

# ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE PROLIFERACIÓN (PCNA) EN BRANQUIAS DE PROCHILODUS LINEATUS DE LAS CUENCAS DEL RÍO SALADO Y PARANÁ

Raquel Pastor; Omar Sbodio; Stella Maris Galván; Rojas, Lucas y Espíndola, Belkis\*. 2013. REDVET, 14(1).

\*Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R.P. Kreder 2805. 3080 Esperanza, Santa Fe. Argentina. 03496- 420639 [rpastor@fcv.unl.edu.ar](mailto:rpastor@fcv.unl.edu.ar)

Este trabajo de investigación, enmarcado en un proyecto de investigación denominado CAI+D 2009, programa N°: 33, proyecto N°: 168, titulado “Estudio comparativo macroscópico y microscópico del Prochilodus lineatus. Definición de bioindicadores”, financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

[Volver a: Piscicultura](#)

## RESUMEN

La utilización de organismos vivos como indicadores de impacto ambiental se ha desarrollado enormemente en los últimos años. Los peces viven en un medio con el que interactúan en forma constante y experimentan mecanismos de adaptación, producto de la contaminación del ambiente. Prochilodus lineatus (sábalo) es un pez propio de la cuenca del Río de la Plata, siendo un eslabón crucial en los ecosistemas que integra, dada su condición de especie forrajera, sostén de la cadena trófica.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el índice de proliferación celular en branquias de Prochilodus lineatus, mediante la utilización de una técnica inmunohistoquímica (PCNA), comparando las diferencias atribuibles a modificaciones en su medio ambiente y que puedan ser utilizados para evaluar el impacto de cambios ambientales producidos en los ecosistemas acuáticos de las cuencas del Paraná (departamento La Capital) y Salado (departamento Las Colonias).

Se observó inmuno expresión en el epitelio del filamento branquial, existiendo diferencias en la inmunoreactividad de las muestras obtenidas en el río Salado (51.11±/ 10.53%) con respecto a las obtenidas en el río Paraná (22.15±/ 4.88%) ( $p < 0.05$ ).

Basados en estos resultados, proponemos que estos patrones de expresión sean utilizados para identificar cambios (biomarcadores) en las branquias del Prochilodus lineatus, permitiendo el uso de esta especie como centinela frente a alteraciones en su medio.

Palabras claves: Prochilodus lineatus, Río Salado, Río Paraná, Biomarcadores.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de organismos vivos como indicadores de impacto ambiental se ha desarrollado enormemente en los últimos años (Giari, et al., 2007; Viarengo et al., 2007). Los peces viven en un medio con el que interactúan en forma constante; se alimentan, crecen y se reproducen en el mismo. Toda su estructura y fisiología ha evolucionado para el desarrollo en ese hábitat y están incluidos en un bucle trófico que los hace imprescindibles para el desarrollo armónico del ecosistema (Romano, 1999). Cuando se producen cambios en las condiciones del medio en el que habitan, experimentan una gran variedad de mecanismos de adaptación y numerosos autores los han utilizado como organismos indicadores (bioindicadores) del estado del estrés ambiental (Romano, 1999; Belmar, 2009).

Los bioindicadores son indicadores puntuales y selectos de estrés en todos los niveles de la organización biológica (Rendón, 2005; Lyons, et al., 2006), que permiten evaluar y predecir los efectos de las modificaciones ambientales antes que el daño sea irreversible. Estos autores definen a los bioindicadores como todo cambio inducido por un contaminante en un componente bioquímico o celular y que puede ser medido en un sistema biológico. Actualmente todos los planes de monitoreo de cuerpos de agua, incluyen a los peces como indicadores de contaminación ambiental.

Dentro de las investigaciones desarrolladas acerca de los efectos de sustancias tóxicas sobre peces, surgen las relacionadas con estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos. Si bien los mismos han abarcado diferentes órganos, de los análisis realizados aparecen enfatizados aquellos vinculados a las branquias, obviamente por su

importancia en la respiración (Monteiro et al., 2005; Segnini de Bravo et al., 2005; Camargo & Martínez, 2007; Rondón Barragán et al., 2007; Pastor et al., 2008; Troncoso, et al., 2008).

*Prochilodus lineatus* (sábalo), es un eslabón crucial en los ecosistemas que integra, dada su condición de especie forrajera, sostén de la cadena trófica. Se trata de un pez con hábitos estrictamente iliófagos, adaptado morfológicamente y funcionalmente para consumir el barro del sedimento y con ello microorganismos, transformando la materia orgánica en biomasa disponible para los niveles superiores de la red trófica acuática. Además, sirve de alimento para los consumidores secundarios como *Pseudoplatystoma carucans* (surubí) y *Salmino maxillosus* (dorado), por lo que tiene un importante rol en el ecosistema, constituyendo el 50% de la biomasa de los ecosistemas acuicola de la Cuenca del Plata de la República Argentina (Del Barco, 2000).

Se distribuye por toda la cuenca indicada precedentemente, que incluye a los ríos Paraguay, Bermejo, Paraná, Uruguay y Río de la Plata, así como otros cuerpos de agua adyacentes a esta cuenca como el río Salado, Laguna Setúbal, río San Javier, etc (Espinach Ros & Fuentes, 2000).

Es importante destacar que la falta de leyes y controles en la última década y el aumento de las exportaciones pusieron al sábalo en una situación extremadamente crítica, no sólo por una disminución poblacional, sino también por la pérdida del pool génico de la especie (Del Barco, 2000).

En la actualidad la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación, autorizó la exportación de 6.500 toneladas sábalo hasta el 31 de julio de 2010 distribuidos entre las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires. Esta determinación se sustentó en evaluaciones del recurso, que indicaron que el sábalo no se encuentra en estado crítico y por ello el estado actual de explotación la especie no presenta signos de sobrepesca. Sin embargo, debe aclararse que en la Provincia de Santa Fe desde el 1° de octubre hasta el 31 de enero de cada año, se prohíbe la captura de especies con fines comerciales (SAGyP, 2010)

Es por lo expresado y por la relevancia de esta especie y de sus particularidades biológicas y ecológicas que se desarrolló la presente investigación.

## OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el índice de proliferación celular en branquias de *Prochilodus lineatus*, mediante la utilización de una técnica inmunohistoquímica (PCNA), procurando encontrar diferencias atribuibles a modificaciones en su medio ambiente y que puedan ser utilizados para evaluar el impacto de cambios ambientales producidos en los ecosistemas acuáticos de las cuencas del Paraná (departamento La Capital) y Salado (departamento Las Colonias).

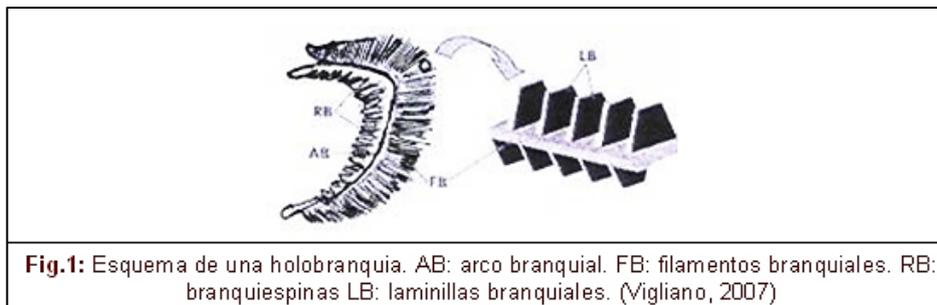
## METODOLOGÍA

El presente trabajo basado en la aplicación de un método exploratorio y descriptivo, consistió en la recolección de 20 muestras de peces, 10 de los cuales fueron capturados en la cuenca del río Salado en el departamento Las Colonias (Provincia de Santa Fe; 31° 23' 04.43"S; 60° 53' 37.32"O) con una altura de 1.4 metros. y los 10 restantes fueron obtenidos en el río Paraná 50 Km aguas arriba de la ciudad de Paraná (Provincia de Entre Ríos; 31° 23' 05.37"S; 60° 06' 17.33"O) teniendo 3.46 metros de altura, durante el invierno del 2010. Estos datos corresponden a mediciones efectuadas por la Prefectura Naval Santa Fe y por el Instituto Nacional del Agua (INA).

Las piezas recolectadas se enmarcaron dentro del Reglamento de Pesca dispuesto por la Subsecretaría de Medio Ambiente y Ecología de la Provincia de Santa Fe.

Los órganos seleccionados para el estudio fueron las branquias, por ser los órganos que comandan la respuesta sintomatológica a determinados contaminantes y por ser considerados órganos de choque al estar muy expuesto al ambiente que habitan (Belmar, 2009). Justifica además la elección del órgano la importancia funcional del mismo, ya que en las branquias se llevan a cabo procesos fisiológicos vitales tales como la regulación del equilibrio hidroeléctrico y ácido-base, que se produce principalmente en el epitelio de los filamentos de estos órganos y el intercambio de gases efectuado en sus laminillas (Olson, 2000b).

Con respecto a la estructura anatómica de las branquias, se describe el "aparato branquial", que está constituido por cuatro pares de holobranquias localizadas en el interior de las cavidades operculares derecha e izquierda. Cada una de ellas presenta dos hemibranquias formadas por un arco branquial a partir del cual se proyectan caudalmente numerosos filamentos branquiales. Desde las superficies dorsal y ventral de estas estructuras se extienden las laminillas branquiales. En la concavidad craneal de los arcos branquiales se encuentran las branquiespinas (Domitrovic, 1998; Olson, 2000a; Vigliano et al., 2006a).



Desde el punto de vista histológico las branquias presentan un estroma y un parénquima. El primero está prestado por las estructuras que sirven de sostén, mientras que el segundo está constituido por las células y tejidos que cumplen con la función específica del órgano (Vigliano et al., 2006<sup>a</sup>; Vigliano, 2007). La estructura de sostén (estroma) es osteocartilaginosa, estando este tejido más desarrollado en los arcos branquiales y branquiespinas que en los filamentos y siendo inexistente en las laminillas branquiales. Los filamentos branquiales componentes del parénquima, están revestidos por una mucosa, la cual está formada por un epitelio plano simple y una lámina propia de tejido conectivo laxo. El epitelio presenta otros tipos celulares, como células caliciformes secretoras de mucina, también las células ricas en mitocondrias u osmorreguladoras de cloro, que participan en el balance ácido base y procesos de aclimatación (Monteiro, et al., 2005; Segnini de Bravo et al., 2005; Pastor, et al., 2008; Biagini et al., 2009; Torres et al., 2010).

Siendo el motivo de nuestro estudio, la cuantificación de dichas células, se utilizó la técnica inmunohistoquímica denominada índice de proliferación celular (PCNA), la cual está representada por una proteína que se expresa en las células que están en división.

Con respecto a la elección de los lugares de la toma de muestra, se realizó teniendo en cuenta, que en la provincia de Santa Fe, el cauce del río Salado se utiliza como vía de desagüe, y sus aguas acusan graves índices de contaminación surgiendo problemas ecológicos periódicos con episodios de mortandad de peces (Sottini., 2002). Cabe aclarar que este río surca distintos departamentos de esta provincia, pero el problema más acuciante de contaminación con respecto a este curso de agua se da en el departamento Las Colonias, debido a la elevada cantidad de productos químicos utilizados por la industria del cuero, los cuales son volcados a su cauce (Andreotti & Gagneten, 2006).

En el caso del río Paraná, el tramo inferior del mismo, que coincide con el departamento La Capital, se caracteriza por su menor profundidad, mayor anchura y por la profusión de riachos e islas. Sobre este tramo del río la calidad del agua de Paraná Medio es aceptable para los diversos usos a los que se destina, pero no se cuenta con un pronóstico para el futuro.

La diferencia en cuanto a la calidad del agua en ambos ríos, motivó la necesidad de comparar los cambios que se producen en determinadas estructuras corporales de esta especie.

## ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras obtenidas se fijaron en formol bufferado al 10% durante 12 hs. a temperatura ambiente, lavándose seguidamente en buffer fosfato salino (PBS) y procesándose siguiendo protocolos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods y Ellis, 1994).

Por último, se efectuaron cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$  de espesor, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con VECTABOND (Vector Lab. Inc., USA). Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina y eosina.

## ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se utilizó inmunodetección de Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) para evaluar el índice de proliferación celular de las células que conforman los tejidos de las branquias; esta es una técnica inmunohistoquímica indirecta (Woods & Ellis, 1994), que utiliza como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal (clon PC-10; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) a través de un anticuerpo secundario biotilado y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Lab. Inc. USA). Se reveló su localización utilizando 3,3'-diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Vector Lab. Inc. USA) como cromógeno.

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), es una proteína de 36 kd, la cual está altamente conservada entre especies. El PCNA funciona como cofactor de la ADN polimerasa delta tanto en la fase S del ciclo celular como así también en la síntesis de ADN asociado con los mecanismos de reparación del daño del mismo.

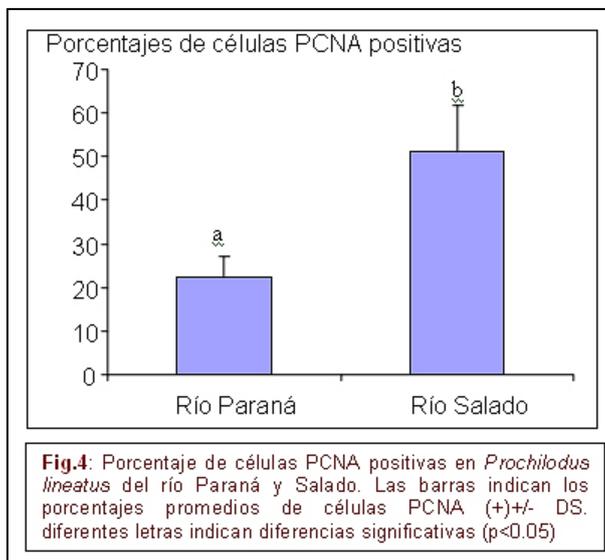
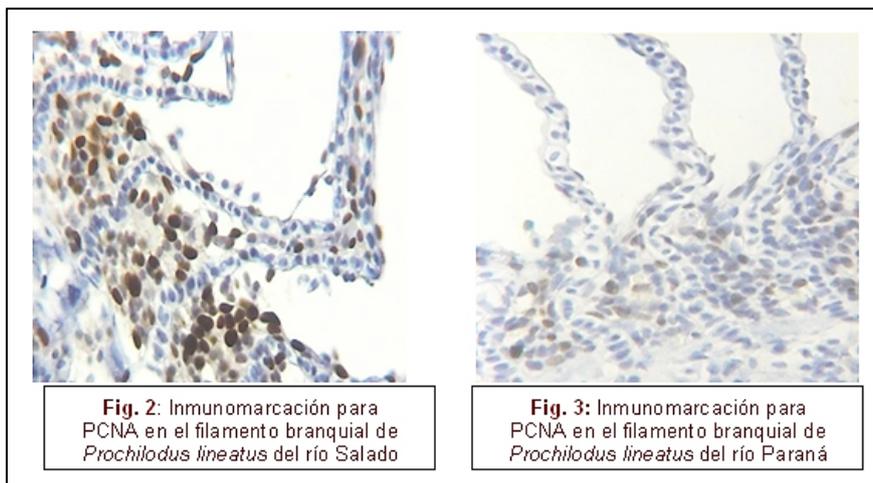
Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espesor siguiendo el protocolo descrito por Muñoz de Toro y Luque, 1995.

Los resultados fueron evidenciados mediante análisis digital de imágenes; éstas fueron generadas con un microscopio Olympus CH2 y digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio. La evaluación histomorfométrica se realizó con un analizador digital de imágenes (IMAGE PRO PLUS 3.0.1), evaluando los resultados a través del test de t de Student.

## RESULTADOS

### Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

Mediante la técnica de PCNA se pudo evidenciar una mayor inmunomarcación en las células del epitelio que conforma el filamento branquial en los peces del río Salado (Fig.2), con respecto a los del Paraná (Fig.3), existiendo por lo tanto diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos evaluados (Fig. 4).



## DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica inmunohistoquímica PCNA nos permitió analizar las alteraciones de la dinámica celular en los tejidos de las branquias, específicamente a nivel del epitelio del filamento branquial del *Prochilodus lineatus*, observando un aumento de la proliferación celular en los peces del río Salado con respecto a los peces del río Paraná. Estudios paralelos (Pastor et al., 2008) realizados en otra especie (*Pimelodus albicans*), han demostrado también, una alta proliferación celular en este órgano en los peces del río Salado, con respecto a los peces del río Paraná, utilizando el mismo indicador de proliferación celular (PCNA).

Al respecto, la mayor tasa de recambio celular podría deberse a alteraciones en su hábitat, lo que exigiría un aumento del recambio celular, coincidiendo con lo expresado por otros autores (Camargo & Martínez, 2007; Rondón Barragán et al., 2007; Troncoso et al., 2008), quienes afirman que el aumento en el número de las células, son importantes mecanismos de adaptación de las branquias a los cambios en el medio.

## CONCLUSIONES

Por todo lo expresado, se concluye que la definición de patrones de expresión celular de ciertas proteínas, podrían ser utilizados para identificar los cambios (biomarcadores) producidos en las branquias del *Prochilodus lineatus*, frente a alteraciones ambientales. No obstante, nuestros resultados no permiten inferir que los cambios observados sean atribuibles a modificaciones del medio ambiente. Esto podría subsanarse en instancias ulteriores mediante la complementación de este tipo de estudio, con otros que permiten determinar en forma general las particularidades del ambiente, en el momento del muestreo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andreotti, C; Gagneten, AM, 2006. Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado inferior (Argentina) en la supervivencia y reproducción de *Moina Micrura* (Crustacea, cladocera). *Rev. Toxicol* 23:146-150.
- Belmar, R, 2009. Medio Ambiente y Salud, [http://www.idrc.ca/es/ev-23083-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/es/ev-23083-201-1-DO_TOPIC.html), (consulta: junio de 2009).
- Biagini, F. R.; de Oliveira, J. A. & Fontanetti, C. S.; 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.
- Camargo, Marina M.P.; Martinez, Claudia B.R. 2007. "Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban steam" *Neotrop. Ichthyol.* Vol.5. N°:3.
- Del Barco, D. 2000. Situación actual de la actividad pesquera en la provincia de Santa Fe. Seminario Internacional de Pesca Continental, desarrollo sustentable de los recursos pesqueros de aguas continentales. Gobierno de la Provincia de Santa Fe, Consejo Federal de Inversiones (CFI). Santa Fe, 13 pp.
- Domitrovic, H.A. 1998. Histología y morfometría branquial de *Aequidens portalegrensis* (Pisces, Cichlidae). *Rev. Ictiol.* 6(1-2):25-32.
- Espinach Ros A., C.M.; Fuentes. 2000. Recursos Pesqueros y Pesquerías de la Cuenca del Plata. En: Bezzi, S; Akselman, R., Boschi, E. (eds) *Síntesis del Estado de las Pesquerías Marítimas, Argentinas y de la Cuenca del Plata*, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Argentina, 353-388.
- Giari, L., Manera, M., Simoni, E. & Dezfúli, B.S. 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*, 67: 1171-81.
- Lyons, B.; Stentiford, G.D.; Bignell, J.; Goodsir, F.; Sivyer, D.B.; Devlin, M.; Lowe, D.; Beesley, A.; Pascoe, C.-K.; Moore, M.N. & Garnacho, E. 2006. A biological effects monitoring survey of Cardigan Bay using flatfish histopathology, cellular biomarkers and sediment bioassays: Findings of the Prince Madog Price 2003. *Environ. Res.*, 62: S 342-6.
- Monteiro, S.M.; J.M Mancera; A. Fonthañas – Fernandes & M. Sousa. 2005. Cooper induced alterations of biochemical parameters in the gills and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp.Biochem. Physiol. C.* 141: 375-383.
- Muñoz de Toro, M. y E.H Luque. 1995. Effect of microwave pretreatment on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections. *J.Histotech.* 18:11-16.
- Olson, K.R. 2000a. Respiratory system. Gross functional anatomy. In: *The Laboratory Fish*. Ostrand, G.K. (ed.) Academia Press, London, pp. 151-159.
- Olson, K.R. 2000b. Respiratory system. Microscopic functional anatomy. In: *The Laboratory Fish*. Ostrand, G.K. (ed.) Academia Press, London, pp. 357-367.
- Pastor R.; O. Sbodio ; S.M. Galván y M. Rossini. 2008. Correlación entre la expresión de dos biomarcadores (PCNA y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa) en branquias de *Pimelodus albicans* de las cuencas del río Salado y Paraná. *RED VET. REV e Ictron. Vet.* Vol.IX, No 4 Abril/008.
- Rendón von Osten, J. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, p. 121-140. En: A.V. Botello, J. Rendón von Osten, G. Gold- Bouchot y C. Agraz- Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*, 2da. edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nac. Autón. de México Instituto Nacional de Ecología, p. 696.
- Romano LA. 1999. Bioindicadores de contaminación acuática en peces. *Revista AguaTIC*, N° 7.
- Rondón Barragán, Iang S.; Ramirez Duarte, Wilson F.; Eslava Mocha, Pedro R. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* Vol.20, N°: 4.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGyP) Res. 83/2010. [http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/pesca/pesca\\_continental/02-normativa/\\_archivos/090001-Resolucion%20Nro%20083%20\(a%20C3%B1o%202010\).pdf?PHPSESSID=21864ba400c36971bdc57256eb0acbb](http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/pesca/pesca_continental/02-normativa/_archivos/090001-Resolucion%20Nro%20083%20(a%20C3%B1o%202010).pdf?PHPSESSID=21864ba400c36971bdc57256eb0acbb)
- Segnini de Bravo, M. I.; J. Medina.; S. Marcano.; A. Boada-Sucre y H. Finol. 2005. Efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina, sobre algunos tejidos de *Colossoma macropomum*. *Cuvier 1818* (Pisces: Characidae). *Bol. Inst. Oceanograf. Venezuela.*
- Sottini, R.G. 2002. Ecología alimentaria de juveniles de *Pimelodus albicans* (Pisces, Siluriforme) de la cuenca del Río Salado. *Actas del VI Encuentro de Jóvenes Investigadores.* Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. [http://www.universia.com.ar/contenidos/-investigacion/unl/ C\\_BASICAS/biologia/ 1113.htm](http://www.universia.com.ar/contenidos/-investigacion/unl/ C_BASICAS/biologia/ 1113.htm) (consulta: junio de 2009).
- Troncoso, I.C.; Cazenave, J.; Bistoni, M.A. 2008. Análisis Histopatológico de branquias e hígado de sábalo. *Jornada. 74 Reunión de comunicaciones científicas.* 2008. Asociación de ciencias naturales del Litoral, Instituto Nacional de Limnología. CONICET.
- Torres, R. G.A. ; Gonzalez, 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.

- Viarengo, A.; Lowe, D.; Bolognesi, C.; Fabbri, E. & Koeler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2 – tier approach assering the level pollutant- induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 146: 281-300.
- Vigliano, F.A; Alemañ, N.; Quiroga, M.I.; Nieto, J.M. (2006a). Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinian silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anat. Histol. Embriol.* 35: 76-83.
- Vigliano, F.A. 2007. Módulo impreso del Curso de Posgrado “Introducción a la Ictiopatología”. Contenidos II Estructura Macro y Microscópica de los sistemas orgánicos de importancia diagnóstica de los Teleósteos. Lesiones más frecuentes . 2.2 Aparato respiratorio. p. 61-69.
- Woods, A. & Ellis, C.R. 1994. *Laboratory Histopatology. A Complete Reference* Longman Group Limited. Londres.

Volver a: [Piscicultura](#)