

INMUNOEXPRESIÓN DE Na^+/K^+ ATPASA EN BRANQUIAS DE *Pimelodus albicans* DE LOS RÍOS SALADO Y PARANÁ

**RAQUEL PASTOR, OMAR SBODIO, STELLA MARIS GALVÁN,
MARCOS ROSSINI y MARÍA LAURA GARCÍA CERVERA**

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R.P. Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe. E-mail: rpastor@fcv.unl.edu.ar

RESUMEN

Los peces experimentan mecanismos de adaptación, producto de la contaminación del ambiente. *Pimelodus albicans* es un pez autóctono de la ictiofauna continental argentina. La utilización de órganos y biomarcadores específicos está indicada en los estudios de impacto ambiental. Para este estudio se eligieron las branquias por su importancia funcional y por ser un órgano de choque. Como biomarcador se seleccionó la Sodio/Potasio ATPasa (Na^+/K^+ ATPasa), proteína que se expresa en las células de cloro. Estas células han sido descritas en la base de las laminillas y en la zona interlamelar de los filamentos branquiales y están involucradas en el equilibrio iónico, fundamental para la osmorregulación. El objetivo del presente trabajo fue comparar la expresión de la enzima Na^+/K^+ ATPasa en las células de cloro de las branquias de *Pimelodus albicans* de los ríos Salado y Paraná, durante la primavera 2005 y 2006. Los resultados indicaron un mayor número de células de cloro inmunomarcadas y dispuestas en las laminillas branquiales, en los peces del río Paraná. Se concluyó que las diferencias observadas en estas células podrían ser atribuibles a cambios en su ambiente.

Palabras clave:

Pimelodus albicans, ríos Paraná y Salado, biomarcadores.

IMMUNOEXPRESSION OF Na^+/K^+ ATPASA IN GILLS OF *Pimelodus albicans* FROM SALADO AND PARANÁ RIVERS

**RAQUEL PASTOR, OMAR SBODIO, STELLA MARIS GALVÁN,
MARCOS ROSSINI y MARÍA LAURA GARCÍA CERVERA**

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R.P. Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe. E-mail: rpastor@fcv.unl.edu.ar

ABSTRACT

Fish experience adaptation mechanisms in response to environmental pollution. *Pimelodus albicans* is a typical fish of the La Plata River basin, where it is present all year round. The use of organs and specific biomarkers, is indicated in environmental impact studies. For this study the gills were chosen because of their functional importance and for being a crash organ. The Sodium/Potassium ATPase, a protein that is expressed in the chloride cells, was selected as a biomarker. The chloride cells have been described in the base of the thin sheets and in the branchial filaments interlamellar area. They are involved in the ionic balance, fundamental for osmoregulation. The objective of the present work was to compare the expression of the Na^+/K^+ ATPase enzyme in the chloride cells of the gills of *Pimelodus albicans* from the Salado and Paraná Rivers basins, during spring 2005 and 2006. The results indicated higher numbers of immunomarked chloride cells located in the branchial filaments of the fish from the Paraná River. It was concluded that the differences could be attributed to environmental changes.

Key words:

Pimelodus albicans, Paraná and Salado rivers, biomarkers.

INTRODUCCIÓN

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 (Parma de Croux *et al.*, 1999).

El efecto inmediato de los contaminantes se produce sobre los organismos vivos por toxicidad directa o alterando el ambiente donde se desarrollan (Puig, 2002). Los peces experimentan gran variedad de mecanismos de adaptación a los cambios en las condiciones del medio en el que habitan y se los usa como organismos indicadores (bioindicadores) del estado del estrés ambiental. Se entiende por bioindicador a la respuesta biológica a nivel elevado de organización (poblaciones, comunidades, ecosistemas) ante cambios del medio. Por otra parte se define como biomarcador a todo cambio inducido por un contaminante en un componente bioquímico o celular y que puede ser medido en un sistema biológico (Orrego *et al.*, 2006). Los bioindicadores a través de los biomarcadores proporcionan información relativa de los efectos de las sustancias y también de procesos interactivos. Su importancia radica en que a través de su utilización, permiten evaluar y medir el efecto que producen diferentes factores que afectan los ecosistemas (Markert *et al.*, 2003). Actualmente todos los planes de monitoreo de cuerpos de agua incluyen a los peces como indicadores de contaminación ambiental (Rendón, 2005).

Dentro de las investigaciones desarrolladas sobre los efectos de sustancias tóxicas sobre peces, surgen las relacionadas con estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos (Domitrovic, 1997). Si bien los mismos han abarcado diferentes órganos, se enfatizan particularmente aquellos vinculados a las branquias, obviamente por su importancia en la respiración (Dang *et al.*, 2000; Cerqueira & Fernandes, 2002; Monteiro *et al.*, 2005; Segnini de Bravo *et al.*, 2005; Pastor *et al.*, 2008).

Pimelodus albicans (Valenciennes, 1840), denominado vulgarmente moncholo, es un pez autóctono de la ictiofauna continental argentina, que frecuenta el fondo de los ambientes acuáticos (Ringuelet, 1967), estando presente en los cursos de agua de la región durante todo el año. Su alimentación es predominantemente omnívora con tendencia carnívora y su crecimiento es relativamente lento (Cordiviola & Pignalberi, 1962; Bonetto *et al.*, 1963, 1971).

En la provincia de Santa Fe se utiliza al cauce del río Salado como vía de desagüe, por lo que sus aguas acusan graves índices de contaminación, surgiendo problemas ecológicos periódicos con episodios de mortandad de peces (Sottini, 2002). Este problema se hace más acuciente aún en el Departamento Las Colonias debido a la elevada cantidad de productos químicos utilizados por la industria del cuero.

El río Paraná es el mayor y más importante integrante de la cuenca del Plata. A lo lar-

go de su curso se diferencian tres tramos: el Alto Paraná, el Paraná Medio y el Delta del Paraná. En el caso del Paraná Medio, este río se caracteriza por su menor profundidad, mayor anchura y por la profusión de riachos e islas. Según lo destaca el "Programa Marco Para la Gestión Sostenible de los Recursos Hídricos de la Cuenca del Plata", sobre este tramo del río la calidad del agua es aceptable para los diversos usos a los que se destina, dada la gran capacidad depuradora del mismo.

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 los peces. A tal fin se procuró analizar el impacto de la contaminación en órganos de choque, que son los que comandan la respuesta sintomatológica a determinados contaminantes (Belmar, 2009).

Cabe aclarar que para el presente trabajo, sólo nos abocamos a estudiar los cambios producidos en las branquias de estos ejemplares, específicamente en uno de sus componentes celulares (células de cloro). La elección de las branquias para este estudio se debe a la importancia funcional que poseen, ya que en ellas se llevan a cabo procesos fisiológicos vitales tales como la regulación del equilibrio hidroelectrico y ácido-base que se produce principalmente en el epitelio de los filamentos de estos órganos (Goss *et al.*, 1992; Olson, 2000b; Wilson *et al.*, 2000) y el intercambio de gases efectuado en sus laminillas (Perry & Laurent, 1993; Perry & Mc Donald, 1993). También por ser consideradas como órganos de choque, al estar más expuestas al ambiente.

El aparato branquial, 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, 2000b; Vigliano *et al.*, 2006).

Los filamentos branquiales están tapizados por una gran variedad de células, siendo las más abundantes las células epiteliales de revestimiento, las células mucosas y las células de cloro, también denominadas células ricas en mitocondrias o ionocitos. Estas últimas, motivo de nuestro estudio, para cumplir con sus funciones poseen un sistema membranoso tubular muy desarrollado que permite aumentar el área de intercambio relacionado con diversos mecanismos de transporte iónico y una intensa actividad de Na^+/K^+ ATPasa (Roncero *et al.*, 1990; Perry, 1997; Vigliano *et al.*, 2006).

Las células de cloro están específicamente situadas en la base de las laminillas y en la zona interlamelar de los filamentos branquiales. Presentan una forma redondeada u oval y raramente alcanzan la membrana basal del epitelio. Su membrana apical se localiza al mismo nivel de las células epiteliales de revestimiento y presentan microvellosidades.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los cambios en la densidad y localización de las células de cloro inmunomarcadas en branquias de *Pimelodus albicans* de los ríos Salado y Paraná, mediante la técnica de inmunohistoquímica a través de la enzima Na^+/K^+ ATPasa; procurando identificar diferencias atribuibles a modificaciones en su ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de branquias de 40 ejemplares de *Pimelodus albicans* colectados durante las primaveras de los años 2005 ($n = 20$) y 2006 ($n = 20$). De cada muestreo, 10 muestras pertenecieron a peces capturados en la cuenca del río Salado en el departamento Las Colonias (Provincia de Santa Fe; $31^\circ 23' 04.43''\text{S}$; $60^\circ 53' 37.32''\text{O}$) y las 10 restantes fueron obtenidas en el río Paraná, 50Km aguas arriba de la ciudad de Paraná (Provincia de Entre Ríos; $31^\circ 23' 05.37''\text{S}$; $60^\circ 06' 17.33''\text{O}$). Todas las piezas se enmarcaron dentro del Reglamento de Pesca dispuesto por la Subsecretaría de Medio Ambiente y Ecología de la Provincia de Santa Fe (República Argentina).

Se tomaron muestras de filamentos ubicados en los extremos dorsal y ventral de cada arco branquial y del borde caudal del mismo. 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 & Ellis, 1994).

Por último, se efectuaron cortes seriados de $3 \mu\text{m}$ de espesor, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina y eosina.

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta para detectar la Na^+/K^+ ATPasa. Brevemente, los cortes se desparafinaron en xilol y se hidrataron en soluciones decrecientes de alcohol etílico y finalmente en PBS. Se realizó la inactivación de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% en metanol por 20 minutos y el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 1% por 15 minutos (previo a la incubación con el anticuerpo primario). La recuperación antigénica se realizó con buffer citrato $0,01 \text{ M pH } 6,0$ en microondas (Muñoz de Toro & Luque, 1995). Se utilizó el anticuerpo primario Anti $\alpha 5$ ($\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa) DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank) en una dilución 1:200. Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el sistema biotina-streptoavidina-peroxidasa. El anticuerpo secundario biotinilado (Zymed® Cat No. 81-6540, dilución 1:120) se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente al igual que el complejo streptoavidina-peroxidasa (Biogenex® Cat No. HK330-9K). Como cromógenos se utilizaron alternativamente aminoetilcarbazol (AEC) (Biogenex® Cat No.

HK139-5K) o diaminobencidina (DAB) (Dako® Cat No. K3466). Entre cada uno de los pasos descritos se efectuaron 3 lavados con PBS. Finalmente las muestras fueron coloreadas con hematoxilina y montadas con Ultramount (Dako® Cat No. S1964).

Posteriormente, se efectuó la cuantificación de células inmunomarcadas, en relación al total de células, y la observación de la localización de las mismas. Mediante análisis digital de imágenes, generadas con un microscopio Olympus CH2 y digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS, se fijaron los límites de intensidad para considerar las células positivas.

Para el análisis de los datos se efectuó la prueba de *t* de Student (SPSS 11.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois), comparando los valores correspondientes a los diferentes ambientes en los distintos años.

RESULTADOS

Mediante la técnica de Na^+/K^+ ATPasa pudo evidenciarse marcación de membrana en las células de cloro, en las branquias de los peces de ambos sitios. Se observó que en los peces del río Salado hubo un menor número de células que la expresaron, en tanto que dicho número fue mayor en los peces del río Paraná, en los cuales la marcación se extendió hasta las laminillas. La misma tendencia se observó en los dos años estudiados (Fig.1 A y B, y Fig. 2 A y B).

Se evidenció coincidencia en los resultados obtenidos en cada ambiente en relación a la estación y en los años involucrados, con valores similares estadísticamente ($p > 0,05$). Sin embargo, las cuantificaciones fueron diferentes significativamente entre los peces de ambos ambientes en los 2 muestreos ($p < 0,01$) (Fig. 3).

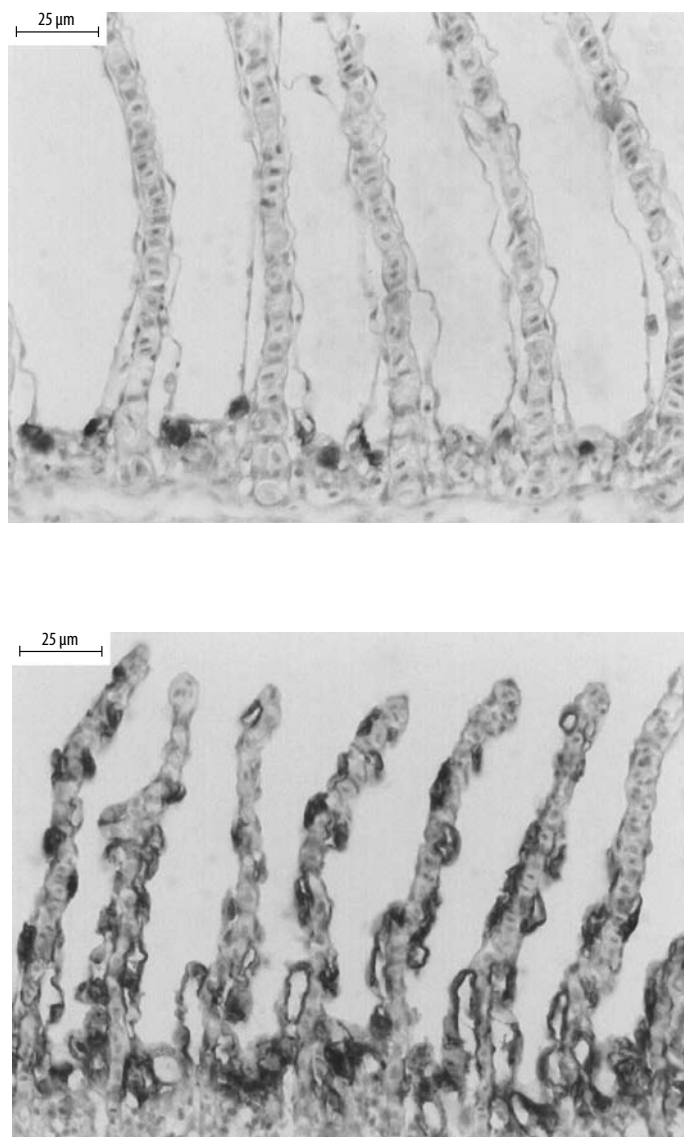


Figura 1. Inmunomarcación para Na^+/K^+ ATPasa (alfa 5-DSHB) en la base de la laminilla de *Pimelodus albicans* capturados en 2005 en (a) el río Salado y (b) el río Paraná.

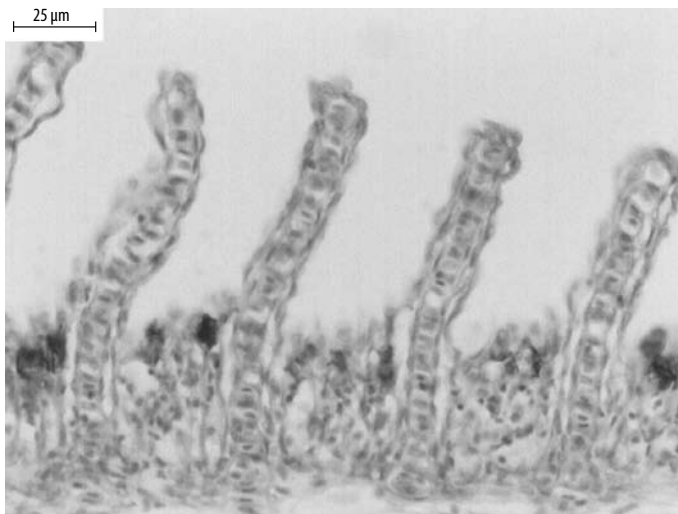
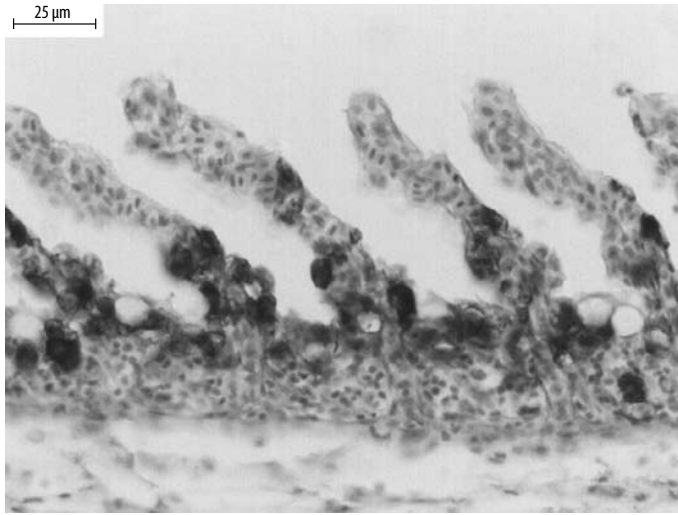


Figura 2. Inmunomarcación para Na⁺/K⁺ ATPasa (alfa 5-DSHB) en la base de la laminilla de *Pimelodus albicans* capturados en 2006 en (a) el río Salado y (b) el río Paraná.

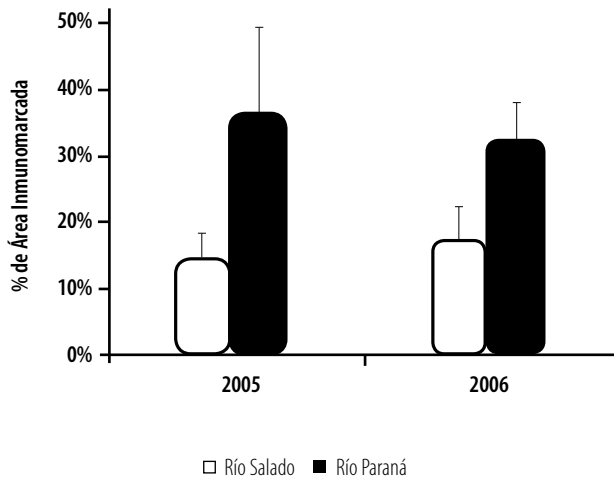


Figura 3. Cuantificación de la inmunomarcación para Na^+/K^+ ATPasa.

DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica inmunohistoquímica para la detección de Na^+/K^+ ATPasa nos permitió analizar las alteraciones de la dinámica celular en los tejidos que conforman las branquias de *Pimelodus albicans*, observando un aumento en el número y diferente localización de las células de cloro en los ejemplares del río Paraná. Hemos observado estas células en las laminillas branquiales, coincidiendo con lo descrito previamente en peces que se encuentran en medios con baja concentración de sales, lo que estaría relacionado con la necesidad de una mayor captación de iones (Laurent & Dunel, 1980; Leino *et al.*, 1987; Wendelaar Bonga & van der Meij, 1989; Laurent & Perry, 1991).

Estudios paralelos realizados en la misma especie (Pastor *et al.*, 2008), han demostrado una alta proliferación celular en branquias de los ejemplares del río Salado, con respecto a los peces del río Paraná. Esta mayor tasa de recambio celular podría deberse a alteraciones en el ambiente, la que retardaría el proceso de diferenciación de las células de cloro, coincidiendo con lo expresado por otros autores (Dang *et al.*, 2000; Handy, 2003; Mazon *et al.*, 2002; 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 el medio. En el mismo sentido, Laurent & Dunel (1980) y posteriormente Wendelaar Bonga *et al.* (1990) detectaron la presencia de células accesorias. Estas células son más pequeñas que las células de cloro, presentando las mismas organelas aunque menos desarrolladas, por lo que se cree que representarían

estadios iniciales de dichas células (Wendelaar Bonga & van der Meij, 1989). Además, el incremento en la salinidad del medio produciría un aumento en el número de células accesorias, probables precursoras de las células de cloro (Laurent & Dunel, 1980).

CONCLUSIONES

Por todo lo expresado, se concluye que la definición de patrones de expresión celular de ciertas proteínas, como la Na^+/K^+ ATPasa, podría ser utilizada como biomarcador en las branquias de *Pimelodus albicans*, frente a alteraciones ambientales. No obstante, nuestros resultados no permiten inferir que los cambios observados son atribuibles a determinadas modificaciones del ambiente. Esto podría subsanarse en instancias ulteriores mediante la complementación de este tipo de estudio, con otros que permitan determinar en forma general las características físico-químicas del ambiente en el momento del muestreo.

AGRADECIMIENTOS

A la Vet. M.Cs. Natalia Salvetti, Dra. Bibiana Dallard y Dr. Hugo Ortega por su colaboración y valiosas sugerencias. Financiamiento: Proyecto CAI+D 2005, programa N° 32, proyecto N° 204, titulado "Estudio comparativo macroscópico y microscópico del *Pimelodus albicans*. Definición de biomarcadores y bioindicadores", financiado por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral.

Recibido | Received: 08 de Abril de 2009

Aceptado | Accepted: 10 de Febrero de 2010

REFERENCIAS

- Belmar, R.** 2009. Medio Ambiente y Salud, http://www.idrc.ca/es/ev-23083-201-1-DO_TOPIC.html, (consulta: junio de 2009).
- Bonetto, A., C.E. Pignalberi & E. Cordiviola.** 1963. Ecología alimentaria del "amarillo" y "moncholo" *Pimelodus clarias* (Bloch) y *Pimelodus albicans* (Valenciennes) (Pisces Pimelodidae). *Physis* 24 (67): 87-94.
- Bonetto, A., C.E. Pignalberi, E. Cordiviola & O. Oliveros.** 1971. Informaciones complementarias sobre migraciones de peces en la cuenca del Plata. *Physis* 30 (81): 505-520.
- Cerqueira, C.C.C. & M.N. Fernandes.** 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scofra*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52 (2):83-91.
- Cordiviola, E. & C. Pignalberi.** 1962. Edad y crecimiento del "amarillo" (*Pimelodus clarias*) y "moncholo" (*Pimelodus albicans*). *An. Mus. Prov. Cienc. Nat. F. Ameghino* 1 (3): 67-76.
- Dang, Z., R.A.C Lock, G. Flik & S.E. Wendelaar Bonga.** 2000. Na⁺/K⁺-ATPase Immunoreactivity in branquial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. *J. Exp. Biol.* 203: 379-387.
- 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.
- Domitrovic, H.A.** 1998. Histología y morfometría branquial de *Aequidens portalegrensis* (Pisces, Cichlidae). *Rev. Ictiol.* 6 (1-2):25-32.
- Goss, G.G., S.F. Perry, C.M. Word Perry & P. Laurent.** 1992. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. *J. Exp. Zool.* 263 (2):143-159.
- Handy, R.D.** 2003. Review: Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Physiol.* 135A: 25-38.
- Laurent, P. & S. Dunel.** 1980. Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.* 238 (3):R147-R159.
- Laurent, P. & S.F. Perry.** 1991. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.* 64 (1): 4-25.
- Mazon, A.F., C.C.C Cerqueira & M.N. Fernandes.** 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scofra*. *Environ. Res.* 88: 52-63.
- Monteiro, S.M., J.M. Mancera, A. Fonhainas-Fernandes & M. Sousa.** 2005. Cooper induced alterations of biochemical parameters in the gills and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 141C: 375-383.
- Muñoz de Toro, M. & 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: G.K. Ostrander (ed.) *The Laboratory Fish*. Academia Press, London, pp. 151-159.
- Olson, K.R.** 2000b. Respiratory system. Microscopic functional anatomy. In: G.K. Ostrander (ed.) *The Laboratory Fish*. Academia Press, London, pp. 357-367.
- Orrego, R., A. Burgos, G. Moraga-Cid, B. Inzunza, M. Gonzalez, A. Valenzuela, R. Barra & J.F. Gavilán.** 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio River, Chile. *Environ Toxicol. Chem.* 25 (9): 2280-2287.
- Parma de Croux, M.J., P. Arquiel, H.H. Ortega & J.A. Lorente.** 1999. Toxicidad aguda y alteraciones titulares producidas por acción del herbicida Paraquat en juveniles de pacú (*Piaractus mesopotámicus*). *FA-BICIB* 3: 113-118.
- Pastor R., O. Sbodio, S.M. Galván & M. Rossini.** 2008. Correlación entre la expresión de dos biomarcadores (PCNA y Na⁺/K⁺ ATPasa) en branquias de

- Pimelodus albicans* de las cuencas del río Salado y Paraná. REDVET 9 (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070709.html>).
- Perry S.F. & P. Laurent.** 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: J.C. Rankin & F.B. Jensen (eds.) Fish Ecophysiology. Chapman & Hall. London, pp. 231-264.
- Perry, S.F. & P. Mc Donald.** 1993. Gas exchange. In: D.H. Evans (ed.) The physiology of fishes. CRC Press, Florida, pp 251-278.
- Perry, S.F.** 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 325-347.
- Puig, A.** 2002. Ecotoxicología; ensayos de toxicidad; riesgo ecológico; bioindicadores; autodepuración; estresante; efecto tóxico. En: Volkheimer, Scaffati, Melendi (eds) Breve enciclopedia del medio ambiente. www.cricyt.edu.ar/enciclopedia.
- Rendón von Osten, J.** 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos (121-140). En: 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. ed. Univ. A.UNAM, Instituto Nacional de Ecología, p. 696.
- Ringuelet, R.A., R.H. Aramburu & A. Alonso de Aramburu.** 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Com. Inv. Cient., Prov. Bs. As., 602 pp.
- Roncero, V., E. Redondo, A. Gazquez & E. Duran.** 1990. Structural and ultrastructural differentiation of cell types in the gills of the Tecu. (*Tinca tinca*, L). *Anat. Histol. Embryol.* 19: 236-244.
- Segnini de Bravo, M. I., J. Medina, S. Marcano, A. Boada-Sucre & 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.* 44 (1): 51-57.
- 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 (consulta: junio de 2009).
- SPSS 11.0 for Windows, SPSS Inc.** 2001, Chicago, Illinois, USA.
- Velasco Santamaría, Y.M., W. Gomez Manrique & J.M. Calderón Bernal.** 2006. Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de Cachama Blanca (*Piaractus brachyomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Rev. Orinoquia* 10 (1): 64-70.
- Vigliano, F.A., N. Aleman, M.I. Quiroga & J.M. Nieto.** 2006. Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinean silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anat. Histol. Embriol.* 35: 76-83.
- Wandelaar Bonga, S.E. & J.C.A. van der Meij.** 1989. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis of the pavements and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cells Tissue Res.* 255: 235-243.
- Wandelaar Bonga, S.E., G. Flik, P.H.M. Balm & J.C.A. van der Meij.** 1990. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cells Tissue Res.* 259:575-585.
- Wilson, J.M., P. Laurent, B.L. Tufts, D.J. Benos, M. Donowitz, A.W. Vogl & D.J. Randall.** 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J. Exp. Biol.* 15:2279-2296.
- Woods, A. & C.R. Ellis.** 1994. Laboratory Histopathology. A Complete Reference Longman Group Limited. Londres, 96 pp.