

Correlación entre la expresión de dos biomarcadores (PCNA y Na^+/K^+ ATPASA) en branquias del *Pymelodus albicans* de las cuencas del río Salado y Paraná - Correlation between the expression of two biomarker (PCNA y Na^+/K^+ ATPASA) in gills of *Pymelodus albicans* from Slado and Paraná rivers

Pastor Raquel¹, Sbodio Omar, Galvan Stella Maris, Rossini Marcos.
Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Departamento de Ciencias Morfológicas. Argentina
¹Contacto: rpastor@fcv.unl.edu.ar

REDVET: 2008, Vol. IX, N° 4

Recibido: 28.11.07 / Referencia provisional: F020_RED VET / Referencia definitiva: 040803_RED VET /
Aceptado: 23.02.08 / Publicado: 01.04.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html> concretamente en
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040803.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con
REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Los peces experimentan mecanismos de adaptación, producto de la contaminación del ambiente. *Pymelodus albicans* es un pez siluriforme propio de la cuenca del Río de La Plata, que está presente durante todo el año.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar biomarcadores específicos, que puedan ser de utilidad para analizar el impacto de cambios ambientales producidos en los ecosistemas acuáticos de las cuencas de los ríos Paraná y Salado en la República Argentina. Utilizamos un anticuerpo dirigido contra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Esta molécula es utilizada en estudios de proliferación y diferenciación celular en diferentes órganos de peces. La Na^+/K^+ ATPasa es una proteína que se expresa en las células de cloro, las que han sido descritas en la base de las laminillas y en el espacio interlamelar de las branquias, interviniendo en el equilibrio osmótico.

Con PCNA se observó una mayor expresión en el epitelio del filamento branquial, existiendo diferencias en la inmunoreactividad de las muestras

obtenidas en la cuenca del río Salado (35.6+/-8.1%) con respecto a las obtenidas en el río Paraná (10.5+/-4.6%) ($p < 0.01$).

Con Na^+/K^+ ATPasa se observó una menor expresión en las células de cloro de los peces del río Salado (22.34+/-4.87%) con respecto a los peces del río Paraná (53.65+/-10.78%), existiendo una correlación negativa significativa ($r = 0.859$, $p < 0.01$) entre la expresión de ambos marcadores.

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

Palabras claves: *Pymelodus albicans* | Río Salado | Río Paraná | Biomarcadores.

Summary

Fishes experiment mechanisms of adaptation, product of the contamination of the environmental one. *Pymelodus albicans* is a fish characteristic of La Plata river that is present during the whole year. The aim of the present work was to characterize specific biomarkers that can be of utility to analyze the impact of environmental changes taken place in the aquatic ecosystems of the rivers Paraná and Salado from Argentina. An antibody against proliferation cell nuclear antigen (PCNA) was used. This molecule is used in cellular proliferation studies in different organs of fish. The Na^+/K^+ ATPase is a protein that is expressed in the chlorine cells, those that have been described in the base of the thin sheets and in the interlaminar space of the gills, intervening in the osmotic balance. A higher expression of PCNA was observed in the epithelium of branchial filament, with differences in the immunoreactivity in the samples coming from of Salado river (35.6+/-8.1%) with regard to the samples obtained of Paraná river (10.5+/-4.6%) ($p < 0.01$). A smaller expression of Na^+/K^+ ATPase was observed in the chlorine cells of the fish from Salado River (22.34 +/- 4.87%) with regard to those from Paraná river (53.65+/-10.78%) concomitant with a negative correlation ($r = 0.859$, $p < 0.01$) between both markers expression. Based on these results, we intend that these expression patterns could be used to identify changes (biomarkers) in the gills of the *Pymelodus albicans*, allowing the use of this species like sentry in front of alterations in their environments.

Keywords: *Pymelodus albicans* | Salado river | Paraná river | biomarkers

El presente trabajo se ha realizado en el marco de un proyecto CAI+D 2005, del cual soy directora, cuyo título es "Estudio comparativo macroscópico y microscópico del *Pymelodus albicans*. Definición de biomarcadores y bioindicadores" y el que está financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Introducción

Pymelodus albicans (Valenciennes, 1840), pertenece a la Orden *Siluriformes*, Familia *Pimelodidae*, designado con varios nombres vulgares: Moncholo, Moncholo Blanco, Bagre, Bagre blanco, Bagre Branco, Indio, Mandí, Mandí Guarú, Mandí-Morotí, Mandí Branco, Porteñito, Trompudo (Fig. 1).

Presenta una cabeza grande, cuerpo con piel lisa desprovista de escamas, sin huesos intermusculares, con barbillas sensoriales largas, ojos pequeños y boca ancha con denticillos sobre el vómer en dos placas. También presenta un par de aletas pectorales y de aletas distales con radios osificados; así como una espina



Figura 1: Vista dorsal del *Pymelodus albicans*

adiposa larga con denticillos pequeños, y una aleta caudal con lóbulos irregulares de los cuales el dorsal es el más prolongado. El color es plateado plomizo con cinco fajas longitudinales una a lo largo del dorso, cuyo tinte engloba la superficie dorsal de la cabeza y la aleta dorsal, una faja lateral de cada lado sobre la línea de poros y otra más angosta debajo de dicha línea a ambos lados del cuerpo. Su tamaño puede llegar hasta 60 cm., para ejemplares de más de 10 años de edad y su peso hasta los 4 Kg. Su alimentación es predominantemente omnívora con tendencia carnívora, incluyendo su dieta pequeños peces, artrópodos, moluscos y otros organismos del bentos. Realiza importantes migraciones con fines reproductivos y tróficos. Es un pez propio de la cuenca del Plata, su distribución geográfica incluye los ríos componentes de esta cuenca: De la Plata, Paraná, Paraguay y Uruguay y sus afluentes tales como el Salado, Carcarañá, Tercero, Cuarto, en la República Argentina (Fig. 2) (Ringuelet et al., 1967; SAGPyA. 2007).

En el río Paraná dicha especie está presente durante todo el año y es objeto de una intensa pesca deportiva y comercial. Ocupa el quinto lugar entre las más explotadas en la Provincia de Santa Fe por lo que constituye un importante recurso económico (Del Barco, 2000). En dicha provincia, su

explotación deportiva y comercial se encuentra habilitada todo el año y la única restricción establecida en la legislación es un tamaño mínimo de 35 cm. de longitud.

Cabe destacar que el nivel de contaminación en la República Argentina es elevado y esto es consecuencia del aumento gradual de la población urbana, del desarrollo industrial y de la agricultura moderna con relación al uso de fertilizantes y tratamientos protectores con pesticidas y funguicidas. Un gran número de sustancias son vertidas en los ecosistemas acuáticos, terrestres y en la atmósfera (Butler, 1978; Parma de Croux, M.J.et al. 1999; Reddy, et al. 2006).



Figura 2: Mapa de la provincia de Santa Fe indicando los cursos de los ríos Paraná y Salado

Es por esta razón que resulta de mucha importancia la definición de biomarcadores y bioindicadores en estructuras morfológicas de peces de dichas cuencas, ya que estos nos proporcionan información relativa de los efectos de las sustancias y también de procesos interactivos, o sea que a través de su utilización permiten evaluar y medir el efecto que producen diferentes factores que afectan los ecosistemas (Barra, R. & Orrego, R. 2004; Segnini de Bravo, et al. 2005).

La utilización de organismos vivos como indicadores del impacto ambiental se ha desarrollado enormemente en los últimos años. Actualmente todos los planes de monitoreo de cuerpos de agua los incluyen. Los peces constituyen un grupo presente en estos medios y evidencian una gran cantidad de mecanismos de adaptación.

Más allá de su valor económico para el hombre, juegan un rol muy importante dentro de los ecosistemas acuáticos debido al papel que desempeñan en las tramas tróficas y en la actualidad han cobrado una importancia considerable en el monitoreo de ambientes acuáticos a partir de los avances de la ictiopatología. Esta especialidad ha aportado innumerables diagnósticos diferenciales y metodologías confiables para la cuantificación del impacto recibido por los organismos. En este sentido numerosos autores utilizan a los peces como indicadores del estado de estrés ambiental (Hinton, 1990; Domitrovic, 1997).

Entre las investigaciones desarrolladas sobre los efectos de sustancias tóxicas sobre peces, surgen las contribuciones realizadas a partir de diversos estudios histopatológicos, los que si bien han abarcado diferentes órganos (Domitrovic, 2000; Cerqueira y Fernandes, 2002; Mazon, et al. 2002; Monteiro, et al. 2005; Vigliano, et al. 2006), enfatizaron fundamentalmente en las branquias, obviamente por su importancia en la respiración.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar biomarcadores específicos, que puedan ser de utilidad para analizar el impacto de cambios ambientales producidos en los ecosistemas acuáticos de las cuencas del Paraná y Salado en la República Argentina.

Metodología

Se trabajó con muestras de 20 peces, 10 de los cuales fueron capturados en la cuenca del río Salado en el departamento Las Colonias (Provincia de Santa Fe) y los 10 restantes fueron obtenidos en el río Paraná 50 Km aguas arriba de la ciudad de Paraná (Provincia de Entre Ríos) (Fig.2). Las piezas se enmarcaron dentro del Reglamento de Pesca dispuesto por la Subsecretaría de Medio Ambiente y Ecología de la Provincia de Santa Fe.

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 μm 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 biotinilado 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.

También se utilizó la inmunodetección de Na^+/K^+ ATPasa. Esta es una proteína que se expresa en las células de cloro, las que han sido descritas en la base de las laminillas y en la zona interlamelar de los filamentos branquiales, interviniendo en el equilibrio iónico, fundamental para la osmorregulación.

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 3 μm 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 inmunomarcación con PCNA se observó una mayor expresión en las células del epitelio que conforma el filamento de la branquia, existiendo

diferencias en la inmunorreactividad de las muestras obtenidas en la cuenca del río Salado (Fig. 3: 35.6 +/- 8.1%) con respecto a las obtenidas en el río Paraná (Fig. 4: 10.5 +/- 4.6%) ($p < 0.01$).

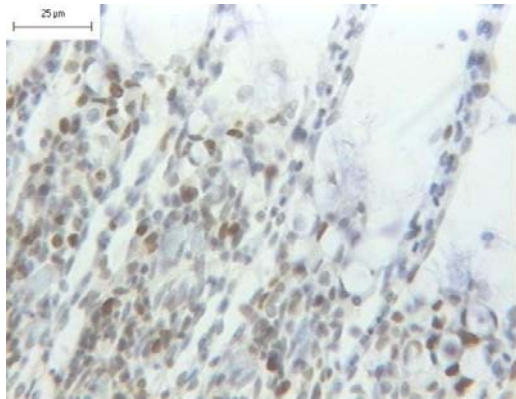


Figura 3: Inmunomarcación para PCNA en el filamento branquial de *Pymelodus albicans* del río Salado

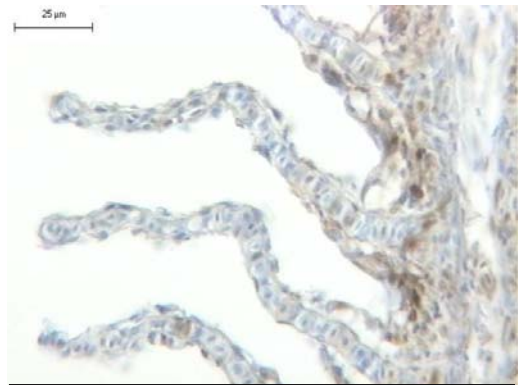


Figura 4: Inmunomarcación para PCNA en el filamento branquial de *Pymelodus albicans* del río Paraná

Na⁺/K⁺ ATPasa

Mediante la inmunomarcación con Na⁺/K⁺ ATPasa se observó una menor expresión en las células de cloro de los peces del río Salado (Fig. 5: 22.34 +/- 4.87%); en los peces del río Paraná la expresión de dichas células fue mayor (Fig. 6: 53.65 +/- 10.78%), extendiéndose esta marcación hasta las laminillas. Se registró una correlación negativa significativa ($r = -0.859$; $p < 0.01$) entre la expresión de ambos marcadores.

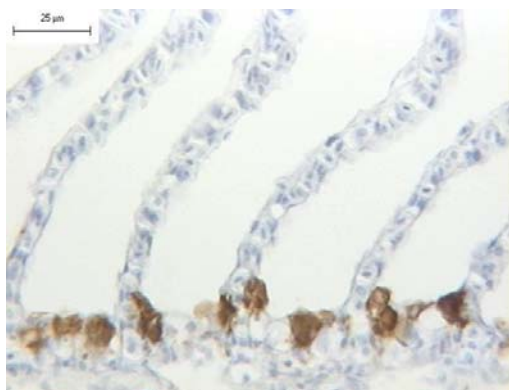


Figura 5: Inmunomarcación para Na⁺/K⁺ ATPasa (alfa 5-DSHB) en la base de la laminilla de *Pymelodus albicans* del río Salado

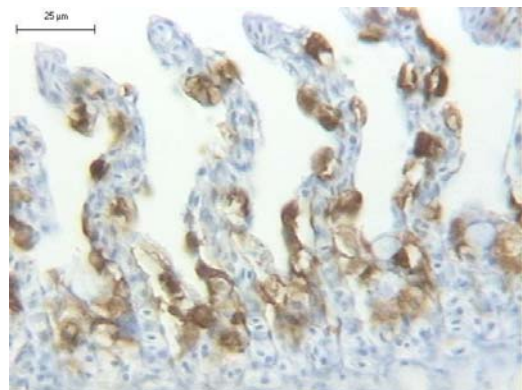


Figura 6: Inmunomarcación para Na⁺/K⁺ ATPasa (alfa 5-DSHB) en la laminilla de *Pymelodus albicans* del río Paraná

Discusión y Conclusiones

Esta técnica nos permitió analizar las alteraciones de la dinámica celular en los tejidos que conforman las branquias del *Pymelodus albicans*, observando por un lado un aumento de la proliferación celular a nivel del epitelio del filamento branquial, en los peces que habitan el río Salado; y por el otro, un aumento en el número y una distribución diferente de las células de cloro en los peces del río Paraná.

En este sentido, las diferencias en la inmunorreactividad en peces de dos ambientes acuáticos diferentes, podrían relacionarse con alteraciones en su medio, lo que exigiría un aumento del recambio celular. La mayor proliferación retardaría el proceso de diferenciación de las células de cloro, esto coincide con lo expresado por Dang, et al., 2000, Handy, 2003 y Velasco Santamaría, et al. 2006, quienes afirman que el aumento en el número de las células de cloro y la migración hacia la laminilla son importantes mecanismos de adaptación de las branquias a los cambios en su medio.

Se concluye de este modo que la definición de estos patrones de expresión podrían ser utilizados para identificar los cambios (biomarcadores) producidos en las branquias del *Pymelodus albicans*, de diferentes ambientes acuáticos.

Recomendaciones

La importancia de los hallazgos radica en el hecho de que mediante este tipo de estudio se puede disponer de mayores elementos valorativos para detectar cambios ambientales en los diversos cursos acuáticos. Sería entonces recomendable que esta metodología de diagnóstico pueda ser instrumentada por los organismos encargados del contralor del medio ambiente.

En tal sentido, resultaría conveniente aumentar la capacitación de recursos humanos a través del desarrollo de cursos, y de diversos mecanismos de difusión sobre los resultados obtenidos, tal como se viene realizando.

Por otro lado, sería importante darle a este tipo de estudio la conveniente sostenibilidad en el tiempo a los fines de detectar otros posibles cambios en las diferentes estaciones, y durante un período más prolongado de tiempo.

Bibliografía

1. Barra, R. & Orrego, R. 2004. Biomarcadores de contaminación Acuática en el río Bio Bio (Chile Central): Lecciones y vacíos en el conocimiento. Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción.
2. Butler, G. C. 1978. Ed. Principles of Ecotoxicology: John Wiley & Sons. Chinchester.

3. Cerqueira, C. C. C.; Fernandes, M. N. 2002. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety Environ. Res.* B 52: 83-91.
4. Dang, Z.; Lock, R. A. C.; Flik, G.; Wendelaar, B. S. E. 2000. Na⁺/K⁺-ATPase Immunoreactivity in branquial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. *The Journal Experimental Biology* 203, 370-387.
5. 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.
6. Domitrovic, H.A. 1997. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalerensis* (Hensel, 1870). *Rev. Ictiol.* 5(1-2): 37-42.
7. Domitrovic, H.A. 2000. Centros melanomacrófagos en hepatopáncreas, bazo y riñón de *Cichlasoma dimerus* (Pices, Cichlidae): estructura histológica y modificaciones en relación a condiciones sanitarias y ambientales. *Revista de Ictiología* 8(1/2): 9-18.
8. Handy, R.D. 2003. Review: Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological proces?. *Comp. Biochem. Physiol.* A 135: 25-38.
9. Hinton, D.E. & D.J. Laurén. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fhise: Potencial biomarkers of exposure. P. 17-57. In: Biomarkers of environmental contaminations; Eds. J.f.Mc. Carthy & L.R. Shugart Lewis Publisher, Boca ratón. USA.
10. Mazon, A. F.; Cerqueira, C. C. C.; Fernandes, M. N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* A 88: 52-63.
11. Monteiro, S. M.; Mancera, J. M.; Fontaínhas-Fernandes, A.; Sousa, M. 2005. Cooper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* C 141: 375-383.
12. Muñoz de Toro, M. & Luque, E.H. 1995. Effect of microwave pretreatment on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inmunolocalization in paraffin sections.
13. Parma de Croux, M.J.; Arquiel, P.; Ortega, H.H.; Lorente, J.A. 1999. Toxicidad aguda y alteraciones titulares producidas por acción del herbicida Paraquat en juveniles de pacú (*Piaractus mesopotámicus*). *FABICIB* 3: 113-118.
14. Reddy, R.; Pillai, B. R.; Adhikari, S. 2006. Bioaccumulation of copper in post-larvae and juveniles of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) exposed to sub-lethal levels of copper sulfate. *Aquaculture* 252: 356-360.

15. Ringuelet, R.A.; Aramburu, R.H. y Alonso de Aramburu A. 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Com. Inv. Cient., Prov. Bs. As., 602 pp.
16. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, SAGPyA. 2007 Distribución Geográfica del *Pymelodus albicans*. www.produccion-animal.com.ar
17. Segnini de Bravo, M. I.; Medina, J.; Marcano, S.; Boada-Sucre, A. y Finol H. 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, Univ. Oriente 44 (1): 51-57, 7 Figs.
18. Velasco Santamaría, Y. M.; Gómez Manrique, W. y Calderón Bernal, J. M. 2006. Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. Orinoquia, año/vol. 10, número 001. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia. Pp. 64-70.
19. 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. Embryol.* 35, 76-83.
20. Woods, A.y Ellis, C.R.; 1994. Laboratory Histopatology. A Complete Reference Longman Group Limited. Londres

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesinas, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> o en desde **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por [correo electrónico](mailto:redvet@veterinaria.org) solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® (Copyright) 1996-2007 E_mail: info@veterinaria.org