

Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

Título de la Tesina:

“*Cnesterodon decemmaculatus* como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía”

Tribunal Examinador:

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Calificación:

Fecha:

Índice

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN:	4
1.1. OBJETIVO GENERAL:	6
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	7
2.2. RECOLECCIÓN DE PECES	8
2.3. CALIDAD DEL AGUA	9
2.4. ACTIVIDAD NATATORIA.....	9
2.5. ACETILCOLINESTERASA.....	9
2.6. ESTADO GENERAL DE SALUD DEL PEZ.....	10
2.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	10
2.8. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE BRANQUIAS.....	14
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1.CALIDAD DEL AGUA	15
3.2. ACTIVIDAD NATATORIA.....	17
3.3 ACETILCOLINESTERASA.....	19
3.4. ESTADO GENERAL DE LA SALUD DEL PEZ	22
3.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	23
3.5.1. <i>Hígado</i>	23
3.5.2. <i>Branquias</i>	25
3.5.3. <i>Piel</i>	28
3.5.4 <i>Índice histopatológico</i>	29
3.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE BRANQUIAS.....	30
4. CONCLUSIONES	33
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
6. AGRADECIMIENTOS	42



Resumen

La cuenca del Río Suquía (Córdoba, Argentina), se considerada un elemento clave del paisaje central de la provincia de Córdoba. Sus aguas corren a través de importantes ciudades y zonas urbanas, estando sujeta a un fuerte impacto antropogénico debido a que recibe contaminantes de diversas fuentes. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la calidad del agua de la cuenca del Río Suquía a través de la utilización de la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus*, como indicadora, analizando para ello la actividad natatoria, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, índices somáticos y características histológicas de hígado, branquia y piel, en individuos recolectados en sitios con diferente calidad ambiental. Esta última fue estimada a través de la aplicación de un índice de calidad del agua (ICA), que permitió evidenciar diferentes condiciones de calidad del agua entre los sitios muestreados. Todos los parámetros biológicos fueron evaluados en hembras adultas recolectadas en tres sitios, durante las estaciones hidrológicas seca y húmeda. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar las condiciones ambientales en la cuenca estudiada, confirmando el gradiente de calidad del agua a lo largo del curso y como la degradación del medio afecta a los individuos estudiados a través de los biomarcadores seleccionados a tal fin. La actividad natatoria y la actividad de la AChE fueron los biomarcadores que respondieron de manera fehaciente antes las diferentes calidades de agua que presentó el río Suquía, posicionando a Puente Cantón como el sitio más degradado.

1. Introducción.

Las actividades humanas han alterado en gran medida los ecosistemas de agua dulce en todo el mundo. En la actualidad se estima que más de 300 millones de toneladas de diversos compuestos son sintetizados cada año y liberados al agua (Kvesitadze et al., 2001). El resultado es una mezcla compleja de grandes cantidades de compuestos orgánicos e inorgánicos liberados en el medio ambiente acuático, provenientes de distintas fuentes tales como la actividad agrícola, la descarga de residuos industriales y desechos domésticos, entre otros (Nimptsch et al., 2005). Los cursos de agua han sido desde hace tiempo receptores directos o indirectos de los desechos que el hombre ha generado a partir de su propia actividad. El aumento en número y magnitud de los asentamientos urbanos, incrementó notablemente la cantidad de vertido y cargas de contaminantes en ellos. Como consecuencia, los sistemas de agua, disminuyen su capacidad auto-depuradora y se producen graves alteraciones en la calidad de agua afectando a la biota residente.

La cuenca del Río Suquía (Córdoba, Argentina), es considerada un elemento clave del paisaje central de la provincia de Córdoba. Sus aguas corren a través de importantes ciudades y zonas urbanas. Diversos antecedentes han demostrado que la cuenca presenta un marcado gradiente de calidad ambiental debido al impacto negativo causado por la presencia de importantes centros urbanos y las actividades antrópicas asociadas a ellos, recibiendo agentes contaminantes complejos de diferentes origen (Pesce & Wunderlin, 2000; Wunderlin et al., 2001; Monferrán et al., 2011; Merlo et al., 2004). La condición de la cuenca se agrava por tratarse de un sistema endorreico, donde la salida y depuración completa de contaminantes se dificulta por falta de drenaje. Esta baja tasa de renovación de agua tiene un efecto drástico sobre la biota residente, la cual responde con alteraciones a distintos niveles de organización biológica (Bistoni et al., 1999; Cazenave et al., 2005; Hued y Bistoni, 2005; Barchuk et al., 2009).

En su ambiente natural, los organismos manifiestan diversas respuestas ante los contaminantes, en un esfuerzo por desintoxicar su sistema y volver a su equilibrio homeostático. Esto involucra diferentes procesos biológicos y distintos niveles de organización. De esta manera, se define como biomarcador a cualquier respuesta biológica de un organismo, que permita evidenciar una desviación del estado normal del mismo (Van Gestel & Van Brummelen, et al 1996). Dichas respuestas se constituyen como útiles herramientas en las evaluaciones ecotoxicológicas.

Entre los organismos indicadores utilizados en la evaluación ecotoxicológica se destacan los peces. Estos responden al impacto de los disturbios ambientales a nivel molecular, tisular y/o



fisiológico (van der Oost et al., 2003), por lo que son considerados buenos bioindicadores de contaminación.

Una herramienta de suma relevancia en estudios ecotoxicológicos la constituye el comportamiento dado que proporciona una visión integradora, que refleja las condiciones bioquímicas y fisiológicas de los peces ante determinados eventos tóxicos (Scott & Sloman, 2004). En particular la actividad natatoria puede ser fácilmente cuantificada por medio de monitoreos, actuando así como indicadora de toxicidad en el medio ambiente (Kavitha & Rao, 2008). La interrupción de los patrones normales de actividad natatoria puede indicar alteraciones con importantes consecuencias negativas para la supervivencia del individuo y, finalmente, para la persistencia de las poblaciones de peces (De la Torre et al., 2005; Menéndez-Helman et al., 2015, 2012).

Otra manera de evaluar los efectos tóxicos sobre los organismos es a través de cambios en la actividad de enzimas involucradas en diferentes procesos bioquímicos. Una de las más utilizadas es la acetilcolinesterasa (AChE), una esterasa que participa en distintas vías neurofisiológicas (Thompson, 1999). La AChE está ampliamente distribuida en animales vertebrados e invertebrados. Se caracteriza por ser un biomarcador específico y útil para determinar si los organismos han estado expuestos a insecticidas organofosforados y carbamatos dado que la misma es inhibida por la acción de estas sustancias. Al ser inhibida se produce la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, con la consecuente sobre-estimulación de la membrana postsináptica, proceso que puede conducir a la muerte de los organismos, si persiste en el tiempo.

El efecto tóxico de los agentes contaminantes puede ser detectado de manera temprana a nivel molecular, celular o tisular, antes que cambios significativos sean identificados en el comportamiento y/o aspecto externo del pez. Al ser expuestos a sustancias tóxicas, los individuos pueden manifestar una serie de lesiones en diferentes órganos tales como branquias, piel, hígado, riñón, entre otros, siendo sus tejidos apropiados para el examen histológico para determinar los efectos de las alteraciones ambientales (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994). El estudio de las características histológicas es por tanto un parámetro sensible y crucial en la determinación de los cambios celulares que pueden ocurrir ante la exposición a tóxicos (Abdel-Warith., et al 2011). Siendo una metodología ampliamente utilizada ya que las lesiones aparecen como respuestas a mediano plazo ante condiciones estresantes subletales (Johnon et al., 1993; Cengiz & Unlu, 2006). En particular, las branquias se consideran órganos sensibles a la contaminación, ya que presentan grandes superficies de epitelio en contacto directo y permanente con el medio acuático. En ellas, la estimación de índices morfométricos a través de la medición de ciertas dimensiones resultan buenos indicadores de alteraciones fisiológicas relacionadas a alteraciones en el intercambio gaseoso (Nero et al., 2006a, b). Por otra parte, el hígado



se encarga de biotransformar y excretar xenobióticos (Bonilla Lizarazu et al. 2008). La piel funciona como un órgano de protección que al estar en contacto directo con el medio acuático, forma una importante interfase entre los tejidos internos y el ambiente, volviéndola susceptible a posibles estresores ambientales (Goede & Barton, 1990)

Entre las especies utilizadas como modelos ecotoxicológicos se destaca *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae, Cyprinodontiforme). Se trata de una de las especies recomendadas para la realización de bioensayos de toxicidad por IRAM (2008). Este pez es endémico de América Neotropical, abarcando su distribución, una extensa área que comprende tres países: Argentina, Uruguay y Paraguay (Ringuelet, 1967). En Argentina presenta una alta densidad en ríos y arroyos de la región pampeana de Argentina (Liotta 2005). En los sistemas acuáticos de la región, *C. decemmaculatus* es una especie ubicua que presenta gran tolerancia a ambientes alterados por la contaminación (Bistoni et al., 1999), lo que se evidencia en la alta abundancia que presenta en los ensambles de peces de ambientes alterados y/o degradados (Bistoni et al, 1999; Scasso et al, 2001; Hued & Bistoni, 2005). En los últimos años se ha incrementado el número de grupos de trabajos que lo utilizan en sus investigaciones y que la proponen como organismo útil para biomonitoreo (Ferrari, 2017).

Si bien los antecedentes de alteraciones ambientales en la cuenca del Río Suquía se remontan a dos décadas atrás hasta la actualidad (Bistoni et al., 1999 & Rautenberg et al., 2015) y que es un hecho altamente comprobado que la misma se encuentra en un estado alarmante de degradación continua, los estudios sobre especies indicadoras en la cuenca siguen siendo escasos y se restringen tan solo a *Jenynsia multidentata* y *Gambusia affinis*, por lo tanto no hay estudios suficientes que tiendan a evaluar cambios en especies indicadoras particulares que sean habitantes nativas de la cuenca. Por ello y de acuerdo a lo expuesto, en el presente trabajo se plantearon como objetivos:

Objetivo general.

- Evaluar la calidad ambiental de la cuenca del Río Suquía a través de la utilización de la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus* como indicadora, analizando para ello la actividad natatoria, actividad de la acetilcolinesterasa e histología en individuos recolectados en sitios con diferente calidad ambiental.



Objetivos específicos.

- Determinar la calidad del agua en cada sitio de muestreo a través de la medición de parámetros físico-químicos.
- Evaluar cambios en la actividad natatoria de la especie *C. decemmaculatus* como respuesta a las variaciones en la calidad ambiental de la cuenca del Río Suquía.
- Determinar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en músculo y cerebro de *C. decemmaculatus*.
- Establecer el estado de salud general de *C. decemmaculatus* en tres sitios de la cuenca del Río Suquía por medio del uso de índices somáticos.
- Analizar cambios histológicos en branquias, hígado y piel de los individuos recolectados.
- Determinar el nivel de daño tisular mediante la aplicación de índices histopatológicos semicuantitativos.
- Analizar las variaciones morfométricas en branquias como respuesta a los cambios en la calidad del agua.

2. Materiales y métodos.

2.1 Área de estudio.

La cuenca del Río Suquía se ubica al centro y noreste de la Provincia de Córdoba. Es uno de los cursos más importantes de la Provincia. Las aguas de este sistema endorreico fluyen en sentido oeste-este, en concordancia con el gradiente altitudinal. En ella convergen varios ríos y arroyos provenientes de las Sierras Grandes que desembocan en el Dique San Roque, para finalizar en la Laguna Mar Chiquita. Ocupa una superficie de 7.700 km, de los cuales 900 km corresponden al área de drenaje de la Ciudad de Córdoba y representa la cuenca alta-media (Fig. 1). Se extiende en la región semiárida con precipitaciones que varían entre 700 y 900 mm.

El muestreo se realizó en tres sitios ubicados a lo largo de la cuenca alta-media del Río Suquía, durante la estación seca (época de caudales bajos: abril a septiembre) y otro en la húmeda (época de caudales altos: octubre a marzo). La selección de los sitios coincidió con el gradiente de contaminación registrado en estudios anteriores (Bistoni et al., 1999; Pesce & Wunderlin, 2000; Hued y Bistoni, 2005). Ellos son: 1- Río Yuspe, de condiciones *quasi* prístinas, en la zona identificada como Puente Zuviría, en la ciudad de Cosquín (31°14'21,95"S/64°31'15,01"O) 2- Localidad de Casabamba, 15 km

Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

antes de la ciudad de Córdoba (31°20'44,63"S/64°24'22,04"O) y 3- Puente Cantón, en pleno centro de dicha ciudad (31°23'47,20"S/ 64°12'8,65"O) .

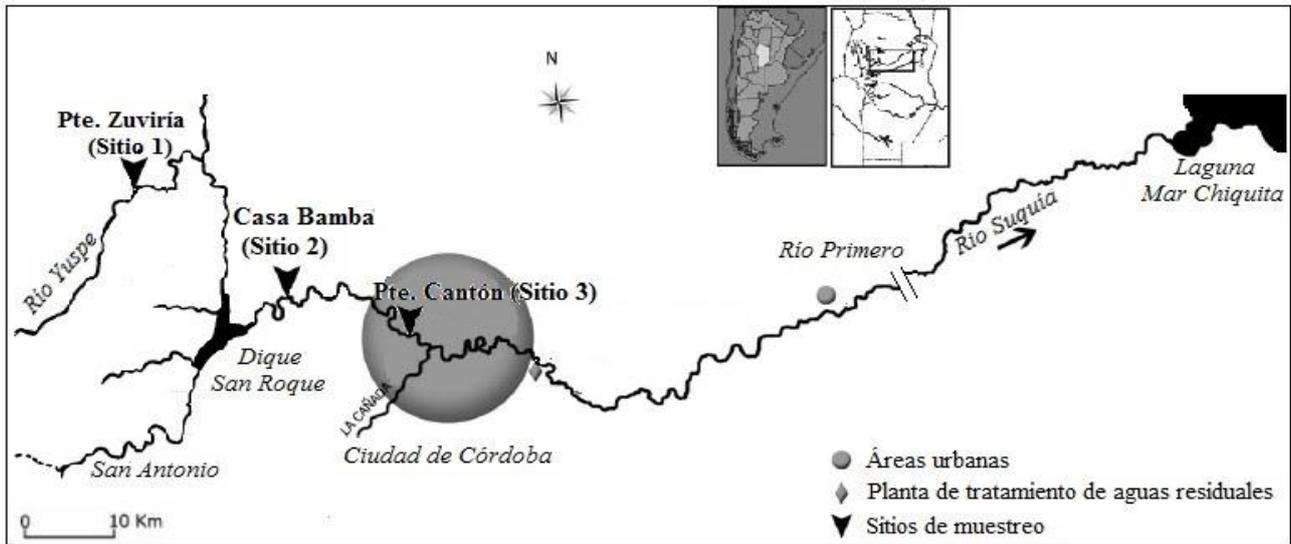


Figura 1. Área de estudio y localización de los sitios de muestreo a lo largo de la cuenca alta-media del Río Suquia Córdoba, Argentina (Tomado de Merlo et al., 2011).

2.2 Recolección de peces.

En cada uno de los sitios y estación hidrológica de muestreo, se recolectaron 15 hembras adultas de *C. decemmaculatus* (Fig. 2), utilizando para ello redes de mano. Posteriormente a la captura, los peces fueron trasladados vivos al laboratorio en tanques de 20 L, para la realización de los análisis que se detallan a continuación.



Figura 2. Hembra adulta de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842).

2.3 Calidad del agua.

En cada uno de los sitios mencionados, se tomaron muestras de agua durante la estación húmeda y seca para la medición de los siguientes parámetros físico-químicos: temperatura (°C), nitritos (mg/L), nitratos (mg/L), amonio (ppm), alcalinidad (mg/L), dureza (mg/L), y oxígeno disuelto (mg/L). Las técnicas utilizadas son estándar (APHA, 1998). A partir de estas variables, se calculó el Índice de Calidad del agua (ICA) siguiendo a Pesce & Wunderlin (2000). Este índice arroja un valor adimensional que varía entre 0 y 100%, correspondiendo el 100% a la mejor calidad de agua. Por otra parte, valores de ICA menores a 50 indican calidad del agua incompatible con la vida (Hued et al., 2010).

2.4 Actividad natatoria.

En el laboratorio, cada pez fue transferido a un acuario individual (30 cm de ancho x 9 cm de profundidad x 25 cm de alto), conteniendo 4L de agua dechlorada. Dos minutos después de introducido en la pecera, la actividad natatoria de cada individuo fue continuamente filmada durante 10 minutos. La filmación obtenida al final de cada ensayo (una por individuo) fue analizada por medio del software con el fin de determinar la distancia recorrida (m), la velocidad promedio ($m \cdot s^{-1}$), y el tiempo inmóvil (s), estimado en nuestro trabajo como la proporción de veces que un pez permanece sin movimiento.

2.5 Acetilcolinesterasa.

Para la medición de AChE, tanto el cerebro como el músculo esquelético de cada individuo fueron homogenizados en buffer fosfato 0.1 M pH 8 (20 mg de tejido por ml de buffer). Posteriormente, el homogenato obtenido para cada tejido fue centrifugado a 10000 g durante 15 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a -80 ° C, hasta la medición de la actividad enzimática, la cual fue determinada por el método colorimétrico propuesto por Ellman et al. (1961). Cada muestra se midió por triplicado y la actividad se calculó en función del contenido de proteínas (Bradford 1976).

2.6 Estado general de salud del pez.

Una vez finalizada la filmación, cada individuo fue medido con un calibre y pesado con una balanza....para evaluar su estado sanitario, registrándose su longitud estándar (LE) y peso total (P_T: peso total). Con estas variables se estimó el Factor de Condición de Fulton ($K = [P_T/LE^3] \cdot 100000$) (Ricker, 1975) que permite estimar el estado de salud general del individuo. Posteriormente los ejemplares fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron sus órganos (hígado, branquias y piel) para su posterior análisis histológico. Además se determinó el índice Hepatosomático (IHS = $[P_H/P_T] \cdot 100\%$) (Strange, 1996) el cual relaciona el peso del hígado (P_H) con el peso total del pez (P_T).

2.7 Análisis histológico.

Branquias, hígado y piel de cada hembra, fueron fijados en solución amortiguadora de formaldehído al 10% V/V y procesados a través de técnicas histológicas de rutina. Brevemente, cada tejido fue deshidratado mediante una serie graduada de etanol, embebida en parafina sólida, cortada a 4-6 micrones de espesor y teñida con hematoxilina y eosina (H&E). Los preparados obtenidos se analizaron bajo microscopio óptico (Olympus CX-3) conectado a una cámara digital (Moticam[®]), la cual fue utilizada para la obtención de imágenes para análisis morfométricos uterinos.

Para el análisis histológico en branquias, se seleccionaron al azar 5 laminillas primarias por individuo. En cada sección media de la laminilla primaria se observaron 10 laminillas secundarias, 5 de cada lado de la lámina primaria. Para determinar el porcentaje de filamentos afectados, se procedió a dividir el número de laminillas secundarias que poseían una alteración en particular por el número total de laminillas observadas. Para la evaluación de las alteraciones histológicas en hígado, se seleccionaron 5 áreas (10 μm^2) al azar por corte por individuo, a una magnificación de 10x, evitando de esta manera la posible superposición de las mismas. Dentro de cada área, a una magnificación de 40x, se contabilizaron las alteraciones histológicas y se estimó el porcentaje de superficie ocupada por cada uno de ellas. En el caso de la piel, se realizó un análisis descriptivo de las diferentes patologías correspondientes a dicho órgano. Para ello, se seleccionaron 5 áreas al azar por individuo.

Para caracterizar los daños histológicos de cada tejido y estimar la severidad de las alteraciones observadas se aplicaron los índices semicuantitativos propuestos por Bernet et al., (1999) y modificados posteriormente por Maggioni et al., (2012) y Rautenberg et al., (2015). Dichos índices resultan de gran utilidad ya que permiten una cuantificación estandarizada que posibilita la comparación entre diferentes estudios donde hayan sido aplicados (Bernet et al., 1999). La estimación



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

de estos índices se basa en dos elementos fundamentales: por un lado el *factor de importancia* patológica de cada lesión (*W*), que permite inferir como se ve afecto el funcionamiento del órgano si el pez estuviera vivo, y la capacidad de éste para sobrevivir. Por otro lado el *valor de ocurrencia* (*a*), corresponde a un atributo numérico que refleja el grado de extensión de la alteración en el órgano estudiado. Además, los cambios histopatológicos referidos al funcionamiento de un órgano se clasificaron en cuatro *Patrones de reacción* (*Pr*), tal como lo define Bernet et al. (1999). Cada patrón de reacción incluye alteraciones referidas al funcionamiento de un órgano:

Disturbios Circulatorios -Pr1: condiciones patológicas de la sangre (Ej.: congestión vascular, hemorragia, aneurisma).

Cambios Regresivos - Pr2: proceso que finaliza en una reducción funcional o pérdida del órgano (Ej.: alteraciones en la arquitectura y estructura de los tejidos, necrosis).

Cambios Progresivos -Pr3: proceso dirigido a aumentar la actividad de células y/o tejidos (Ej.: hipertrofia e hiperplasia).

Inflamación -Pr4: procesos inflamatorios, generalmente, están asociado a alteraciones que pertenecen a otros patrones de reacción (Ej.: edema, inflamación leucocitaria. Etc.).

Estos patrones, juntos a sus factores de importancia y su correspondiente alteración, se detallan en la tabla 1 y 2. En ella se aprecia que el factor de importancia para cada alteración histológica, puede tomar diferentes valores dependiendo de la importancia patológica: relevancia mínima ($W=1$, lesión reversible cuando la exposición al tóxico finaliza y las condiciones del calidad del medio mejoran, pudiendo desaparecer y recuperar el órgano su estructura normal), moderada ($W=2$, lesión reversible en la mayoría de los casos, si el tóxico es neutralizado) o bien, alta relevancia ($W=3$, lesión irreversible, si el estrés ambiental continua conduce a daños permanentes y pérdida parcial o total de las funciones de órgano). En la tabla 3 se detallan los *valores de ocurrencia* que se asignó a cada lesión, dependiendo de su grado y extensión, pudiendo tomar valores de 0 a 8. De acuerdo a lo expresado, se obtuvieron los siguientes índices histopatológicos:

Índice histopatológico de reacción de un órgano ($IH_{org.pr}$): permite cuantificar la extensión y severidad de las alteraciones registradas en un patrón de reacción determinado en los órganos estudios:

$$IH_{org.pr.alt} = \sum (a_{org.pr.alt} \times W_{org.pr.lt})$$

Dónde *org* (órgano) y *pr* (patrón de reacción) son constantes; *alt*: alteración, *a*: valor de ocurrencia y *W*: factor de importancia.



Índice histopatológico por órgano (IH_{org}): permite cuantificar el grado de lesión de cada órgano. De esta manera se calculó para cada individuo un índice para hígado (IH_{hig}) y otro para branquias (IH_{bra}):

$$IH_{org}: \sum IH_{org,pr}$$

Índice histopatológico total (IH_{total}): representa el estado general del pez al abarcar las lesiones registradas para todos los órganos estudiados:

$$IH_{total}: \sum IH_{hig} + IH_{bra}$$

Con el fin de determinar el nivel de daño de cada órgano y poder compararlos, se procedió a calcular la proporción de alteraciones en cada uno de ellos. Para ello se relativizó el valor individual de cada uno de los índices descriptos con respecto al máximo valor que puede alcanzar.

Tabla 1. Factor de importancia (W) asignado a cada alteración histológica en branquia.

Patrones de reacción	Alteraciones histológicas en branquias	W
Disturbios Circulatorios	Congestión vascular de canales marginales	1
	Aneurisma lamelar	1
Cambios Regresivos	Lifting de células pavimentosas	1
	Fusión del extremo distal de laminillas secundarias	2
	Acortamiento de laminillas secundarias	2
	Necrosis	3
	Hipertrofia de células de cloro	1
Cambios Progresivos	Hipertrofia de células pavimentosas	1
	Proliferación de células mucosa	2
	Proliferación de células de cloro	2
Cambios Inflamatorios	Hiperplasia de células pavimentosas	2
	Infiltración leucocitaria	2

Tabla 2. Factor de importancia (W) asignado a cada alteración histológica en hígado.



Patrones de reacción	Alteraciones histológicas en hígado	W
Disturbios Circulares	Hemorragia	1
	Dilatación de sinusoides	1
	Congestión vascular	1
Cambios Regresivos	Degeneración hidrópica	1
	Metamorfosis grasa	2
	Picnosis de células hepáticas	2
	Fibrosis	3
	Necrosis	3
Cambios Progresivos	Hiperplasia	2
	Hipertrofia	2
Cambios Inflamatorios	Infiltración leucocitaria	2

Tabla 3. Valor de ocurrencia asignado en relación al porcentaje de daño en branquias y en hígado.

Referencias: 0: nula, 2: baja, 4: media, 6: moderada, 8: severa.

Alteraciones histológicas	Valor de Ocurrencia				
	0	2	4	6	8
Necrosis					
Acortamiento de laminillas	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
Hiperplasia de cel. pavimentosas					
Congestión vascular					
Aneurisma lamelar					
Lifting de cel.pavimentosas	0-5%	5,1-15%	15,1-25%	25,1-50%	>50%
Fusión de la punta de laminilla 2 ^{ria} vecinas					
Hipertrofia de cel. de cloro, moco y pravimentosas					
Proliferación de cel.cloro y moco					
Dilatación de Sinusoides					
Congestión Vascular	0-5%	5,1-25%	25,1-50%	50,1-75%	>75%
Degeneración Hidrópica					
Metamorfosis Grasa	0-5%	5,1-15%	15,1-25%	25,1-50%	>50%
Hemorragia					
Necrosis	0-1%	1,1-10%	10,1-20%	20,1-30%	>30%
Picnosis					



2.8 Análisis morfométrico de branquias.

Se tomaron fotografías de los preparados histológicos de branquias sobre los mismos filamentos seleccionados para el análisis histológico. Las imágenes fueron analizadas mediante el uso del software Image J Versión 1.3 (Rasband, 2004), siguiendo los criterios propuestos por Nero et al. (2006a). Para ello se midieron 10 laminillas secundarias de cada una de las 5 laminillas primarias tomadas al azar por individuo. Los parámetros morfométricos medidos fueron: longitud de las laminillas secundarias (LLS), ancho de las laminillas secundarias (ALS), distancia interlamelar (DI) y ancho de epitelio basal (AEB) (Fig. 3). Para medir ALS y DI, se tomaron tres mediciones en cada laminilla secundaria (en la base, centro y extremo distal), mientras que para el AEB, las tres mediciones se hicieron a lo largo de la sección de la laminilla primaria.

A partir de estos parámetros se calculó el porcentaje de laminillas secundarias disponibles para el intercambio gaseoso (%DIG₁), debido a cambios por hiperplasia, hipertrofia o lifting de las células pavimentosas que se encuentran sobre los filamentos branquiales, por medio de la siguiente fórmula:

$$\%DIG_1 = (100 * \text{Promedio LLS}) / (\text{Promedio AEB} + \text{Promedio LLS})$$

Además, se emplearon otras dos fórmulas propuestas por Maggioni et al. (2012), para brindar una información más completa que la que otorga el índice propuesto por Nero et al., (2006a) por sí solo. Estas son: %DIG_a que tiene en cuenta el aumento del ancho de las laminillas respiratorias debido a la disminución de la distancia interlamelar causada por lifting, hipertrofia o hiperplasia de células pavimentosas y %DIG_t que engloba tanto el largo como el ancho de las laminillas secundarias, como se aprecia en las siguientes ecuaciones:

$$\%DIG_a = 100 * (\text{promedio ID} / (\text{promedio ALS} + \text{promedio DI})).$$

$$\%DIG_t = (\%DIG_1 * \%DIG_a) / 100$$

Para todos los casos los valores más bajos de estos índices, indican menor proporción de epitelio respiratorio disponible para realizar el intercambio gaseoso.



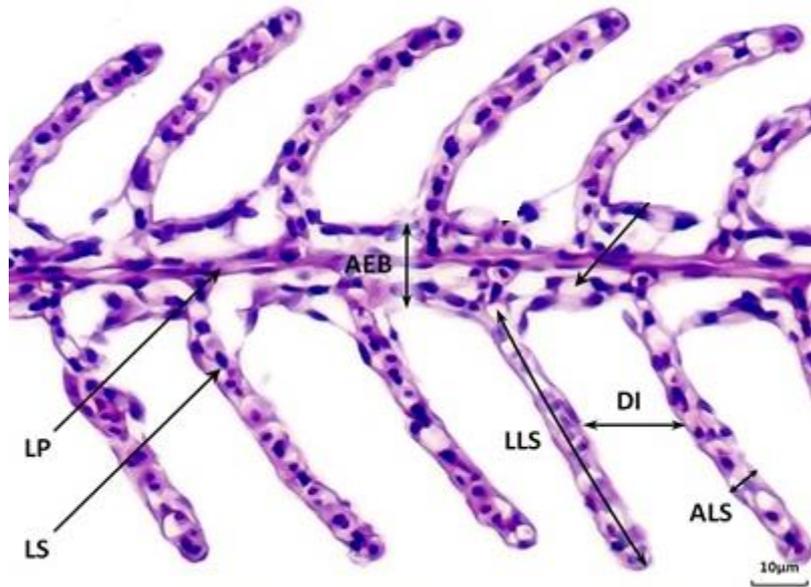


Figura 3. Parámetros morfológicos medidos en branquias de peces. LLS: longitud de las laminilla secundaria, ALS: ancho de la laminilla secundaria, DI: distancia interlamelar AEB: ancho del epitelio basal, LP: laminilla primaria, LS:laminilla secundaria. H&E 400X. (Rautenberg et al., 2014).

2.9 Análisis estadístico.

La distribución de los datos se analizó con el test Shapiro-Wilks (Sokal & Rohlf, 1999) y el supuesto de homocedasticidad a través del test Levene. Se aplicó análisis de variancia (ANOVA) seguido del test *a posteriori* de Tukey. Cuando los residuos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se aplicó el análisis de la variancia no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test *a posteriori* de Dunn, para determinar posibles diferencias entre sitios y/o estaciones de muestreo. El nivel de significancia que se utilizó fue de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados por medio del software InfoStat (Di Rienzo et al. 2002).

3. Resultados y Discusión.

3.1 Calidad del agua.

Los valores obtenidos a través de las variables físico-químico (Tabla 4), demostraron variaciones en el índice de calidad de agua (ICA) en los sitios de muestreo (Fig. 4), lo cual indica un desmejoramiento de la calidad del agua. En la zona del Puente Zuviría, sobre el Río Yuspe,

seleccionado en este trabajo por sus condiciones *quasi* prístinas, los valores de ICA fueron los más altos obtenidos, 80% en la estación seca y 79% en la estación húmeda. En la localidad de Casabamba, se registró un valor promedio de 78,18% y del 67% en la estación hidrológica seca. Por su parte, Puente Cantón, ubicado en pleno centro de dicha ciudad, presentó el menor valor de ICA (68,18%), tanto en la estación hidrológica seca como en la húmeda. Es de destacar que la calidad del agua en este tramo, ubicado en el centro de la ciudad de Córdoba, se mantiene muy baja durante todo el año, sin manifestar variaciones naturales propias de cada estación hidrológica. Si se tiene en cuenta que valores del ICA cercanos al 50% son señalados como incompatibles con la vida acuática (Hued et al 2010), este último sitio ofrece a los organismos que habitan en él un ambiente alterado. La disminución de la calidad del agua en este sector es atribuida a las actividades antrópicas, tales como vertidos de efluentes cloacales, actividades industriales y agrícolas, etc.

Tabla 4. Valores obtenidos de las variables físico-químicas registradas para cada sitio de muestreo durante la estación seca y húmeda sobre la cuenca del Río Suquía.

Estación hidrológica	Sitio	Amonio (ppm)	Nitritos (mg/L)	Dureza (mg/L)	Temperatura (C°)	Oxígeno disuelto (mg/L)
Seca	Puente Zuviría	0,5	<0,05	130	25°	11
	Casabamba	0,5	<0,05	250	19,5°	7,5
	Punete Cantón	0,5	<0,05	625	18°	12,5
Húmeda	Puente Zuviría	0,1	<0,05	70	17°	8
	Casabamba	0,3	<0,05	50	18°	9
	Punete Cantón	0,3	<0,05	180	16°	8

Aunque el aporte adicional de las lluvias durante la estación húmeda, puede aumentar el caudal y diluir las sustancias tóxicas presentes, por escorrentía también se arrastran otros compuestos elevando su concentración en el río (Maggioni et al., 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que en Puente Cantón, a pesar del aumento de caudal en la estación húmeda que provoca la dilución de los factores físicos y químicos que conforman el ICA, la calidad del agua no mejora.



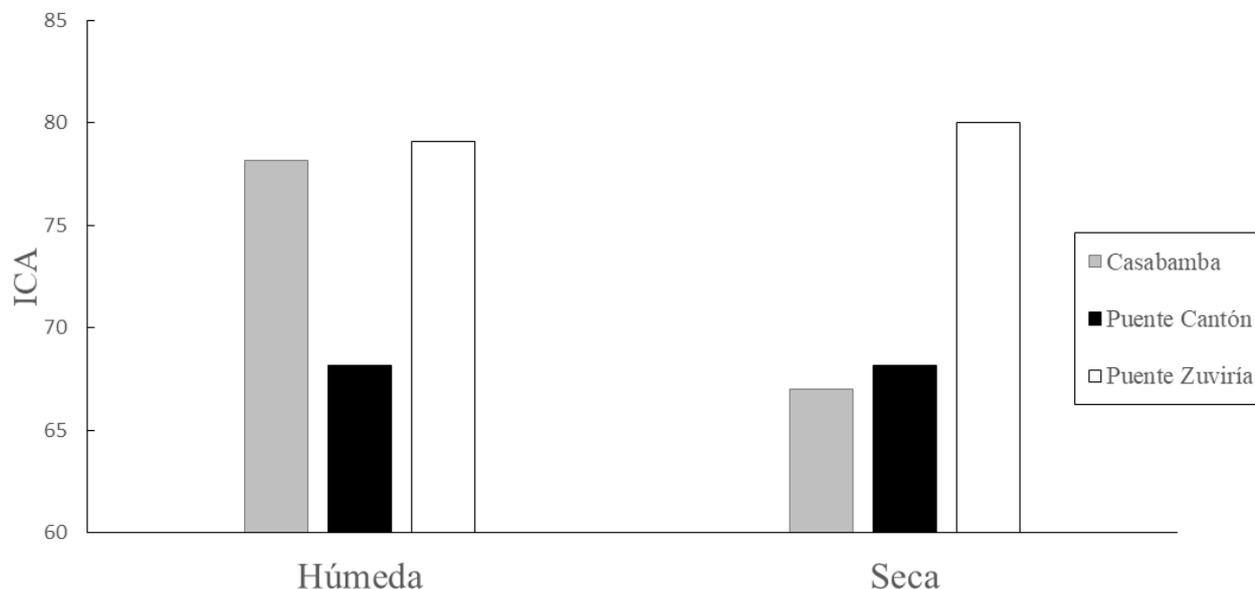


Figura 4. Variación del ICA (%) para cada sitio de muestreo durante la estación seca y húmeda sobre la cuenca del Río Suquía.

3.2 Actividad natatoria.

El análisis de la actividad natatoria de los peces brinda herramientas útiles para estimar los efectos subletales de las alteraciones en la calidad del agua debido a su importancia sobre la supervivencia, dado que los parámetros comportamentales son el reflejo de procesos fisiológicos internos y por ende se constituyen como variables integradoras. Un adecuado comportamiento animal permite que el individuo lleve a cabo conductas que aseguren su alimentación, reproducción y huida de posibles depredadores, y de esta manera sobrevivir en sus ambientes naturales (Foster et al., 2001; Khallaf et al., 2003).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha registrado que los valores de velocidad promedio normales de *C. decemmaculatus* varían entre 0,01 y 0,03 m/s (Bonifacio et al., 2013). En el presente trabajo los valores registrados de este parámetro estuvieron dentro de los rangos normales, si bien experimentaron variaciones entre los sitios estudiados. Para la estación seca se registró que la velocidad se diferenció significativamente en cada uno de los sitios, donde se destaca que los individuos provenientes de Puente Cantón mostraron los valores más bajos de velocidad promedio durante la estación seca (Fig. 5).



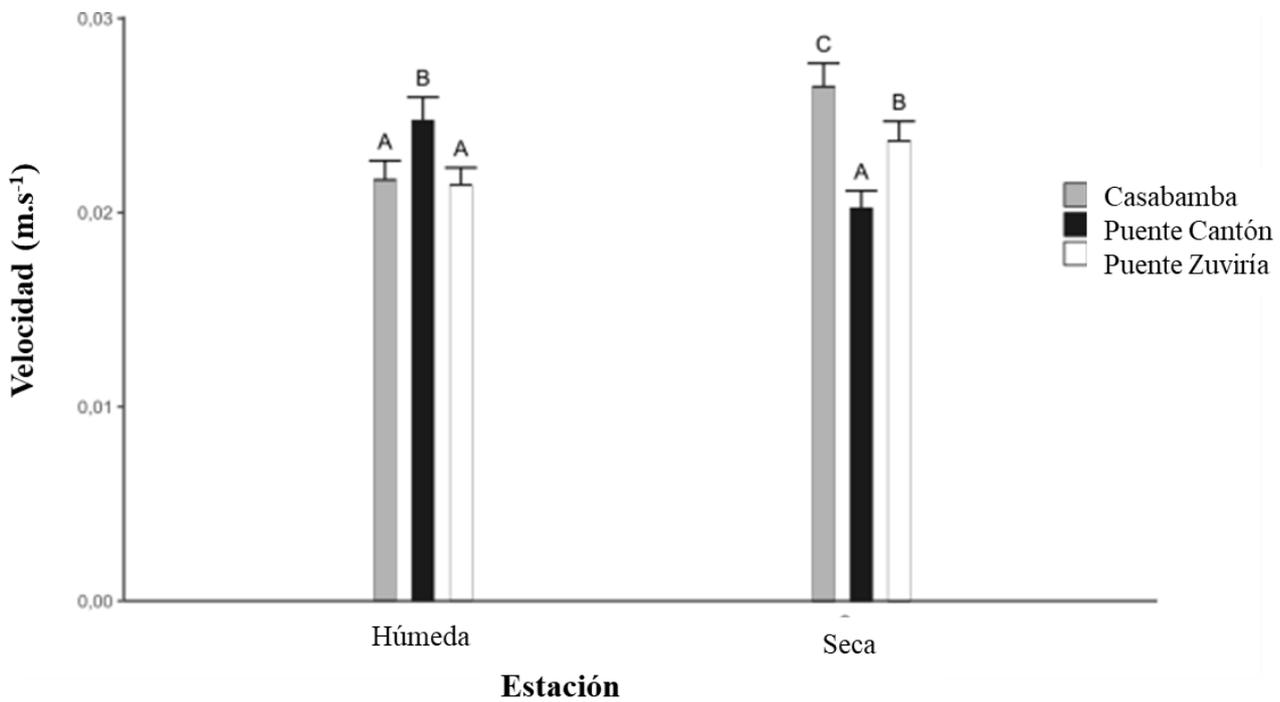


Figura 5. Velocidad promedio (m.s^{-1}) en hembra adulta de *C. decemmaculatus* recolectados en la cuenca del Río Suquía. Los valores corresponden a cada sitio y estación hidrológica muestreadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

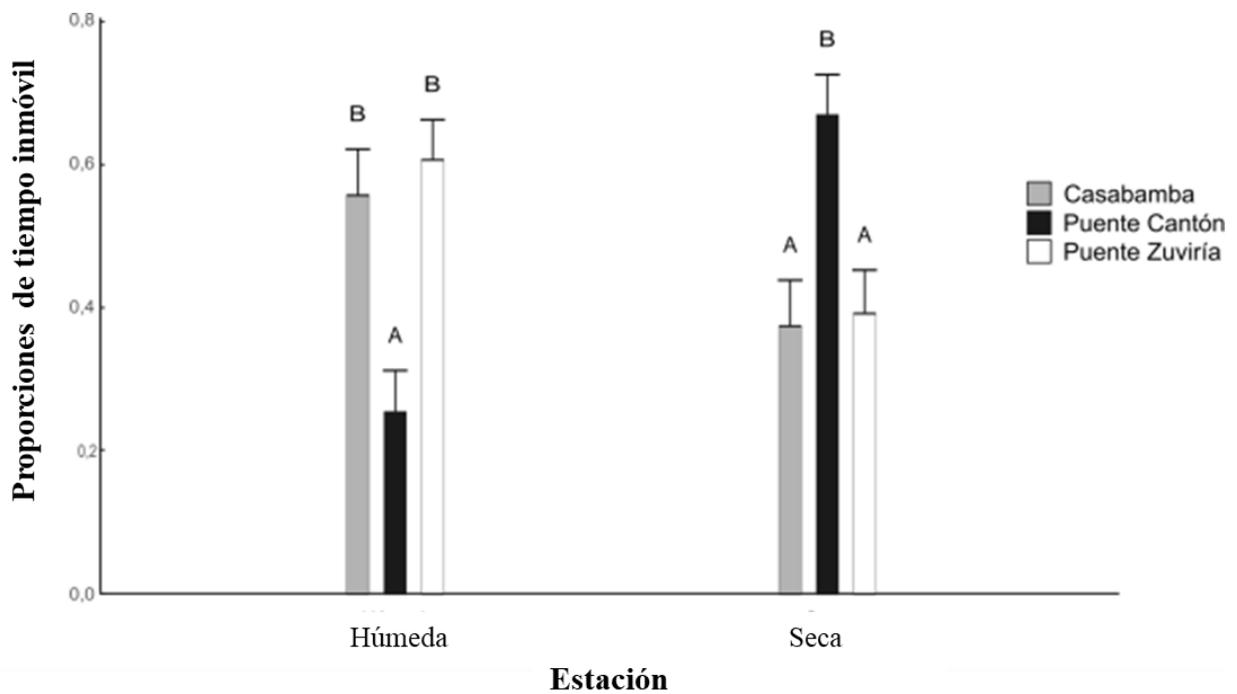


Figura 6: Proporción de tiempo inmóvil (s) en de hembra adulta de *C. decemmaculatus* recolectados en la cuenca del Río Suquía. Los valores corresponden a cada sitio y estación hidrológica muestreadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,5$).



Por otra parte, también los peces provenientes de Puente Cantón se diferenciaron significativamente, evidenciando un mayor tiempo de inmovilidad (Fig. 6). De esta manera los cambios registrados por ambas variables, demuestran variaciones en la calidad del agua, lo que se ve reflejado por una actividad natatoria disminuida en los peces que habitan el tramo de Puente Cantón. Esto coincide también con los resultados obtenidos para acetilcolinesterasa que serán discutidos a continuación.

3.3 Acetilcolinesterasa.

La actividad de la AChE es de suma relevancia para diversas funciones fisiológicas relacionadas a la capacidad locomotora, huida de los depredadores, localización de presas, orientación, alimentación, el patrón de distribución espacial en su hábitat y las interacciones sociales (Bradbury et al., 2008).

El principal papel fisiológico de la AChE consiste en la hidrólisis de la acetilcolina, neurotransmisor que participa en la transmisión del impulso nervioso tanto de vertebrados como de invertebrados (Menéndez-Helman et al., 2014). Se ha constituido como un biomarcador sensible para carbamatos y organofosforados (OPs). Los carbamatos provocan la inhibición reversible de la AChE, mientras que los OPs inducen la inhibición irreversible de la misma (Thompson, 1999). Dicha inhibición de la actividad de la AChE conduce a una acumulación de acetilcolina en el sistema sináptico y por lo tanto a la sobre estimulación de la membrana postsináptica. Por esta razón estos contaminantes son conocidos como perturbadores de las sustancias colinérgicas, ya que se unen al sitio catalítico de la enzima y evitan así la activación de la acetilcolina. En caso extremo, este proceso puede culminar con el desarrollo de un colapso cardiorrespiratorio que puede ocasionar la muerte (Menéndez-Helman et al., 2014).

Varios estudios han indicado que la AChE de cerebro y músculo es sensible, además de los carbamatos y los OPs, a otros contaminantes, tales como metales pesados, piretroides y herbicidas (Kumar et al., 2009, Salbego et al., 2010, Richetti et al., 2011). En la cuenca del Río Suquía han sido registrados pesticidas tales como atrazina, acetoclor, α -cipermetrina, clorpirifos, α -endosulfán, β -endosulfán, endosulfan sulfato. Además en sedimento han sido registrados α -clordano, γ -clordano, endrin y α -endosulfán, en las misma estaciones hidrológicas, consideradas en este trabajo (Rauntenberg et al., 2015; Maggioni et al., 2012).



A continuación se muestran solo los resultados obtenidos para los sitios de Casabamba y Puente Cantón, dado que las muestras correspondientes a los individuos de Puente Zuviría fueron extraviadas en una mudanza del material guardado en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, tarea ajena a nuestro grupo de trabajo.

La actividad de la AChE en músculo varió significativamente, mostrando los valores más bajos en Puente Cantón, durante la estación hidrológica seca (Fig. 7). Por otra parte, la actividad de esta enzima en cerebro no se diferenció entre sitios ni entre estaciones hidrológicas (Fig 8).

El tramo del curso en Puente Cantón se encuentra en plena ciudad de Córdoba, recibiendo la escorrentía de dicha ciudad, sumado a la contaminación proveniente del parque automotor (Zambrano, 2016). Teniendo en cuenta esta situación, la disminución de la actividad de la AChE reflejaría la exposición de los individuos a sustancias de diversa naturaleza química como las registradas y mencionadas anteriormente para la cuenca del Río Suquía, las cuales ingresan al sistema acuático pudiendo provocar la inhibición de esta enzima y las variaciones comportamentales observadas en el presente trabajo. La disminución del comportamiento locomotor podría relacionarse con la inhibición de la actividad de la AChE debida al estrés tóxico. Lo expuesto coincide con Kavitha et al (2008), quienes observaron que una disminución de la actividad natatoria en peces se relacionó de manera directa con la inhibición de la AChE. Por otra parte, los marcados efectos registrados en la estación seca se deberían al aumento de la concentración de contaminantes debido a la disminución del caudal del río en esta estación hidrológica, lo cual conlleva a un desmejoramiento en la calidad del agua, tal como lo demostró el menor valor del ICA, sumado al abanico de sustancias que han sido registradas en este tramo del río en trabajos anteriores al presente.



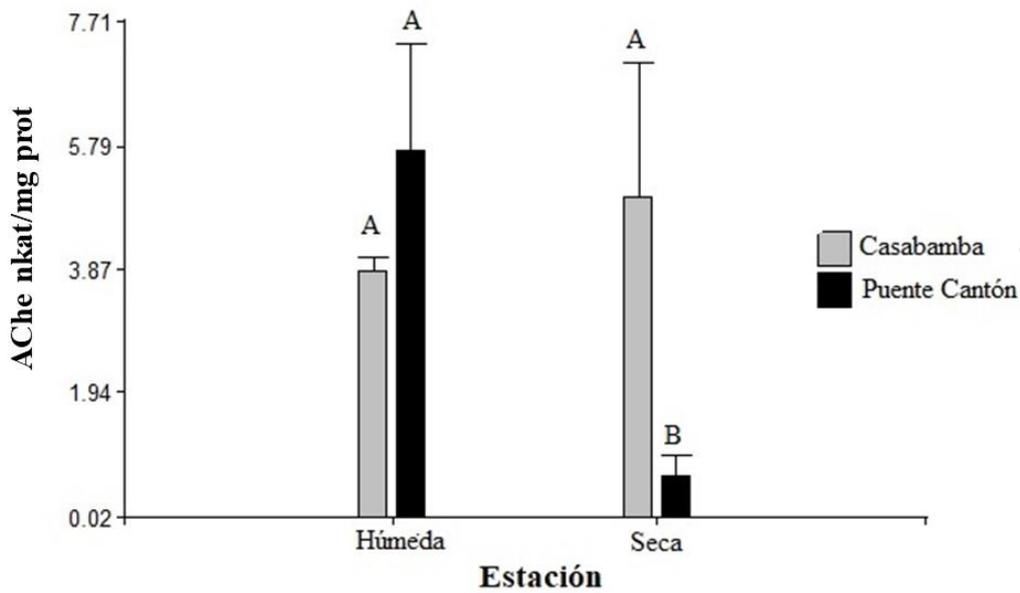


Figura 7. Actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE, nkat/mg prot) en músculo de hembras adultas de *C. decemmaculatus* en cada sitio y estación hidrológica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

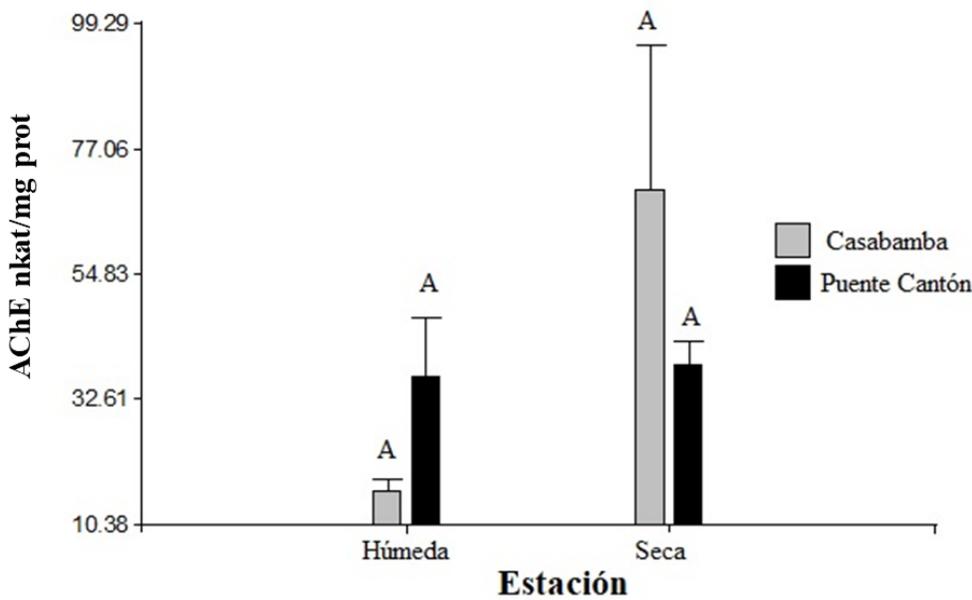


Figura 8. Actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE, nkat/mg prot) en cerebro de hembras adultas de *C. decemmaculatus* en cada sitio y estación hidrológica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.4 Estado general de salud del pez.

Los índices de condición somática en peces, brindan información indirecta sobre el crecimiento, madurez, reproducción y estado de salud de las poblaciones (Arismendi et al., 2011). El factor de condición de Fulton (K) se emplea para comparar el estado de salud de un pez o una población, considerando que los peces de mayor peso a una determinada longitud, presentan una mejor condición de salud. Su valor puede variar dependiendo de la disponibilidad de alimento, estacionalidad, estado reproductivo y la interrelación entre estos factores (Froese, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos el K varió entre los sitios relevados en la cuenca como así también entre las estaciones hidrológicas, no habiendo interacción entre ambos factores. El valor medio de K en la estación seca fue el más alto ($1,96 \pm 0,27$). El relevamiento llevado a cabo en la estación seca se realizó durante el mes de Octubre, que corresponde a la época reproductiva temprana, donde las hembras poseen mayores reservas energéticas para hacer frente al evento gestacional (Zambrano, 2016). Para hacer frente a los procesos de gestación, han acumulado reservas en los meses anteriores. Por otra parte el menor valor registrado en la estación húmeda ($1,63 \pm 0,38$) responde al período post-reproductivo donde las hembras ya han realizado el aporte energético a la progenie.

De los valores promedio de K obtenidos para cada sitio, el más bajo correspondió a Puente Cantón (Tabla 5), lo que indica que la degradación ambiental que presenta el río en esta sección, provoca una disminución del estado de salud general de *C. decemmaculatus*. Dicho resultado coincide con los obtenidos por Linde-Arias et al (2008), quienes señalaron que el pez *Geophagus brasiliensis*, presentó los valores más bajos de K en las zonas más contaminadas de la cuenca Paraíba do Sul en Brasil.

Tabla 5: Valor medio y error estándar de los índices somáticos de hembras adultas recolectadas a lo largo en la cuenca del Río Suquía. Referencias: K- factor de condición de Fulton; IHS- índice hepatosomático. Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios de muestreo ($p < 0,05$).

Índices somáticos	Sitio de Muestreo		
	Puente Zuviría	Casabamba	Puente Canton
K	$1,74 \pm 0,08^{ab}$	$1,97 \pm 0,08^a$	$1,66 \pm 0,08^b$
IHS	$1,43 \pm 0,16$	$0,99 \pm 0,16$	$0,98 \pm 0,11$

Por su parte el índice hepatosomático (IHS), no mostró diferencias significativas entre sitios ni entre estaciones hidrológicas. Este indicador que relaciona el peso del hígado con respecto al peso del cuerpo, se vincula con funciones propias del hígado tales como la síntesis y degradación de hormonas,



transferencia de proteínas y lípidos asociados al esfuerzo reproductivo, detoxificación y/o almacenamiento de sustancias tóxicas (Santos et al., 1996). A pesar del desmejoramiento de la calidad del agua a lo largo del curso, el índice demuestra que a este nivel de organización los individuos provenientes de Puente Cantón no se encuentran afectados como se esperaba. Una disminución en este índice podría indicar un agotamiento de reservas energéticas hepáticas, debido al gasto energético que conlleva los procesos de detoxificación, mientras que un aumento podría reflejar cambios patológicos como hipertrofia y/o hiperplasia de células hepáticas (Goede & Barton, 1990). Dado que la pérdida de reservas implica pérdida de peso del hígado mientras que los eventos de hiperplasia e hipertrofia implican un incremento del mismo, ambos procesos al ocurrir conjuntamente, podrían causar la ausencia de cambios en HSI (Bonifacio et al 2016).

3.5 Análisis histológicos.

3.5.1 Hígado.

El hígado es un órgano unilobulado y parenquimatoso, cuya unidad más abundante y pequeña la constituye el hepatocito, una célula de forma poligonal que interviene en diferentes funciones. Inmerso en el parénquima se encuentra el tejido pancreático, denominándose hepatopáncreas a la estructura formada entre ambos tejidos. El parénquima no está organizado en cordones ni forma estructuras individuales (Mumfor et al., 2007). Los otros componentes celulares que caracterizan al órgano son las células endoteliales, macrófagos y fibroblastos. La masa hepática es atravesada por arterias y venas que se subdividen en capilares llamados sinusoides, y por ductos biliares (Fig. 9a). Debido a su vital importancia en el metabolismo, cualquier alteración o deterioro sobre sus funciones o estructuras puede repercutir sobre otros órganos e incluso sobre la salud integral del individuo (Hinton et al., 2001).

En el análisis histológico del hígado se identificaron, en los diferentes sitios y estaciones hidrológicas de muestreo, una amplia gama de alteraciones histológicas asociadas a los patrones de reacción descritos por Bernet et al., (1999). Para todos los sitios, fueron comunes las afecciones relacionadas a cambios circulatorios y regresivos. Entre las alteraciones más frecuentes se registró dilatación de sinusoides, seguida de degeneración hidrópica, metamorfosis grasa y congestión vascular y en menor proporción hemorragias. Por otra parte, en los individuos analizados no se registraron lesiones relacionadas a los patrones de reacción progresiva e inflamatoria.

Entre los disturbios circulatorios, la dilatación de sinusoides, fue la alteración más frecuente en todos los sitios y estaciones hidrológicas (Fig. 9b). Por su parte, la congestión vascular (Fig. 9c) fue

frecuente en la estación hidrológica húmeda en Puente Zuviría y Casabamba, pasando lo contrario en Puente Cantón donde lo fue en la estación seca. Esta alteración implica un aumento en el flujo sanguíneo, que garantiza la acción detoxificadora llevada a cabo por los hepatocitos (Neskovic et al., 1996; Olurin et al., 2006), pero que a su vez provoca un enlentecimiento de la circulación debido al aumento de lagunas sanguíneas en el tejido hepático (Fanta et al., 2003). Otra afección registrada para este patrón fue la hemorragia (Fig. 9d), la cual presentó su valor más alto en Casabamba en la estación húmeda. Las hemorragias se producen por el escape de sangre de los vasos sanguíneos congestionados hacia el parénquima, debido al aumento de flujo de sangre en dicho órgano (Bernet et al., 1999).

Dentro del patrón de reacción regresivo, la degeneración hidrópica, fue la afección registrada más frecuentemente en Puente Cantón en ambas estaciones hidrológicas (Fig. 9d). Esta alteración se caracteriza por la presencia de células hinchadas, con citoplasma opaco, granular y más acidófilo de lo normal debido a la acumulación de agua en el interior de las células. Otra patología observada para este patrón de reacción fue la metamorfosis grasa (Fig. 9e), siendo más frecuente en Puente Cantón, en la estación hidrológica seca. Dicha afección resulta de la acumulación de lípidos en el citoplasma hepático. La aparición de gotas de grasa en los hepatocitos sugiere que estos se encuentran dañados funcionalmente, lo que se refleja en un desequilibrio entre la oferta y utilización de lípidos por parte del hígado, órgano encargado del metabolismo de dichas sustancias.



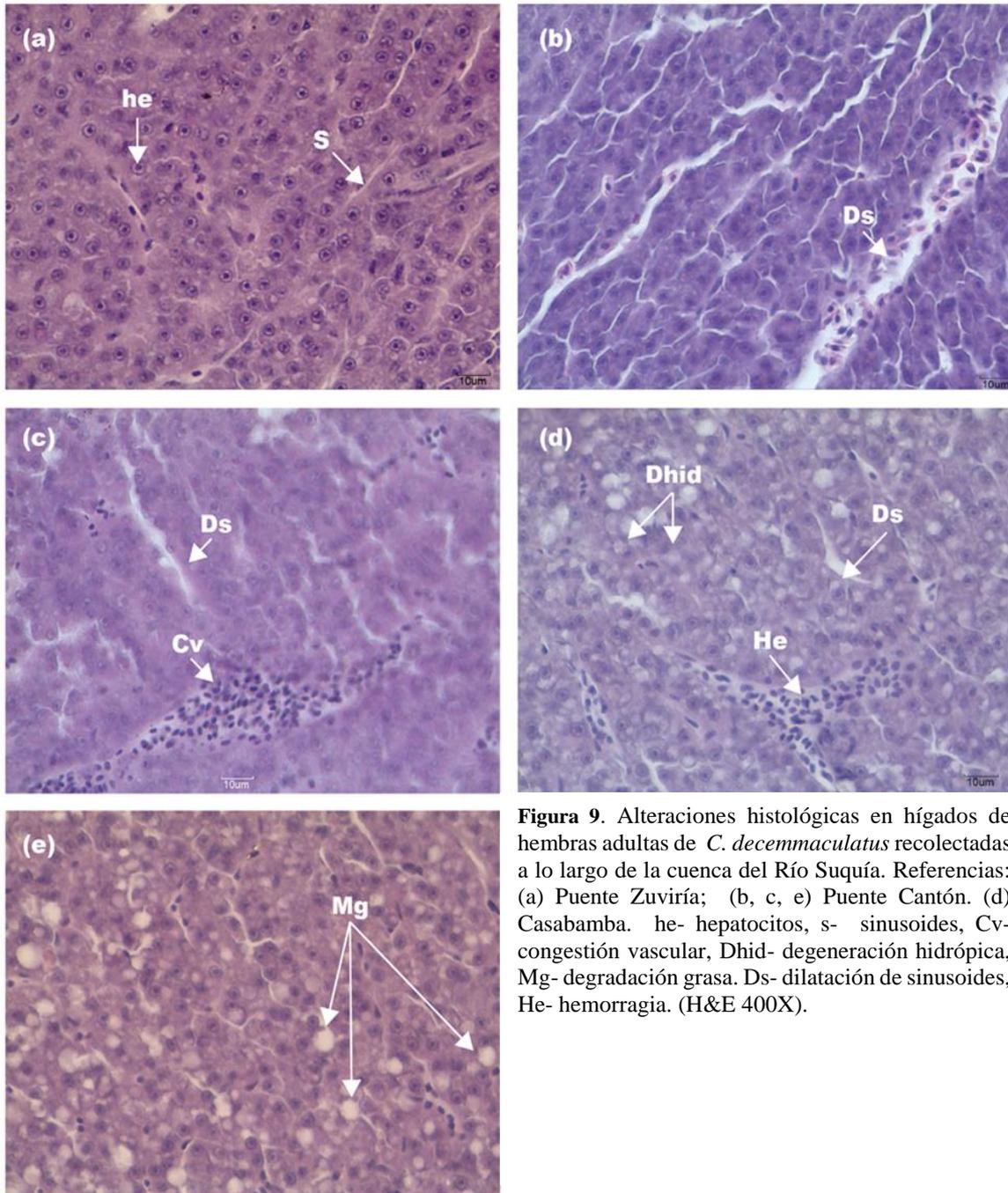


Figura 9. Alteraciones histológicas en hígados de hembras adultas de *C. decemmaculatus* recolectadas a lo largo de la cuenca del Río Suquía. Referencias: (a) Puente Zuviría; (b, c, e) Puente Cantón. (d) Casabamba. he- hepatocitos, s- sinusoides, Cv- congestión vascular, Dhid- degeneración hidrópica, Mg- degradación grasa. Ds- dilatación de sinusoides, He- hemorragia. (H&E 400X).

3.5.2 Branquias.

Las branquias son órganos respiratorios que consisten en 4 arcos branquiales por cavidad branquial. Cada arco soporta dos hemibranquias, que consiste en hileras de filamentos, denominados laminillas primarias. Estos filamentos a la vez, sostienen laminillas secundarias. Es allí donde se



produce el intercambio gaseoso mediante un mecanismo de contracorriente (Wood, 2001). El interior de la laminilla secundaria está conformado por células de soportes y lagunas sanguíneas, donde se realiza el intercambio gaseoso. En la base de estas laminillas, se encuentran las células de cloro y las células mucosas (Fig 10a).

En el presente estudio fueron identificadas, en los diferentes sitios y estaciones hidrológicas de muestreo, diversas alteraciones asociadas a los patrones de reacción descritos por Bernet et al. (1999). De esta manera, se evidenció la prevalencia de disturbios circulatorios tales como congestión vascular y aneurisma lamelar. Dentro de los cambios regresivos se registró lifting de células pavimentosas y fusión de los extremos distales de laminillas secundarias vecinas. Entre los cambios progresivos se observó hipertrofia y proliferación de células pavimentosas, células de cloro y células mucosas. No se registraron lesiones correspondientes al patrón de reacción inflamatorio. La hiperplasia de células mucosas, fue la alteración más frecuente registrada en los tres sitios y en ambas estaciones hidrológicas (Fig. 10b). Estas células son las responsables de la defensa mecánica, tóxica y patológica de las branquias (Ferguson et al., 1989). La hipertrofia y proliferación de células de cloro (Fig. 10c y b) fueron más frecuentes en Puente Cantón, durante la estación seca. La función de estas células es la de participar en la toma activa de cloro, calcio y metales divalentes. La hipertrofia de este tipo celular es una respuesta inespecífica, compensatoria al estrés por exposición a tóxicos, que se produce para equilibrar las concentraciones de iones. (Ferguson et al., 1989; Mallat et al., 1985; Lin et al., 1995; Oronsaye et al., 1984; Flores Quintana et al., 2009).

Las células pavimentosas del epitelio branquial presentaron lifting (Fig. 10d). Esta afección se caracteriza por el alejamiento del epitelio de su membrana basal, debido a la infiltración de fluido. Como consecuencia aumenta la distancia entre el medio acuoso y el torrente sanguíneo, retrasando el ingreso de los contaminantes o sustancias abrasivas (Skidmore et al., 1972). Esta patología tuvo su mayor frecuencia en Puente Zuviría, sobre el Río Yuspe, durante la estación hidrológica húmeda, y en menor medida en Casabamba. Se sabe que el lifting es una de las alteraciones más frecuentes reportadas en peces de agua dulce. También es una de las primeras respuestas inespecíficas registradas a nivel tisular, junto con la hipertrofia e hiperplasia de células pavimentosas, que surgen como consecuencia de la exposición a pesticidas (Cengiz & Ünlü, 2003; Pesce et al., 2008; Hued et al., 2012), metales pesados (Figueiredo-Fernandes et al., 2007) y aguas residuales (Bernet et al., 2004; Maggioni et al., 2012).

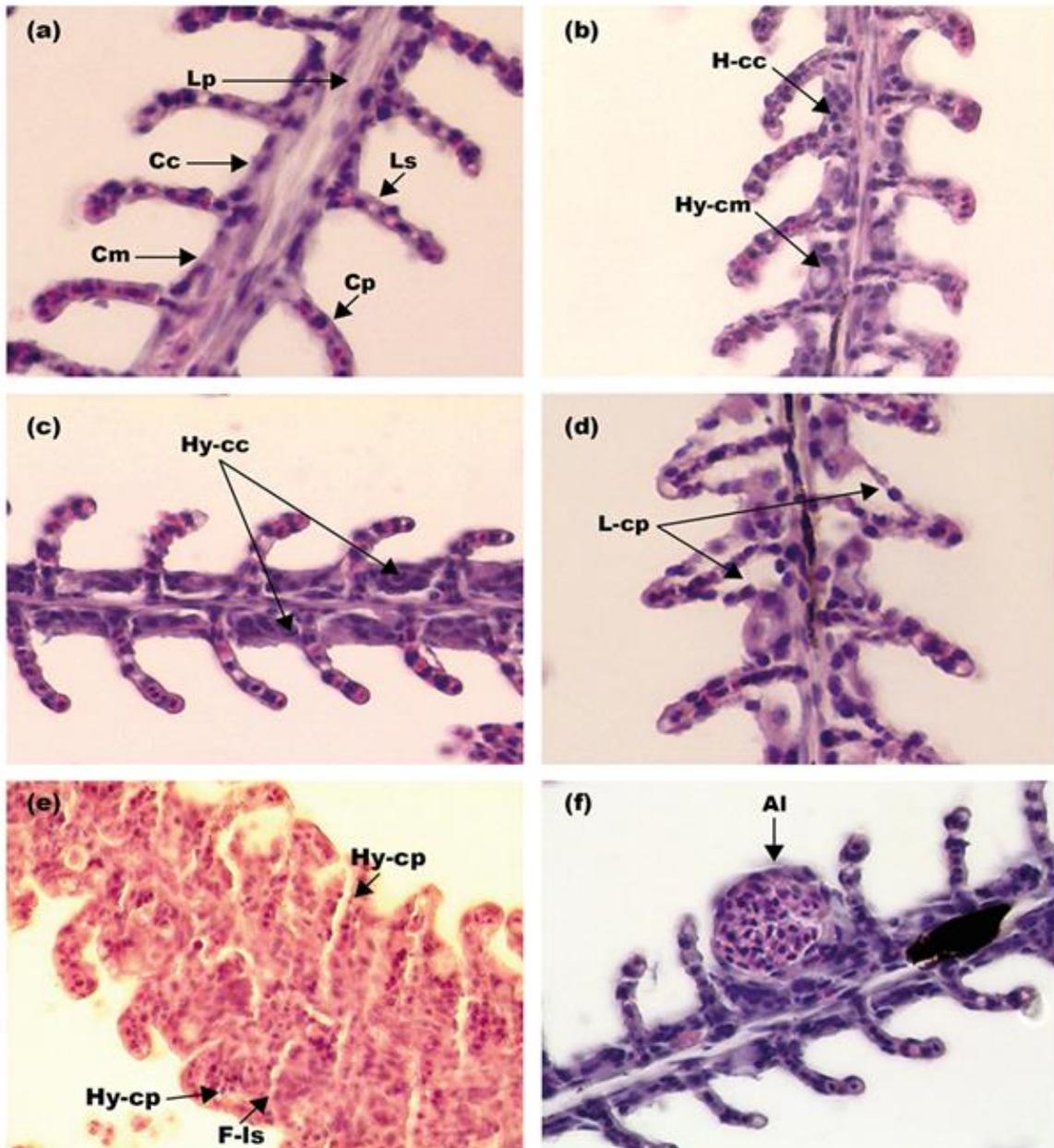


Figura 10. Alteraciones histológicas en branquias de hembras adultas de *C. decemmaculatus* recolectadas a lo largo de la cuenca del Río Suquía. Referencias: (a, d) Puente Zuviria. (b,c,e,f,g); Puente Cantón. Laminillas primarias (LP), laminillas secundarias (LS), células pavimentosas (Cp), células de cloro (Cc), células de moco (Cm). Al: aneurisma lamelar, H-cp: hiperplasia de células pavimentosas, Hy-cp: hipertrofia de células pavimentoas, L-cp: lifting de células pavimentosas, Hy-cc: hipertrofia de células de cloro, H-cc: hiperplasia de células d cloro. H-cm: hiperplasia de células mucosas F-ls: fusión de laminillas secundarias. (H&E 400X).

Otra patología encontrada, pero en menor frecuencia fue la hiperplasia de células pavimentosas, que trae como consecuencia que el epitelio respiratorio no quede disponible para realizar el intercambio gaseoso (Fig. 10e). La misma surge como respuesta tendiente a disminuir la zona de contacto entre el medio acuoso y las branquias. No se detectaron casos de necrosis. Dentro de los disturbios circulatorios se registró congestión vascular en las laminillas secundarias y aneurisma lamelar (Fig. 10f), siendo más frecuentes en la estación hidrológica seca en el sitio sobre en Puente Zuviría, sobre Río Yuspe.

En general, para las branquias analizadas, las lesiones tendieron a ser más frecuentes en Puente Cantón durante la estación hidrológica seca, donde la calidad de agua (ICA) fue menor. Esto demuestra el impacto negativo que el desmejoramiento de las condiciones ambientales provoca sobre la especie en estudio.

3.5.3 Piel.

La estructura de la piel de *C. decemmaculatus* responde a la estructura general descritas en peces teleósteos (Hinton et al., 2001). Se compone de dos capas: la epidermis y la dermis (Fig. 11a). La epidermis, está compuesta en su gran mayoría por células escamosas o cuboidales formadas a partir de un estrato germinativo formado por capas de células columnares responsables de la diferenciación de las células epidérmicas y del movimiento hacia arriba de las mismas. En dicho estrato se originan las células mucosas, las cuales migran hacia la superficie a través de la epidermis para cumplir funciones de defensa, mediante la secreción de glicoproteínas que conforman el moco que recubre el cuerpo del pez. Se caracterizan por presentar un cuerpo esférico de gran tamaño, con citoplasma basófilo y contorno delgado de característica tintórea color violeta, donde no es posible distinguir el núcleo (Fig. 11b) (Bonilla Lizarazo et al., 2008). Las sustancias mucosas que ellas secretan cubren la piel del pez y juegan un papel importante en la inmunidad del organismo, ya que el moco no sólo actúa como una barrera de defensa contra determinadas sustancias, sino también como parte de la respuesta inmune durante la interacción con agentes patógenos (Alvarez-Pellitero, 2008).

Por su parte, la dermis se encuentra entre la epidermis y el músculo. Está formada por un estrato esponjoso y otro compacto. El primero contiene colágeno y fibras de reticulina, nervios, capilares, fibroblastos y células pigmentarias, mientras que el estrato compacto está formado por densos paquetes de fibras de colágeno dispuestos de manera paralela a la superficie de la piel (Genten, 2009). Además, la dermis posee la vascularización primaria de la piel, representada por una extensa red de vasos sanguíneos. Por último, las escamas se caracterizan por localizarse entre la dermis superficial y el estrato esponjoso.



Las afecciones más frecuentes que se detectaron en la epidermis fueron hiperplasia de células epiteliales e hipertrofia de células de moco, en los tres sitios y en ambas estaciones hidrológicas mientras que en la dermis no se detectaron afecciones de ningún tipo en ninguno de los sitios ni estaciones hidrológicas. Si bien existen trabajos que mencionan a estas afecciones en peces expuestos a diversas sustancias, como así también en los provenientes de ríos contaminados (Iger et al., 1994a y b; Paul & Banarjee; 1996), en nuestro trabajo no se observaron diferencias entre sitios, dado que los individuos presentaron dichas afecciones como respuesta generalizada, característica de este tejido, por ser primer órgano blanco que está directamente expuesto al ambiente acuático, situación semejante a la expresada por las branquias.

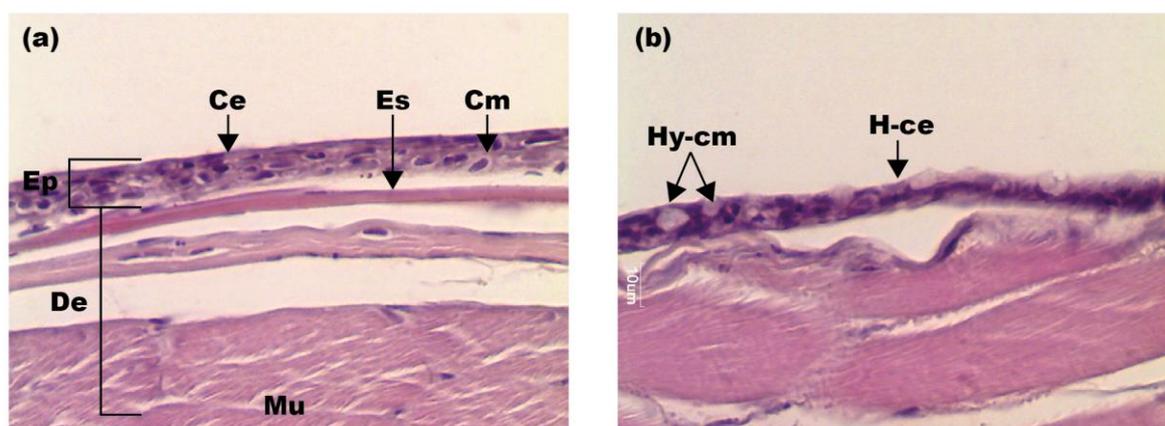


Figura 11. Alteraciones histológicas en piel de hembra adulta de *C. decemmaculatus* recolectados en la cuenca del Río Suquía. Referencias: (a) Puente Zuviría, (b) Puente Canton. Referencias: epidermis (Ep), dermis (De), musculo (Mu), células epidérmicas (Ce), células mucosas (Cm), escamas (Es), hiperplasia de células epiteliales (Hp-ce), hipertrofia de células mucosas (Hy-cm) (H&E 40X).

3.5.4 Incidencias histopatológicas.

De los índices histopatológicos de cada patrón de reacción estimados para hígado, sólo el relacionado a los cambios regresivos ($IH_{Híg.Pr.Regresivo}$) presentó diferencias significativas, evidenciándose en Puente Cantón, en la estación hidrológica seca, el valor promedio más alto de este índice (Tabla 6). Si bien las alteraciones correspondientes a este patrón fueron las que contribuyeron en mayor proporción en el resultado final del índice histopatológico de hígado ($IH_{Híg}$), este último no varió entre sitios ni entre estaciones hidrológicas de muestreo. Por otra parte, estos mismos índices calculados para branquias no variaron entre sitio ni entre estaciones hidrológicas.

La implementación del IH_{Total} , el cual refleja la salud general de los individuos al considerar las lesiones registradas en todos los órganos, otorga una visión integral sobre el efecto que provoca la

degradación de la calidad ambiental sobre los organismos analizados (Maggioni et al., 2012). Sin embargo, y contrariamente a lo esperado el IH_{Total} no se diferenció significativamente entre los sitios ni entre estaciones hidrológicas. Si bien diversas alteraciones histológicas fueron registradas en el presente trabajo, las mismas no estarían comprometiendo la salud del pez. Es necesario destacar que trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, mencionan el deterioro ambiental y el marcado gradiente de contaminación que caracteriza a la cuenca (Rautenberg et al., 2014; Zamabrano, 2016). Sin embargo, la calidad del agua en Puente Cantón, ubicado en plena ciudad de Córdoba, no llega a presentar condiciones de degradación tan marcadas como las que demuestra el curso cuando sus aguas abandonan la ciudad. Por ende, si bien el río en este tramo presenta aguas de baja calidad, los indicadores tisulares no llegarían a discriminar a través de su respuesta, las condiciones ambientales imperantes en esta área.

Tabla 6. Valores medios y error estándar de los índices histopatológicos de reacción en hembras adultas de *C. decemmaculatus* recolectados en tres sitios sobre la cuenca del Río Suquía. Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Índice	Sitios de Muestras					
	Puente Zuviría		Casabamba		Puente Cantón	
	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
IHHig.PrCirculatorio	5,50±3,70	4,00±3,79	2,50±2,52	5,20±4,38	4,67±1,15	2,00±0,00
IHHig.PrRegresivo	2,00±1,00	2,00±2,10	0,00±0,00	1,20±1,10	15,30±9,87 ^a	0,80±1,10 ^b
IHHig.PrProgresivo	-	-	-	-	-	-
IHhig.PrInflamatorio	-	-	-	-	-	-
IHBra.PrCirculatorio	1,50±1,91	0,67±1,03	2,80±5,22	1,60±1,67	2,00±1,63	3,00±6,00
IHBra.PrRegresivo	7,00±14,00	5,00±6,16	1,60±2,19	6,00±6,00	2,29±3,15	4,00±8,00
IHBra.PrProgresivo	15,00±11,60	6,00±5,51	12,00±10,95	16,18±5,76	12,57±7,72	14,00±12,33
IHBra.PrInflamatorio	-	-	-	-	-	-
IHHig	6,00±1,41	7,5±2,47	6,40±2,83	2,50±1,77	3,00±0,71	15,50±5,30
IHBra	11,66±2,83	23,5±7,86	24,40±7,82	16,40±5,69	24,00±5,81	16,00±6,12
IHTotal	17,66±5,54	37,00±12,40	24,66±9,74	23,20±8,53	16,80±8,50	24,85±8,12

3.4 Análisis morfométrico en branquias.

El índice %DIG₁, que permite conocer el porcentaje de epitelio respiratorio disponible para el intercambio gaseoso, basado en la longitud de las laminillas primarias (Fig. 12a) no mostro diferencias significativas entre sitios. Contrariamente, los índices %DIG_a (Fig. 12b) y %DIG_t (Fig 12c) variaron



significativamente, mostrando los menores valores para los individuos recolectados en Puente Zuviría, en la estación hidrológica húmeda. Estos resultados, si bien sugieren que los peces no tendrían sus branquias en óptimas condiciones, se deberían a otras causas no relacionadas a la contaminación, pero si a las crecientes que ocurren en la estación húmeda como producto de la abundancia de las lluvias en esta época. El arrastre que se produce por acción de las crecientes provoca la resuspensión de sólidos que pueden alterar momentáneamente la estructura branquial, dado que las branquias son el primer órgano afectado por estar en contacto directo con el medio acuático. Esta situación no ocurre de manera marcada en los otros dos sitios, ya que el flujo del río es manejado a través del cierre y apertura de las compuertas del dique San Roque que se encuentra aguas arriba de Casabamba.



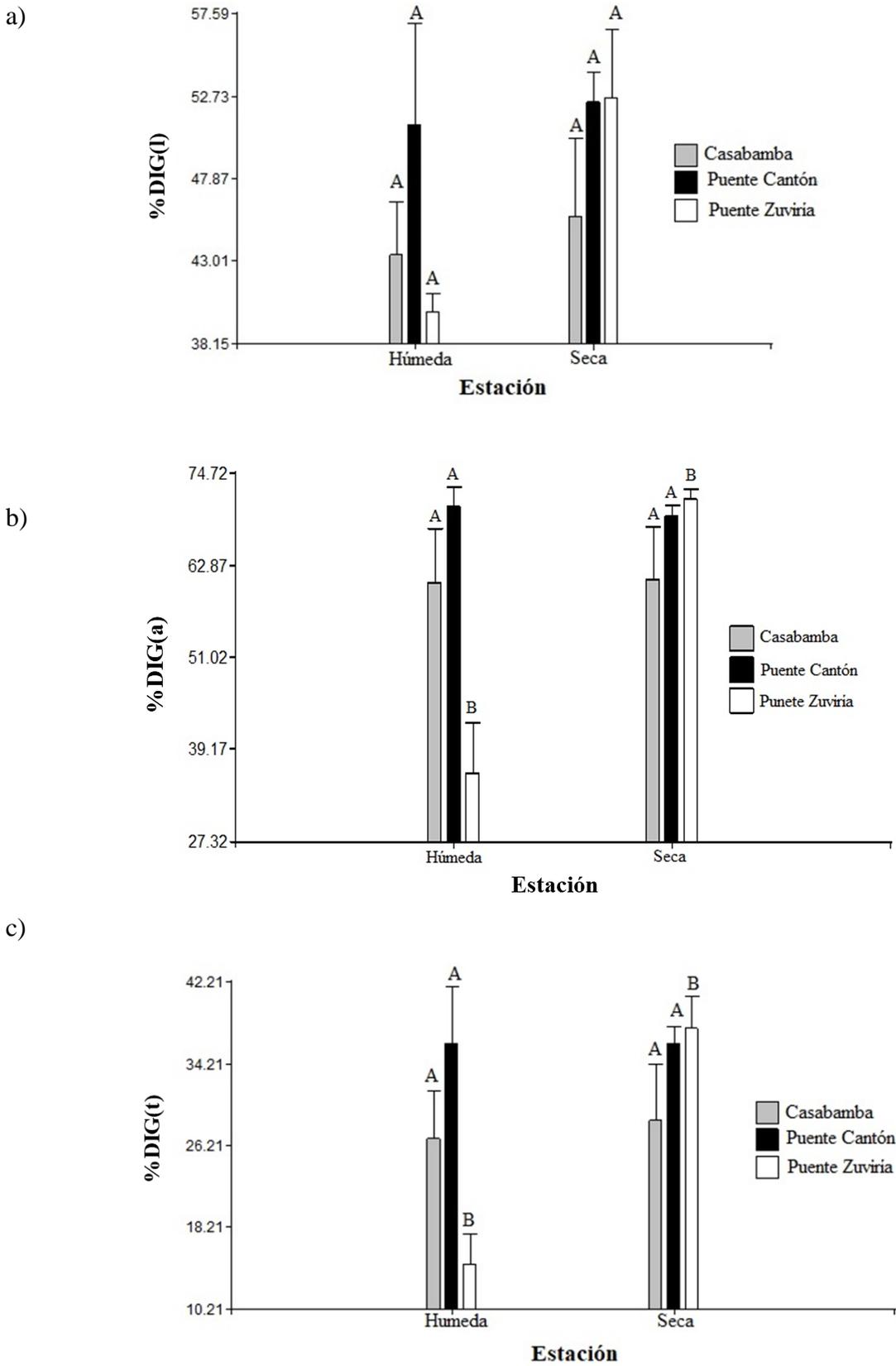


Figura 12. Índices morfométricos de branquias registrados en hembras adultas de *C. decemmaculatus* recolectadas en la cuenca del Río Suquía. Referencias a) %DIG_(l) (porcentaje de laminillas secundarias disponibles para el intercambio gaseoso); b) %DIG_(a) (aumento del ancho de las laminillas respiratorias debido a la disminución de la distancia interlamelar); c) %DIG_(t) (engloba el largo como el ancho de las laminillas secundarias). Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

4. Conclusiones.

En todo ambiente acuático los organismos están expuestos a mezclas de contaminantes, cuyos efectos no pueden ser explicados o predichos solo a partir de los análisis químicos de agua. Además, algunos contaminantes se almacenan en los tejidos sin evidenciar efecto tóxico, mientras que otros se determinan por una elevada toxicidad a niveles bajos de exposición. La evaluación de biomarcadores en peces permite poner en evidencia los efectos integrados de diversos factores sobre la contaminación de un cuerpo de agua y se pueden emplear para comparar los cambios relativos en su calidad a escala espacial o bien temporal.

El impacto de las numerosas actividades antrópicas sobre los cursos hídricos pone de manifiesto un gradiente de contaminación a lo largo de la cuenca del Río Suquía. De esta manera, los resultados obtenidos en el presente estudio, contribuyen a fortalecer la relación causa-efecto entre las alteraciones observadas en individuos de *C. decemmaculatus* y los niveles de contaminación en el medio ambiente acuático. Por tener esta especie una amplia distribución en la cuenca y por ser nativa y tolerante a la degradación ambiental, *C. decemmaculatus* se constituye como un importante bioindicador, válido para el estudio de las variaciones en la calidad de los recursos hídricos del país.

Los biomarcadores seleccionados, respondieron de manera diferencial a las condiciones ambientales que ofrece la cuenca, lo cual se refleja en los análisis somáticos, histológicos y enzimáticos. Los resultados obtenidos posicionan a Puente Cantón como el sitio más degradado de las secciones estudiadas. La actividad natatoria y la actividad de la AChE fueron los biomarcadores que respondieron de manera fehaciente ante las diferentes calidades de agua que presentó el río Suquía.



5. Referencias bibliográficas.

- Abdel-Warith, A. A., Younis, E. M., Al-Asgah, N. A., & Wahbi, O. M. (2011). Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Sci. Res. Essays*, 6(17), 3760-3769.
- Al-Sabti, K., & Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2), 121-135.
- Arismendi, I., Penaluna, B., & Soto, D. (2011). Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. *Lake and Reservoir Management*, 27(1), 61-69.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3), 171-198.
- Barchuk A. Claro como el agua: necesidad de un ordenamiento territorial en relación a los recursos hídricos en Córdoba. Hoy la Universidad. Septiembre de 2009. 1: 6-9.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34.
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., & Burkhardt-Holm, P. (2004). Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiologia*, 524(1), 53-66.
- Bistoni, M. A., Hued, A. C., Videla, M., & Sagretti, L. (1999). Efectos de la calidad del agua sobre las comunidades ícticas de la región central de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 325–335.
- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L. Bistoni, M. A. y Hued A. C. **Efectos de Clorpirifós sobre la locomoción y actividad de acetilcolinesterasa sobre *Cnesterodon decemmaculatus* y *Cheirodon interruptus***. VII Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, llevado a cabo el 19 y 20 de septiembre de 2013 en la ciudad de Río Cuarto.
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M. L., de los Ángeles Bistoni, M., Amé, M. V., Hued, A. C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, 67, 88-97.



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V., & Hued, A. C. (2017). Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, *188*, 486-493.
- Bonilla Lizarazo, R. J., Quintero Virguez, M., Gómez Ramírez, E., Rodríguez Caicedo, D., & Hurtado Giraldo, H. (2008). Histología y morfometría de piel del pez *Eremophilus mutisii* (Trychomecteridae, Siluriformes). *Revista de Biología Tropical*, *56*(2), 885-893.
- Bradbury, S. P., Carlson, R. W., Henry, T. R., Padilla, S., & Cowden, J. (2008). Toxic responses of the fish nervous system. *The Toxicology of Fishes. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL*, 417-455.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Hued, A. C., & Bistoni, M. A. (2005). Haematological parameters in a Neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, *537*, 25–33.
- Cengiz, E. I., & Ünlü, E. (2003). Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *38*(5), 581-589.
- Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *21*(3), 246-253.
- De la Torre, F. R., Ferrari, L., & Salibian, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *131*(3), 271-280.
- Fernando, R., Ferrari, L., & Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, *59*(4), 577-583.
- Foster, A. D., & Rosenzweig, M. R. (2001). Imperfect commitment, altruism, and the family: Evidence from transfer behavior in low-income rural areas. *The Review of Economics and Statistics*, *83*(3), 389-407.



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. InfoStat Versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., & Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 119-130.
- Ferrari, L. Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., & Fontainhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3), 103-109.
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa State University Press.
- Flores Quintana, C. (2009). Células cloro en peces teleósteos. *Rev. Vet*, 20, 57-60.
- Friedrich, G., Chaapman, D., & Beim, A (1996). The use of biological material. In D. Champman (Ed.), *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and weter in environmental monitoring* (2nd ed., Vol 5). London: E & Fn Spon.
- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of applied ichthyology*, 22(4), 241-253.
- Gaiero, D. M., Ross, G. R., Depetris, P. J., & Kempe, S. (1997). Spatial and temporal variability of total non-residual heavy metals content in stream sediments from the Suquia River system, Cordoba, Argentina. *Water, air, and soil pollution*, 93(1-4), 303-319.
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. Science Publishers.
- Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E., & Triebkorn, R. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8(3-4), 241-260.
- Goede, R. W. y Barton B. A., (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. In *Am. Fish. Soc. Symp.* (Vol. 8, pp. 93-108).



- Hinton, D. E., Segner, H., & Braunbeck, T. (2001). Toxic responses of the liver. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*, 1, 224-268.
- Hued, A. C., & Bistoni, M. A. (2005). Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia*, 543, 279–298.
- Hued, A., Dardanelli, S., & Bistoni, M. (2010). Temporal and spatial variability of fish assemblages in a river basin with an environmental degradation gradient. *Community Ecology*, 11(1), 41-50.
- Hued, A. C., Oberhofer, S., & de los Ángeles Bistoni, M. (2012). Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62 (1), 107-117.
- Iger, Y., & Bonga, S. W. (1994). Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. *Cell and Tissue Research*, 275(3), 481-492
- Iger, Y., Lock, R. A. C., Van der Meij, J. C. A., & Bonga, S. W. (1994). Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 26(3), 342-350.
- Johnson, L. L., Stehr, C. M., Olson, O. P., Myers, M. S., Pierce, S. M., Wigren, C. A., ... & Varanasi, U. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environmental science & technology*, 27(13), 2759-2771.
- Kavitha, P., & Rao, J. V. (2008). Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2), 192-198.
- Khallaf, E. A., Galal, M., & Authman, M. (2003). The biology of *Oreochromis niloticus* in a polluted canal. *Ecotoxicology*, 12(5), 405-416.
- Kumar, A., Rai, D. K., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2009). λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide biochemistry and physiology*, 93(2), 96-99.
- Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., & Ramsden, J. J. (2001). Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 1, 49-57.
- Lin, H., & Randall, D. (1995). 9 Proton Pumps in Fish Gills. *Fish physiology*, 14, 229-255.



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., Novo, L. A., de Albuquerque, C., & Moreira, J. C. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental pollution*, 156(3), 974-979.
- Liotta, J. R. (2005). Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. *ProBiota: Serie Documentos*.
- Maggioni, T., Hued, A. C., Monferrán, M. V., Bonansea, R. I., Galanti, L. N., & Amé, M. V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 63(3), 337-353.
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648.
- Marti, G. A., de las Mercedes Azpelicueta, M., Tranchida, M. C., Pelizza, S. A., & García, J. J. (2006). Predation efficiency of indigenous larvivorous fish species on *Culex pipiens* L. larvae (Diptera: Culicidae) in drainage ditches in Argentina. *Journal of vector Ecology*, 31(1), 102-106.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., & Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(1), 6-9.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., Santos, A. M., & Salibián, A. (2014). Corrigendum to "Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*" [Ecotoxicol. Environ. Saf. 111 (2015) 236-241]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 112, 161-161.
- Merlo, C., Abril, A., Amé, M. V., Argüello, G. A., Carreras, H. A., Chiappero, M. S., & Solís, V. M. (2011). Integral assessment of pollution in the Suquía River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *The Science of the Total Environment*, 409, 5034–5045.
- Monferrán, M. V., Galanti, L. N., Bonansea, R. I., Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. (2011). Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 398–409.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B., & Blazer, V. (2007). Fish histology and histopathology. *US Fish and Wildlife National Conservation Training Center, Amerika Serikat*.
- Hunter, S. T., Bedell, K. E., & Mumford, M. D. (2007). Climate for creativity: A quantitative review. *Creativity research journal*, 19(1), 69-90.



- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2008) Calidad ambiental-Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Norma N° 29112/2008.
- Nero, V., Farwell, A., Lee, L. E. J., Van Meer, T., MacKinnon, M. D., & Dixon, D. G. (2006). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: gill and liver histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 252-264.
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., ... & Dixon, D. G. (2006). Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 365-377.
- Nesković, N. K., Poleksić, V., Elezović, I., Karan, V., Budimir, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 295–302.
- Nimptsch, J., Wunderlin, D. A., Dollan, A., & Pflugmacher, S. (2005). Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Chemosphere*, 61(2), 147-157.
- Nowak, B. (1992). Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic toxicology*, 23(1), 65-83.
- Olurin, K. B., Olojo, E. A. A., Mbaka, G. O., & Akindele, A. T. (2006). Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*, 5(24), 2480.
- Oronsaye, J. A. O., & Brafield, A. E. (1984). The effect of dissolved cadmium on the chloride cells of the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of fish biology*, 25(2), 253-258.
- Pesce, S. F., & Wunderlin, D. A. (2000). Use of water quality index to verify the impact of Córdoba city (Argentina) on Suquía River. *Water Research*, 34, 2915–2926.
- Pesce, S. F., Cazenave, J., Monferrán, M. V., Frede, S., & Wunderlin, D. A. (2008). Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environmental pollution*, 156(3), 775-783.
- Poleksic, V., & Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution.
- Quintans, F., Scasso, F., Loureiro, M., Yafe, A., 2009. Diet of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) and *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay. *Iheringia* 99, 99–105. doi:10.1590/S0073- 47212009000100014



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

- Rasband, W.S. 2004. Image J. National Institute of Health, Bethesda, Maryland. Available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij>
- Rautenberg, G. E., Amé, M. V., Monferrán, M. V., Bonansea, R. I., & Hued, A. C. (2015). A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquía River. *Ecological Indicators*, 48, 706-720.
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*, 32(1), 116-122.
- Ricker, W. E. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 191, 1-382.
- Ringuelet, R. A., Arámburu, R. H., & Alonso de Arámburu, A. S. (1967). Los peces argentinos de agua dulce.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C. R., de Menezes, C. C., Lazzari, R., Neto, J. R. & Loro, V. L. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58(3), 740-745.
- Santos, R. S., Hawkins, S. J., & Nash, R. D. M. (1996). Reproductive phenology of the Azorean rock pool blenny a fish with alternative mating tactics. *Journal of fish biology*, 48(5), 842-858.
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J. ... & Bonilla, S. (2001). Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11(1), 31-44.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>.
- Skidmore, J. F., & Tovell, P. W. A. (1972). Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, 6(3), 217IN1229IN3-228IN2230IN4.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* –WH Freeman and Co. *New York*, XIX.
- Strange, R. J. (1996). Field examination of fishes. *Fisheries techniques, 2nd edition*. *American Fisheries Society, Bethesda, Maryland*, 433-446.
- Sumpter, J. P. & Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 173-178.



Cnesterodon decemmaculatus como especie bioindicadora de la calidad del agua en la cuenca del Río Suquía.

- Thompson, H. M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8(5), 369-384.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- Van Gestel, C. A. M., & Van Brummelen, T. C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(4), 217-225.
- Wood, C. M. (2001). Toxic responses of the gill. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*, 1, 1-89.
- Wunderlin D., Díaz M. P., Amé M. V., Pesce F., Hued A, C. & Bistoni M. A. (2001). Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquía river basin (Córdoba-Argentina). *Water Research*. 35: 2881-2894.
- Zambrano, M., & Hued, A. (2016). Efectos de la calidad del agua sobre aspectos de la biología reproductiva de *Cnesterodon decemmaculatus*. Cátedra de diversidad animal. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. (Cordoba-Argentina).



6. Agradecimientos

Es mi deseo agradecer a quienes de un modo u otro me apoyaron, sea con el aporte de su estímulo o con la colaboración académica en estos años.

Gracias al apoyo y a la compañía incondicional de mi familia a mi Mamá y mi Papá que hoy me guía desde donde está, de mis hermanos y sobrinos, de mi nona Minga, tía Mabel y Juli, no lo hubiera logrado sin ellos.

También de todos aquellos de quien aprendí, como Andrea Hued, mi directora y amiga, quien confió en mí para realizar esta tesina. Gracias por el tiempo dedicado, la paciencia de estos años, que no son pocos, el apoyo no solo académico sino que muchas veces emocional, por los mates y los brindis compartidos.

Gracias a Alejo y Gise por brindarme su ayuda y aclárame dudas, cada vez que las necesite. A Pao y Lauri por los muestreos que realizamos juntas. Y al resto de la catedra por su compañía durante la realización de mi trabajo y por hacerme sentir parte de ella, los cuales hoy son grandes amigos.

A Gas y Nedy amigos incondicionales y para siempre, que me bancaron y me bancan todo el tiempo, muchas gracias por todos estos años de momentos vividos.

A mis amigas de la vida Geor, Nadia y Pao las cuales me acompañaron en los buenos y el los malos momento y en estos mucho más.

También a amigo el gordo por todo su aguante incondicional.

A cada amigo y amiga de la facu, el grupo 14, los fanáticos del cuarteto, los galme venne, los caso perdidos, los abstemios a la resaca, a Leo, Nacho e Ima. A todos ellos gracias por todo lo compartido, viajes, birras, mates, nervios, exámenes, y por darme un techo cada vez que necesite donde quedarme.

A todos gracias por el apoyo constante y cada momento vivido, por siempre en mi corazón!!!

