ejemplares adultos sanos de *Percichthys trucha*, fueron colectados en el Embalse El Nihuil, Mendoza, Argentina (35°04'S, 68°45'O; 1325 msnm), en época primaveral. En el momento del muestreo se registró una temperatura ambiente de 12°C y una temperatura acuática de 13°C. El valor de pH del agua fue 8,8 y el del oxígeno disuelto 89,2%. Los peces muestreados presentaban una edad de 3 años (56%) y 4 años (29%). Se determinó macroscópicamente el sexo en 43 individuos: 30 hembras (51,7%) y 13 machos (22,4%). El valor promedio de todos los ejemplares pesados fue de 444,96 \pm 216,37 g. La media de la longitud total fue de 35,13 \pm 8,21 cm.

Descripción anatómica, histológica e histoquímica de los órganos estudiados.

Branquias:

La branquia de *P. trucha* está conformada morfológicamente por cuatro arcos branquiales en total a cada lado de la cabeza. Se observan de coloración rojo brillante. De cada arco branquial se originan dos hileras de filamentos (Fig. 1 y 2). El arco branquial es de matriz ósea y presenta un canal central por donde discurren los vasos sanguíneos de mayor calibre, como la arteria aferente y arteria eferente del arco. Por fuera del hueso se adosa una lámina de cartílago hialino que se evagina hacia los filamentos conformando la base de los mismos y donde se encuentra una capa de tejido muscular estriado esquelético, que permite que los filamentos tengan movimiento (Fig. 3). Los filamentos quedan conformados entonces por un núcleo de cartílago hialino sobre el cuál se adosa una mucosa compuesta por una lámina propia de tejido conectivo laxo y por donde discurren los vasos sanguíneos y un epitelio de revestimiento de tipo plano simple con células caliciformes (Fig. 4 y 5). En las zonas periféricas de estos vasos intrafilamentosos se observaron células que

fagocitaron partículas pigmentadas, y fueron identificados como macrófagos. En las Figs. 6 y 7 se observan en la periferia del vaso sanguíneo intrafilamentoso, de color oscuro.

El epitelio que reviste el filamento conforma evaginaciones digitiformes llamadas lamelas que sirven como especializaciones para aumentar la superficie de intercambio con el medio acuático (Fig. 3). En el centro de cada lamela se observa un capilar sanguíneo derivado del vaso intrafilamentoso que discurre hacia la punta de la lamela (Fig. 6). El epitelio lamelar está conformado en su mayoría por células epiteliales planas que se encargan del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre los eritrocitos intralamelares y el medio acuático.

También se observan células caliciformes secretoras de mucina, de tinción positiva con PAS y azul de Alcian. Se contabilizaron de 7 a 11 células caliciformes por lamela (Figs. 4, 5, 6 y 7).

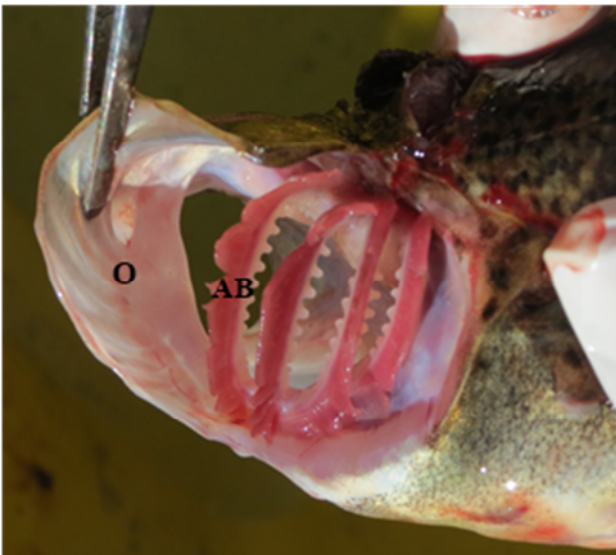


Fig 1. Aspecto macroscópico de las branquias de *P. Trucha*. (AB) Arcos Branquiales. (O) Opérculo.

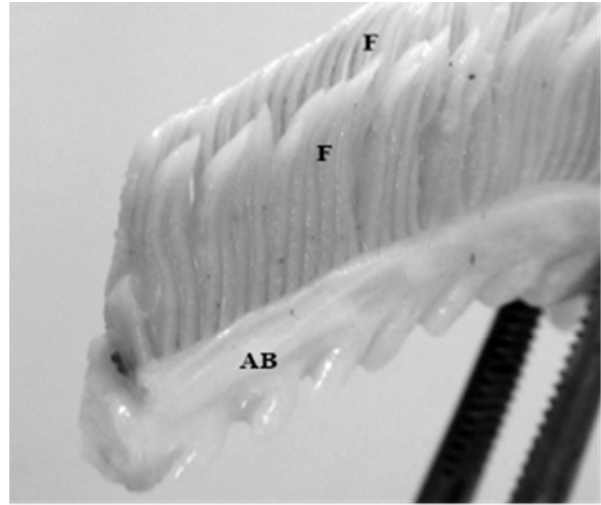


Fig. 2. Aspecto macroscópico de un arco branquial de *P. Trucha* con sus filamentos. (AB) Arco Branquial. (F) Filamentos.

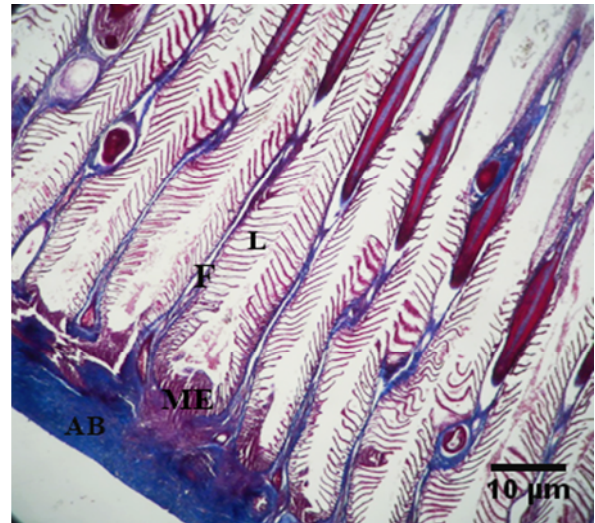


Fig. 3. Branquia de *P. trucha*. Tricrómico de Masson 40X. (AB) Arco Branquial. (F) Filamento. (L) Lamelas. (ME) Músculo Estriado.

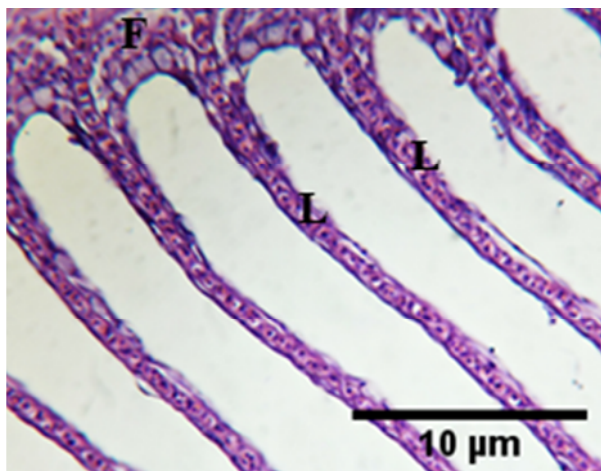


Fig. 4. Branquia *P. trucha*. Hematoxilina Eosina 100X.
(F) Filamento. (L) Lamela.

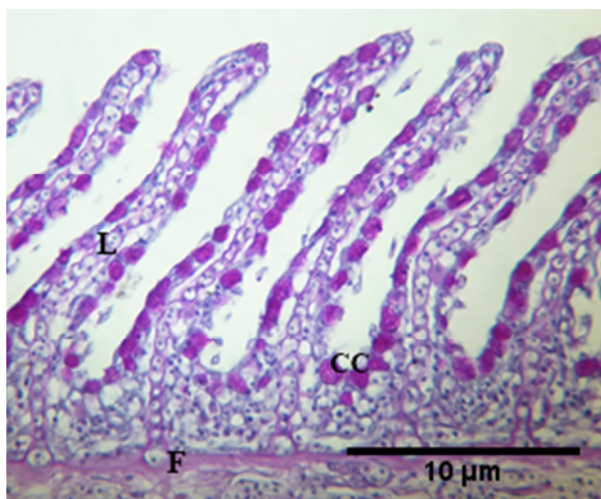


Fig. 5. Branquia *P. trucha*. PAS 100X.
(F) Filamento. (L) Lamela. (CC) Células Caliciformes.

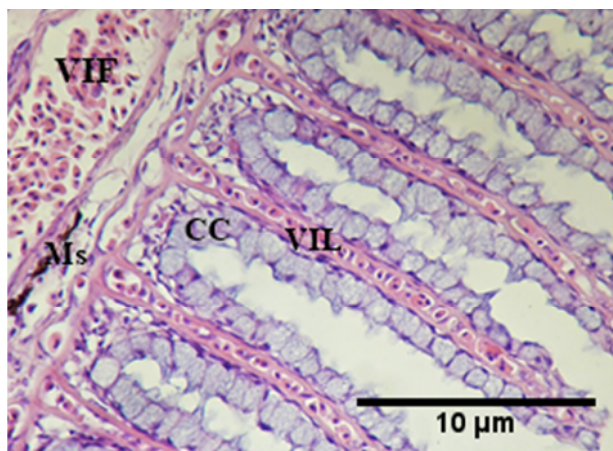


Fig. 6. Branquia *P. trucha*. Hematoxilina Eosina 100X.
(VIF) Vaso Intrafilamentoso. (VIL) Vaso Intralamelar.
(CC) Células Caliciformes. (Ms) Macrófagos.

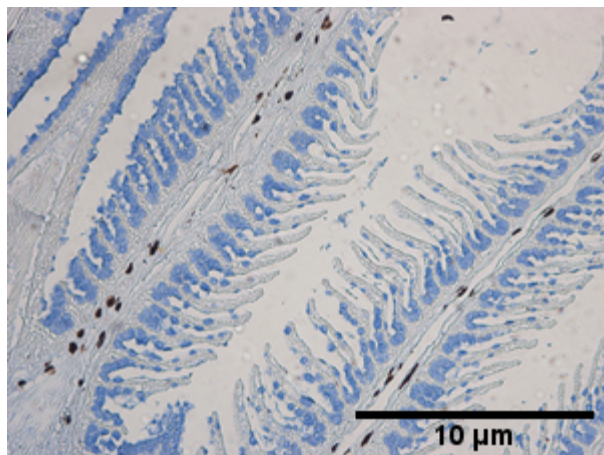


Fig. 7. Branquia *P. trucha*. Azul de Alcian 100X.

La Tabla 1 contiene las medidas obtenidas de filamentos y lamelas de *P. trucha* en micras (μm). Se aprecia que la posición y la distancia entre lamela y lamela en el filamento mantienen una simetría, al igual que el espesor de los epitelios.

Tabla 1. Medidas de estructuras de las Branquias de *P. trucha*.

VARIABLE	N	MEDIA (μm)	DE	MIN (μm)	MAX (μm)
Grosor de la lamela	24	2,13	0,92	0,89	4,34
Longitud de la lamela	24	26,17	9,20	13,53	54,94
Grosor del filamento	24	22,08	6,01	13,74	35,46
Diámetro de la célula caliciforme	50	1,47	0,33	0,85	2,33

Hígado:

El hígado de *P. trucha* ocupa la zona anterior y media del hemiabdomen derecho de la cavidad abdominal. Se observa un solo lóbulo de forma triangular alargada de base craneal y vértice caudal (Fig. 8). El mismo se encuentra relacionado con el intestino a lo largo de la cavidad. Presenta un color heterogéneo rosa pálido amarillento. El estroma, tejido conectivo de sostén, está constituido por la cápsula que reviste el órgano, tabiques divisorios y una malla de tejido conectivo reticular que sostiene las células funcionales. Al igual que en otros peces

se observa tejido pancreático interpuesto en el parénquima hepático, ambos separados por finos tabiques de tejido conectivo (Fig. 9). El tejido hepático corresponde a una glándula mixta, conformado por células funcionales; los hepatocitos (función endócrina) y el sistema biliar (función exocrina). Este último está constituido por canalículos que confluyen en conductillos y conductos de mayor calibre que llevan la bilis hacia el intestino. El parénquima del hígado se origina de estructuras tubulares altamente anastomosadas [21]. Al microscopio óptico, el lobulillo hepático, que es la unidad estructural y funcional de hígado, no se encuentra bien delimitado por la casi ausencia de tejido conectivo interlobulillar y la disposición de las clásicas venas centrolobulillares que, en este caso, se observan dispuestas al azar en el parénquima (Fig. 10). Las áreas portales son aisladas, conformadas por una rama de la arteria hepática (de luz pequeña, redonda y pared levemente más gruesa que la vena), una rama de la vena porta (de luz más grande y deformada) y el conductillo biliar de epitelio cúbico simple (Fig. 11).

Las trabéculas de hepatocitos son irregulares y dobles: se observan dos placas celulares separadas por sinusoides. Cada placa muestra hepatocitos polarizados con dos caras, una cara sinusoidal para absorción y una cara biliar para la excreción (Fig. 12).

Los hepatocitos de *P. trucha* son células poliédricas grandes, de citoplasma claro y pobre en organelas. Los núcleos son esféricos y basales, con un nucléolo central y una membrana nuclear bien marcada. En la Tabla 2 se exponen medidas en μm de hepatocitos de *P. trucha*.

En los espacios de Disse (ubicados entre los hepatocitos y el sinusoides) pueden observarse macrófagos (células de Kupffer) de mayor tamaño, y sus citoplasmas pueden contener pigmentos pardo rojizos u oscuros. Estos, cuando se observan en grupo, corresponden a los centros melanomacrófagos [22].

El componente pancreático está compuesto por acinos de células piramidales con núcleos grandes y redondos en la base de tinción basófila, y gránulos acidófilos hacia el ápice, correspondientes a enzimas digestivas que llegan por conductos al lumen intestinal. Los lobulillos pancreáticos se encuentran separados por finas trabéculas de tejido conectivo que presentan adipocitos interpuestos.

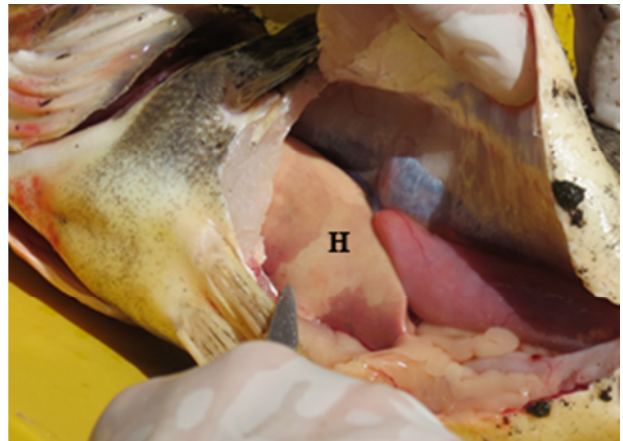


Fig. 8. Hígado de *P. trucha*. (H) Hígado.

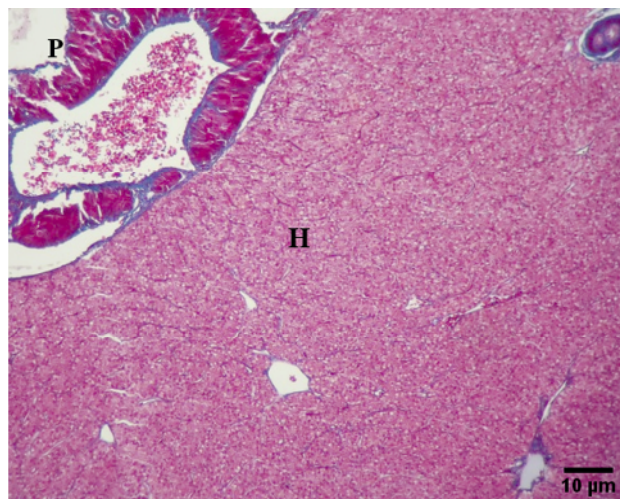


Fig. 9. Hígado de *P. trucha*. Tricrómico de Masson 40X. (H) Tejido Hepático. (P) Tejido Pancreático.

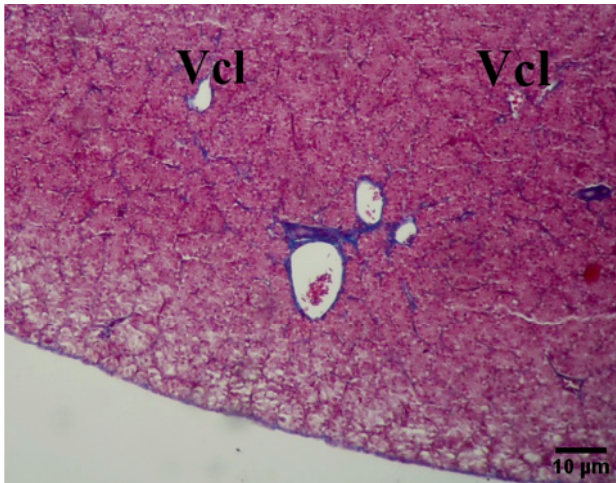


Fig. 10. Hígado de *P.trucha*. Tricrómico de Masson 40X. (Vcl) Venas centrolobulillares.

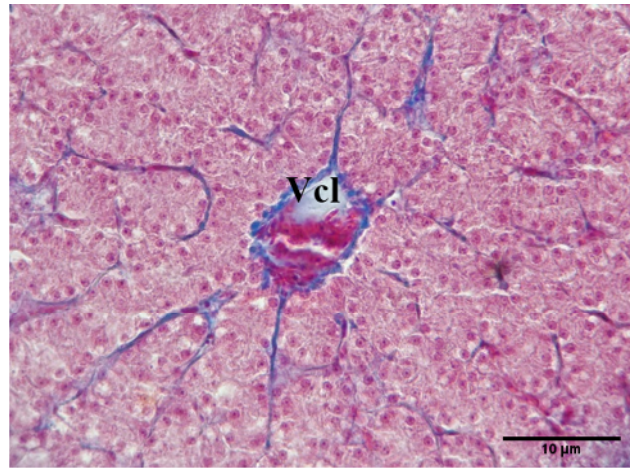


Fig 12. Hígado de *P. trucha*. Tricrómico de Masson 100X. (Vcl) Vena centrolobulillar.

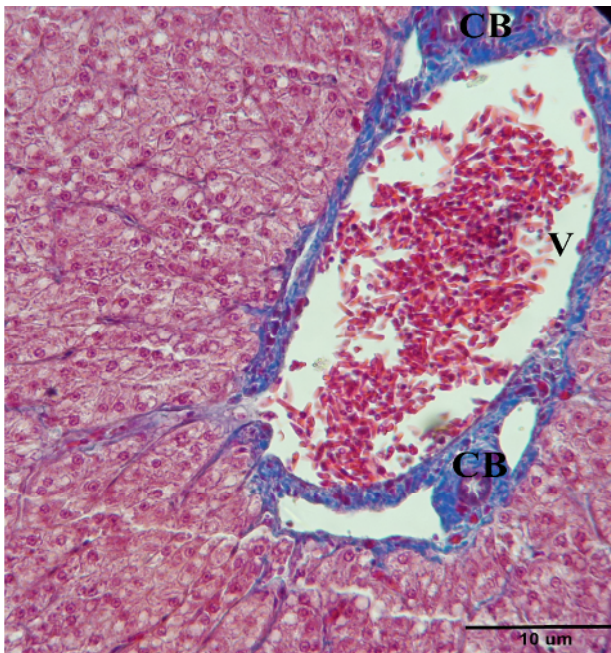


Fig 11. Hígado de *P. trucha*. Tricrómico de Masson 100X. (CB) Conductillo Biliar. (V) Vena rama de la V. Porta.

Tabla 2. Medidas de estructuras del Hígado de *P. trucha*.

VARIABLE	N	MEDIA (μm)	DE	MIN (μm)	MAX (μm)
Diámetro del hepatocito	36	4,48	0,83	3,02	6,61
Alto del citoplasma	36	10,96	2,96	6,43	18,80
Ancho del citoplasma	36	8,86	2,51	4,30	15,88
Área citoplasmática	36	99,21	43,58	33,20	226,73

Riñón:

El riñón de *P. trucha* se encuentra localizado en una posición retroperitoneal contra la parte ventral de la columna vertebral, a lo largo de la cavidad abdominal y está firmemente adosado al tejido esquelético y muscular. Presenta una forma aplanada y una coloración marrón oscuro, sin diferenciación macroscópica de las porciones craneales y caudales.

El riñón, en forma similar a lo observado en otras especies de peces, está compuesto por dos partes histológicamente diferentes: el riñón anterior, conformado totalmente por tejido hemopoyético, el cual va disminuyendo gradualmente hacia el riñón posterior constituido principalmente por las nefronas, tejido funcional renal propiamente dicho [23]. En los espacios intersticiales del riñón posterior pueden encontrarse restos de tejido

hematopoyético y linfoide. No se identifica una diferencia entre corteza y médula renal como en los mamíferos.

La nefrona de *P. trucha* está compuesta por el corpúsculo renal y el túbulo renal. El corpúsculo renal está formado por un glomérulo y su cápsula. La arteriola aferente, luego de su entrada en la cápsula glomerular, se divide en varias asas capilares, las que constituyen el glomérulo; estos capilares se reúnen y salen de la cápsula como arteriola eferente. La cápsula glomerular externa (cápsula de Bowman) está compuesta por un epitelio plano simple y una delgada membrana basal. La cápsula glomerular interna, constituida por los podocitos, recubre los capilares glomerulares y está separada de éstos por una membrana basal bien notable con la reacción de PAS. Sobre el polo vascular del corpúsculo renal se puede observar que el segmento distal forma una condensación celular, que corresponde a la mácula densa. (Fig. 13).

Se observan acúmulos pigmentados marrón oscuro sueltos y contenidos dentro de células (melanomacrófagos) en los espacios intersticiales predominantemente en las zonas periféricas y asociados a vasos sanguíneos.

Todos los epitelios tubulares se observan de tipo simple (un solo estrato celular) pero de altura variable desde el cúbico bajo al cilíndrico alto. En estos últimos se aprecia la presencia de microvellosidades (ribete en cepillo) fuertemente eosinófilas y de reacción positiva con tinción PAS (Fig. 14). Estas células tubulares son más grandes y sus citoplasmas son fuertemente acidófilos, se corresponderían con los túbulos proximales de los mamíferos. Los túbulos distales son de epitelio cúbico o cilíndrico bajo, sin microvellosidades, con citoplasmas más claros y la luz tubular levemente más amplia. También se identifican los túbulos colectores de epitelio cilíndrico simple y luz tubular más amplia. (Figs. 13 y 14).

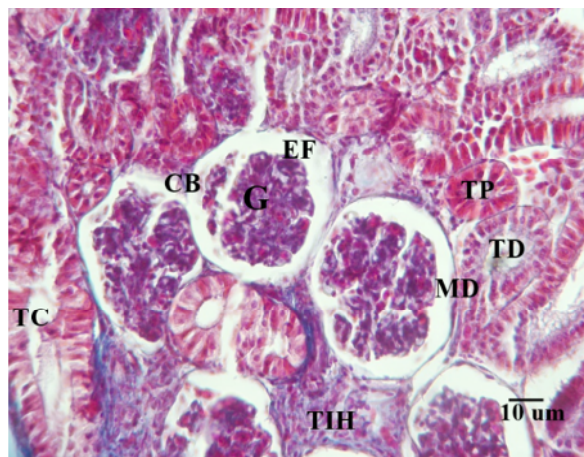


Fig 13. Riñón de *P. trucha*. Tricrómico de Masson 100X (G) Glomérulo. ((EF) Espacio de Filtración. (CP) Cápsula de Bowman. (TP) Túbulo Proximal. (TD) Túbulo Distal. (TC) Túbulo Colector. (MD) Mácula Densa.

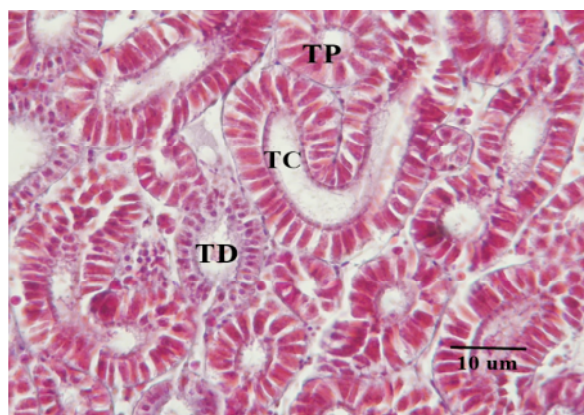


Fig 14. Riñón de *P. trucha*. PAS 100X. (TP) Túbulo Proximal. (TD) Túbulo Distal. (TC) Túbulo Colector.

En la Tabla 3 se observan las medidas de las estructuras del riñón de *P. trucha* expresadas en micras.

Tabla 3. Medidas de estructuras del riñón de *P. trucha*.

VARIABLE	N	MEDIA (µm)	DE	MIN (µm)	MAX (µm)
Ancho del glomérulo	60	84,53	19,42	44,70	192,14
Alto del glomérulo	60	77,69	21,27	44,94	131,47
Grosor de la cápsula de Bowman	60	2,60	0,51	1,46	3,69
Ancho del corpúsculo renal	60	108,78	24,27	64,90	168,55
Alto del corpúsculo renal	60	102,63	21,65	60,18	160,66

El área donde se realizó el muestreo, embalse “El Nihuil”, presenta factores abióticos (temperatura ambiental y acuática, oxígeno disuelto y pH del agua) considerados normales de acuerdo a otros trabajos realizados en la región [17].

Los datos biométricos de los ejemplares de *P. trucha* capturados determinan una muestra homogénea de individuos considerados sanos.

La branquia es el principal órgano blanco para contaminantes [24]; su tejido epitelial es un excelente parámetro para evaluar los efectos de variables ambientales, sustancias tóxicas y calidad del agua [25, 26]. Las estructuras histológicas de las branquias de *P. trucha* son similares a las descritas en otras especies de peces de agua dulce y salada [27, 28 y 29]. Los filamentos constituyen la estructura más distintiva de las branquias de los peces y han sido referidos como “lamelas primarias” [30]. De éstas estructuras se desprenden las lamelas propiamente dichas (también denominadas lamelas secundarias) como evaginaciones digitiformes de epitelio plano simple con células caliciformes, el tejido conectivo subepitelial y un capilar intralamelar. Fanta et. Al. (2003) [31] describe las branquias de *Corydoras paleatus* con lamelas primarias y secundarias con diferentes tipos epiteliales.

Los macrófagos que han fagocitado pigmentos descriptos en la zona periférica del vaso intrafilamentoso se han denominado también “células pilares” porque se ha identificado que regulan el flujo sanguíneo de los canales pilares y también fagocitan partículas extrañas, patógenos, especialmente bacterias, ya que producen lisozima y son células presentadoras de antígenos; constituyendo la primera línea de defensa de las branquias [32, 29].

Las células caliciformes cuantificadas por lamela, y medidas en su diámetro promedio, sientan las bases para poder determinar cambios patológicos de hiperplasia e hipertrofia celular producidos por cambios tóxicos del medio acuático. Según Ferguson (2006) [32], estas

células caliciformes son secretoras de mucina, la cual forma una película de protección mecánica para el epitelio, creando una interfase entre el ambiente acuoso y el tejido. Además, participan en la regulación iónica y protección inmunológica, actuando como barrera contra agentes patógenos y sustancias tóxicas.

La descripción histológica e histoquímica de las branquias de *P. trucha* muestra la complejidad de sus tejidos y entre ellos, el epitelial cuya estructura permite el intercambio óptimo de gases y de otras sustancias. La formación de los pliegues en la mucosa y la morfología de micropliegues, con su capa de glicocálix, son consideradas estructuras importantes en la retención de moco y son extremadamente sensibles al estrés, al grado de madurez celular y los cambios ambientales [25, 26]. Las medidas tomadas de las estructuras branquiales de *P. trucha* permiten sentar referencias para estudios morfométricos con procesamiento digital de imágenes [33]. Las alteraciones que se producen en la simetría lamelar perturban lo que se conoce como Distancia de Difusión Efectiva (DDE) de gases produciendo la disfunción del órgano [32]. Las lesiones tisulares observadas en las branquias de los peces constituyen una metodología reconocida, rápida y económica para determinar los daños [29]. El aneurisma, la fusión lamelar, la hiperplasia del epitelio, entre otras, son alteraciones conducentes a trastornos funcionales de las branquias y son utilizadas hoy en día como biomarcadores histopatológicos para estudios de evaluación ambiental [34, 35].

La descripción estructural del hígado de *P. trucha* se soporta en el modelo estándar del hígado de teleósteos según Bruslé & Anadón (1996) [21], macroscópicamente se ha descrito la presencia de tres lobulaciones hepáticas en muchas especies de teleósteos, en algunas dos (*Chondrichthyes* y *Dipnoi spp.*) y en otros una lobulación, coincidente con lo encontrado en *P. trucha*, también observado en *Oncorhynchus mykiss*, *Liza spp*, *Lutjanus bohar* y *Serranus cabrilla*. La coloración amarillenta del hígado ha sido descrita por Bac et. al., (1983) [36] en

otras especies de peces y se cree que está relacionada al depósito de lípidos por la alimentación. Rojas *et. al.*, (2013) [37], describen cambios heterogéneos en la coloración del hígado asociado a la exposición a diferentes temperaturas en *Colossoma macropomum*, que afectan el metabolismo hepático. En *P. trucha* se distinguen “áreas portales” que en la mayoría de los teleósteos son indistinguibles o están ausentes [21]. A diferencia de lo observado en el hígado de mamíferos [38] que poseen una placa celular de hepatocitos separada por sinusoides, en *P. trucha* se observan dos placas celulares separadas por sinusoides. Los hepatocitos de *P. trucha* son poligonales y presentan un núcleo basal y un citoplasma apical con algunos gránulos de glucógeno y gran cantidad de lípidos, similar a lo observado en *Hemisorubim platyrhynchos* [39] y *Sparus aurata* [40]. Son pobres en organelas comparados con los hepatocitos de mamíferos [38].

El componente pancreático asociado al parénquima hepático conforma el hepatopáncreas en *P. trucha* similar a lo reportado por Vicentini *et. al.* (2005) [41] en *Oreochromis niloticus*. Los centros melanomacrófagos en el hígado de *P. trucha* se observan cerca de los vasos sanguíneos al igual que lo descrito en *Leporinus macrocephalus* [42] y *Hoplias malabaricus* [43]. Coincidente con Agius (1981) [22], forman una agrupación nodular de macrófagos pero no se identifica una cápsula limitante. En *P. trucha* los macrófagos tienen un núcleo pequeño periférico y citoplasma espumoso con pigmento rojo parduzco posiblemente hemosiderina. Según Agius & Roberts (2003) [44], estos centros pueden contener melanina, hemosiderina y lipofucsina. Aunque los cambios en el tamaño y la densidad de los centros melanomacrófagos pueden ocurrir fisiológicamente o debido al envejecimiento, existen informes sobre los cambios según el estado de salud de los peces y la contaminación ambiental [44]. Estos desempeñan un papel importante en la respuesta de los organismos a los agentes foráneos y se utilizan comúnmente como

biomarcadores de la exposición a la contaminación en los peces [45, 46, 47]. Además es importante caracterizar las estructuras hepáticas para la determinación de lesiones que puedan servir como biomarcadores histopatológicos de contaminación en programas de monitoreo [16].

Los riñones son órganos pares aunque en *P. trucha* se observan fusionados bilateralmente al igual que en otros peces [48]. La porción craneal del riñón de *P. trucha* no puede diferenciarse macroscópicamente de la caudal como en los cipriniformes y los siluriformes [49]. Coincidente con lo expuesto por Plaul *et. al.* (2012) [23] *P. trucha* presenta una nefrona bien desarrollada con corpúsculos renales de gran tamaño y túbulos renales con varias divisiones, al igual que en lampreas y peces dulceacuícolas, adaptados para producir abundante orina. En estos animales, la principal función del riñón es excretar grandes cantidades de agua que entra al cuerpo a través de las branquias. La orina que producen es muy diluida y posee una concentración baja en electrolitos. Takashima & Hibiya (1995) [50] mencionan que los principales órganos que eliminan los residuos nitrogenados son las branquias. Existe a su vez una gran diferencia con los elasmobranquios y teleósteos marinos, según lo descrito por Bone & Moore (2008) [51], donde la nefrona se reduce, desapareciendo en estos últimos el túbulo distal e incluso también el corpúsculo renal, que cuando se halla presente, es de pequeño tamaño. El túbulo proximal carece de segmento del cuello e intermedio, en consecuencia, el filtrado se mueve mucho más lento debido a que no es sometido a la acción de las cilias del epitelio. De esta manera, el volumen de orina se reduce y la pérdida de agua es mínima.

Agius & Roberts (2003) [44] han descrito la presencia de centros melanomacrófagos en el riñón de teleósteos, constituidos por grupos de macrófagos pigmentados que se asocian principalmente con el sistema endocítico mononuclear de los órganos hemolinfopoyéticos (riñones y bazo). Estudios comparativos [52, 44] realizados en estos centros demuestran que varían en número, tamaño y

pigmentación en relación con la edad, estado de nutrición y salud y se caracterizan por la presencia de diversos pigmentos como lipofuscinas, melanina, hemosiderina y ceroides en diferente concentración.

CONCLUSIONES

La caracterización descriptiva de las estructuras anatómicas e histológicas de los órganos blanco de exposición aguda o crónica de contaminantes en *P. trucha* sirve de base en estudios comparativos que utilicen alteraciones histopatológicas como biomarcadores de contaminación de ambientes acuáticos donde esta especie habita.

Estas alteraciones incluyen la hiperplasia e hipertrofia de las células caliciformes, engrosamiento y fusión lamelar y el aumento de macrófagos en las branquias, cambios en el tamaño y densidad de los centros melanomacrófaos en hígado y riñón y la presencia de trastornos degenerativos y necróticos en los hepatocitos y en las células tubulares renales.

Incluso sin un vínculo entre estas alteraciones y los contaminantes específicos, esta vigilancia constituye una herramienta útil para el monitoreo biológico.

Sin embargo, para obtener una imagen más clara de las interacciones complejas entre la contaminación y los cambios histológicos, otros parámetros deben evaluarse conjuntamente; como la química del sedimento y del agua. Mientras más se avance en la utilización de múltiples biomarcadores que describan los síntomas que sugieren la relación causa – efecto para una especie, más efectiva será la evaluación ambiental o los programas de monitoreo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de Diego Grilli, Nora Gorla, Roberto Mera y Sierra y Martín Quero quienes aportaron en la corrección y lectura crítica del presente trabajo. Este estudio fue financiado por Ciencia y Técnica,

Universidad Juan Agustín Maza y el Ministerio de Salud de Gobierno, Mendoza, Argentina.

REFERENCIAS

- [1] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P. (2003). “Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review”. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- [2] Adams S. M., Brown A., Goede R. (1993) “A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. *T Am Fish Soc* 122:63–73.
- [3] Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Bukhardt-Holm, P. & Wahli, T. (1999). “Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution”. *J. Fish Dis.*, 22:25-34.
- [4] Giari, L.; Manera, M.; Simoni, E. & Dezfuli, B. (2007). “Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium”. *Chemosphere*, 67:1171-81, 2007.
- [5] Lyons, B. P.; Stentiford, G. D.; Bignell, J.; Goodsir, F. (2006). “A biological effects monitoring survey of Cardigan Bay using flatfish histopathology, cellular biomarkers and sediment bioassays: Findings of the Prince Madog Prize 2003”. *Environ. Res.*, 62:S342-6.
- [6] Viarengo, A.; Lowe, D.; Bolognesi, C.; Fabbri, E. & Koehler, A. (2007). “The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant- induced stress syndrome in sentinel organisms”. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 146:281-300, 2007.
- [7] Amaral, A. F.; Alvarado, N.; Marigomez, I.; Cunha, R.; Hylland, K. & Soto, M. (2002). “Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment”. *Biomarkers*, 7:491- 500.

- [8] Silva A; Martinez C. (2007). "Morphological changes in the kidneys of a fish living in a urban stream". *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 185-192.
- [9] Abdallah, A.T. (2000). "On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution". *Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview.* 287-296.
- [10]Oliva M, Vicente Martorell J. (2013). "Histopathological alterations in Senegal sole, *Solea Senegalensis*, from a polluted Huelva estuary (SW, Spain)". *Fish Physiol Biochem* 39:523–545.
- [11]Dos Santos A. P., Rocha T., Borges C., Bailão A. (2017). "A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*". *Chemosphere*, 168:933-943.
- [12]Freire M., Gómez Santos V. (2008). "Biomarcadores na avaliacao da saúde ambiental dos ecossistemas acuáticos". *Oecol. Brasil.*, 12 (3) 347:354.
- [13]Ruzzante D., Walde S., Cussac V. (2006). "Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism". *Mol. Ecol.* 15, 2949–2968.
- [14]Paterson I., Walde S., Cussac V. (2008). "Isolation and characterization of 13 microsatellite loci for *Percichthys trucha* (Percichthyidae)". *Mol. Ecol. Resour.* 8, 907-909.
- [15]Crichigno S., Battini M., Cussac V. (2014). "Diet induces phenotypic plasticity of *Percichthys trucha* (Valenciennes, 1833) (Perciformes, Percichthyidae) in Patagonia. *Zoologischer Anzeiger* 253, 192–202.
- [16]Feist, T. Lang, G.D. Stentiford (2004). "Biological effects of contaminants: Use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring". *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 38. 42 pp.
- [17]HINISA (Hidroeléctrica los Nihules) (2012). Informe de Monitoreo Ambiental Sistema Nihuil. 2012. Dirección de Recursos Naturales Renovables, Gobierno de Mendoza, expte N° 2108 H12.
- [18]Verján, N.; Iregui, C. A.; Rey, A. L. & Donado, P. (2001). "Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente". *AQUATIC: Revista Electrónica de Acuicultura. Tecnología e Investigación en Castellano*, 15:1-25.
- [19]Bagenal T. B., Tesh F. W. (1978). "Age and growth. En: Methods for assessment of fish production in fresh waters". *Blackwell Scientific Publication.* T Bagenal (ed): 365pp.
- [20]Samar ME, Avila RE, Esteban F. (2004) "Técnicas histológicas". *Córdoba: Editorial SeisC*; pp: 1-227.
- [21]Bruslé J; Anadon G. (1996). "The structure and function of fish liver". *Fish Morphology.* AA Balkema Publisher. Pp77-90
- [22]Agius C. (1981). Preliminary studies on the ontogeny of melano-macrophages of the dogfish *Scylorhinus canicula* (Linnaeus) after prolonged starvation. *Experientia* 39, 64–67.
- [23]Plaul S., Díaz A., Barbeito C. (2012) "Aspectos comparativos de la morfología del riñón de los peces". *Cs. Morfol.* Vol. 14, N° 1, pp. 5-13
- [24]Biagini, F. R.; de Oliveira, J. A., Fontanetti, C. (2009). "The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters". *Micron.*, 40:839-44.
- [25]Wong, K. C. & Wong, M. H. (2000) "Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, 48:517-27.
- [26]Mazon, A. F.; Cerqueira, C. C. C. & Fernandes, M. N. (2002) "Gill cellular changes induced by cooper

- exposure in the South American tropical fishwater fish *Prochilodus scrofa*". *Environ. Res.*, 88:52-63.
- [27] Wilson J., Laurent P. (2002). "Fish Gill Morphology: Inside out". *Journal of experimental Zoology* 293:192-213.
- [28] González S., Torres A., Cáceres P. (2009) "Descripción histológica de la branquia de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) presente en la Laguna De Sonso (Valle del Cauca)". *Acta Microscopica*, Vol. 18, Supp. C.
- [29] Torres, R.G., González, P.S., Peña, S.E. (2010) "Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*)". *Int. J. Morphol.*, 28(3):703-712.
- [30] Hughes M. G. (1984). "General Anatomy of the gills". *Fish Physiology* Vol 10, Part A pp 1 -72.
- [31] Fanta E., Sant F., Ríos A., Romao S. (2003). "Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 119–130.
- [32] Ferguson, H. (2006) *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*. 2nd Ed. London, Scotian Press.
- [33] Castrillón Fernández M., Torres Rodriguez G. (2008). "Análisis morfométrico de branquia de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) de la Laguna de Sonso (Valle del Cauca) mediante procesamiento digital de imágenes" *Revista AquaTIC*, nº 28, pp. 16-25.
- [34] Cengiz, E. (2006). "Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 22:200-4.
- [35] Souza D., Almeida Z., Carvalho Neta R. (2013). "Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil" *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.369-376
- [36] Bac N., Biagianti S., Bruslé J. (1983) "Etude cytologique ultrastructurale des anomalies hepatiques du loup, de la daurade et de l'anguille, enduites par une alimentation artificielle. *Actes de colloques IFREMER* 1:473-484.
- [37] Rojas L., Mata C., Oliveros A., Salazar-Lugo R. (2013). "Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas". *Rev. Biol. Trop.* Vol. 61 (2): 797-806.
- [38] Bacha W. J; Bacha L. M; Perriard D. (2001). "Atlas color de histología veterinaria". 2a ed. Ed Intermédica.
- [39] Faccioli C., Chedid R., Bombonato S., Vicentini I. (2014). "Morphology and Histochemistry of the Liver of Carnivorous Fish *Hemisorubim platyrhynchos*". *Int. J. Morphol.*, 32(2):715-720.
- [40] El-Bakary N., El-Gammal H. L. (2010) "Comparative Histological, Histochemical and Ultrastructural Studies on the Liver of Flathead Grey Mullet (*Mugil cephalus*) and Sea Bream (*Sparus aurata*)". *Global Vet.*, 4(6):548-53.
- [41] Vicentini C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Bombonato, M. T., Bertolucci, B. (2005). "Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*". *Int. J. Morphol.*, 23(3):211-216.
- [42] Bombonato, M. T., Rochel, S. S., Vicentini, C. A. & Franceschini-Vicentini, I. (2007) "Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*". *Acta Sci. Biol. Sci.*, 29(1):81-5.
- [43] Lemes, A. S. & Braccini, M. C. (2004) "Descrição e análise histológica das glândulas anexas do trato digestório de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), (Teleostei, Erythrinidae)". *Biodivers. Pampeana*, 2(1):33-41.

- [44] Agius, C.; Roberts, R.J. (2003). "Melanomacrophage centres in their role in fish pathology". *J. Fish Dis.* 26, 499-509.
- [45] Couillard C y Hodson P. (1996). "Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent?" *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15, No. 10, pp. 1844–1854.
- [46] Hartley, W. R.; Thiagarajah, A. & Treinies, A. M. (1996). "Liver lesions in the gar fish (Lepisosteidae) as biomarkers of exposure". *Mar. Environ. Res.*, 42(1-4):217-21.
- [47] Borucinska J., Kotran K., Shackett M., Barker T. (2009). "Melanomacrophages in three species of free-ranging sharks from the northwestern Atlantic, the blue shark *Prionace glauca* (L.), the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus* Rafinesque, and the thresher, *Alopias vulpinus* (Bonnaterre). *Journal of Fish Diseases*, 32, 883–891.
- [48] Ojeda J., Icardo J., Wong W., Ip Y. (2006). "Microanatomy and ultrastructure of the kidney of the African lungfish *Protopterus dolloi*". *Anat. Rec.* A; 288A: 609-625.
- [49] Díaz A. O., Goldemberg A. L. (2004) Capítulo 6. "Sistema excretor en peces". En: *Temas de Histología y Embriología Animal*. Parte 3. Analía Nessi y col. Ed. Inarbite (Buenos Aires). 2º edición. Pp. 85-92.
- [50] Takashima F, Hibiya T. (1995) "An atlas of fish histology. Normal and pathological features". Ed. *Kodansha Ltd.* (Tokyo, Japon). Pp. 116.
- [51] Bone Q, Moore RH. (2008) Chapter 6. "Osmoregulation and ion balance". En: *Biology of fishes*. 3er. Ed. Abingdon, UK. Taylor & Francis Group. Pp. 161-187.
- [52] Macchi GJ, Romano LA, Christiansen HE. (1992) "Melano macrophage centres in whitemouth croaker *Micropogonias furneri*, as biological indicators of environmental changes". *J Fish Biol*; 40: 971-973.