

# Bienvenida nuevamente *Ciencia Pesquera*

**L**a revista *Ciencia Pesquera* ha sido parte integral de la historia del Instituto Nacional de Pesca desde 1981, cuando con la dirección del doctor Jorge Carranza Fraser y del licenciado Fernando Rafful, en ese entonces jefe del Departamento de Pesca, se fundó con el propósito de publicar los resultados de las investigaciones que se realizaban de manera cotidiana en nuestra Institución. También ha estado abierta a investigadores, organismos e instituciones que han trabajado en el desarrollo de conocimientos sobre pesca y las ciencias marinas en general.

Tras un breve receso hemos retomado *Ciencia Pesquera*, pues si bien en México y Latinoamérica existen varias y muy buenas revistas relacionadas con las ciencias acuáticas, identificamos un nicho para la publicación especializada de artículos científicos y tecnológicos relacionados con la pesca y la acuicultura. En los inicios de la revista los artículos se ocupaban principalmente de la evaluación de los recursos explotados comercialmente; ahora pretendemos incluir trabajos con enfoques y estrategias de manejo moderno cuyo objetivo sea lograr la sustentabilidad y la conser-

vación de recursos naturales relacionados con la pesca, sin dejar de lado aspectos básicos de la biología y el estudio de recursos potenciales. Por otro lado, en esta nueva etapa de *Ciencia Pesquera* serán incluidos artículos relacionados con el cultivo y la engorda de organismos acuáticos, como una forma de reconocer su importancia económica y social, y como actividades productivas abastecedoras de proteínas en México y el mundo.

La publicación de trabajos se hará en estricto apego a normas de alto estándar y a rigurosos procedimientos editoriales. De esta manera aspiramos a contribuir a la difusión de resultados de investigaciones científicas y tecnológicas que impliquen la generación de conocimiento para el manejo pesquero y acuícola que demanda el siglo XXI.

Gracias y enhorabuena a la esforzada comunidad científica.

*Dr. Miguel Ángel Cisneros Mata*  
Director en Jefe del INAPESCA

# Respuesta del tegumento de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a la acidificación del agua

Eva María Santos-Atienza, Daniela Rodríguez-Kobata y Juan Luis Martínez-Álvarez\*

La acidificación del agua provoca múltiples alteraciones en la fisiología del pez y, particularmente, en la estructura del tegumento. La piel desempeña un doble papel como barrera osmótica y física; además, en ella actúan distintos mecanismos de defensa, específicos e inespecíficos, celulares y humorales. Por otra parte, la acidificación del agua tiene también efectos indirectos sobre la susceptibilidad a distintas enfermedades y, en consecuencia, una notable repercusión económica en la acuicultura. Con el fin de estudiar los efectos de este fenómeno, fueron expuestos ejemplares de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) a un descenso gradual del pH hasta el valor de 5.5 durante un periodo de cinco horas. A partir de ese momento se tomaron muestras de piel sin escamas de la región dorsal de la cabeza en tiempos de postacidificación de cero, una, dos, cuatro, seis y ocho horas, y se procesaron convencionalmente para microscopía óptica y electrónica. Los resultados mostraron alteraciones histopatológicas significativas desde los primeros tiempos de este proceso, incluyendo una respuesta adaptativa con incremento de la secreción mucosa superficial protectora, migración de células leucocíticas a la epidermis dañada y puesta en marcha de procesos de regeneración epidérmica encaminados a la recuperación de su estructura inicial, que se observó a las ocho horas de postacidificación.

**Palabras clave:** salmónidos, acidificación, piel, histopatología.

## Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tegument response to acidification of water

Water acidification causes several alterations on fish physiology and particularly tegument structure. Fish skin has importance as osmotic and physical barrier; in addition it contains several defence mechanisms, specific and unspecific, cellular and humoral. Water acidification has indirect effects, increasing the susceptibility to diseases and eventually leading as a consequence to a great economical repercussion in aquaculture. To study the acidification effects, specimens of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) were exposed to a gradual decrease of pH to 5.5 in a period of five hours. Samples of skin without scales were taken at postacidification times of zero, one, two, four, six and eight hours and were processed for optic and electron microscopy. Results showed significative histopathological alterations from the earliest postacidification times. An adaptative response was developed, involving an increase of superficial mucus protective secretion, migration of leucocytic cells to the injured epidermis and epidermic regeneration processes to restore the initial structure, which was achieved eight hours after postacidification.

**Key words:** salmonids, acidification, skin, histopathology.

### Introducción

El interés que en las últimas décadas se ha producido por el estudio de la acidificación de las aguas continentales deriva del hecho de que la lluvia ácida, que consiste de manera esencial en precipitaciones con altas concentraciones de iones acidificantes, principalmente  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ ; así como trazas de  $\text{NH}_4^+$  y otros microcontaminantes

(Overrein *et al.*, 1980<sup>1</sup>), provoca un descenso del pH en los ríos y lagos de agua dulce. La acidificación de las aguas continentales también puede estar originada por la deposición seca directa de productos contaminantes.

Este fenómeno de acidificación constituye un factor patogénico de primera magnitud para los peces dulceacuícolas, puesto que su buen estado

\* Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo, C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n. 33071 Oviedo, España. [juanlm@uniovi.es](mailto:juanlm@uniovi.es)

1. OVERREIN, L.N., H.M. Seip y A. Tøllan. 1980. Acid precipitation-effects on forest and fish. *Final report of SNSF-Project 1972-1980:175.*

de salud depende directamente de una correcta regulación del equilibrio hidromineral entre los fluidos internos y el medio externo (Mason, 1989). Así, las aguas de bajo pH provocan indirectamente alteraciones endocrinas y desencadenan una situación de estrés capaz de modificar en forma notoria numerosos procesos fisiológicos, tales como la osmorregulación, la reproducción, el crecimiento y la defensa inmunológica (McWilliams, 1980; Sunyer *et al.*, 1995).

La integridad de la piel es fundamental en la salud del pez, al desempeñar un doble papel como barrera osmótica y física; además, en ella se encuentran distintos mecanismos de defensa, específicos e inespecíficos, celulares y humorales. Por tanto, su alteración supone un aumento de los riesgos patológicos debidos a un factor etiológico exógeno o a un cambio fisiológico. La epidermis normal de la trucha arco iris es un epitelio estratificado que tiene como media alrededor de diez capas celulares; está constituido por células filamentosas (también denominadas células de Malpighi), fuertemente unidas mediante desmosomas asociados a la abundante red de tonofilamentos citoplásmicos (Mittal y Banerjee, 1980). Entre estas células se encuentran las glándulas unicelulares secretoras de mucus, que producen principalmente glucoproteínas; a pesar de que el proceso bioquímico de estas secreciones varía entre diferentes especies, las funciones generales son comunes a todos los peces. La capa de mucus proporciona una protección mecánica contra posibles daños, heridas o erosiones de la piel que podrían tener repercusiones en la salud del animal. Asimismo, estas secreciones actúan contra los ataques de agentes patogénicos al promover un lavado continuo que elimina los patógenos que pudiesen alcanzar la superficie del tegumento (Pickering, 1974). Pero, sobre todo, el mucus contiene productos antimicrobianos inespecíficos (interferón, lisozima, complemento, proteína C-reactiva...) e inmunoglobulinas específicas (Fletcher y Grant, 1969; Harris y Hunt, 1973; Bullock y Roberts, 1975); incluso se ha sugerido la presencia de leucocitos migratorios (Pickering y Richards, 1980). De esto se deduce que en la capa mucosa se ejerce una defensa inmunológica, tanto a escala humoral como celular, que se completa con la existencia de una población de leucocitos (principalmente macrófagos y neutró-

filos) que migran entre las células filamentosas cuando se desencadena un proceso inflamatorio local en la epidermis (Martínez *et al.*, 1994; Martínez y López-Dóriga, 1995).

Dadas estas características del tegumento, cabe pensar que fuertes variaciones del pH del medio externo causen lesiones en él, tanto en el mucus superficial como en la propia estructura del tejido epidérmico, y que éstas puedan comprometer gravemente la salud del pez. El presente trabajo pretende analizar las alteraciones histopatológicas que se producen en la epidermis y en el estrato superior de la dermis de la piel de truchas arco iris cuando son sometidas a un tratamiento experimental de acidificación del medio externo.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 20 ejemplares de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) de un año de edad procedentes de la piscifactoría del Alba, Rioseco, Asturias, España. Los peces fueron trasladados al laboratorio y mantenidos durante un periodo de aclimatación de más de 48 h en un acuario de 200 l de capacidad, con agua desclorada, a una temperatura de  $10 \pm 2$  °C y sin suministrarles alimento. En el momento de la toma de muestras, tras el sacrificio del pez, se realizó un examen externo y una necropsia básica de los órganos internos para comprobar la inexistencia de parásitos u otros signos de enfermedad.

Después del periodo de aclimatación, las truchas fueron introducidas en los tanques de experimentación. Se llevó a cabo un proceso de acidificación en el que durante cinco horas, se redujo gradualmente el pH del agua hasta obtener un valor de 5.5. A partir de este momento, el pH se mantuvo constante y se contabilizó el tiempo de postacidificación (TPA). La extracción de muestras de piel se realizó en TPA de cero, una, dos, cuatro, seis y ocho horas. El diseño experimental se realizó de acuerdo con lo descrito por Magdalena *et al.* (1999<sup>2</sup>). Los tanques de ex-

2. MAGDALENA, M., A. Ingrassia y J.L. Martínez. 1999. Histopathological effects of acidified water in fish skin. Experimental design. *EAFP 9<sup>th</sup> International Conference "Diseases of fish and*

perimentación (Fig. 1) eran dos recipientes de 30 l de capacidad, cerrados y totalmente llenos de agua, a los que se suministró oxígeno puro.

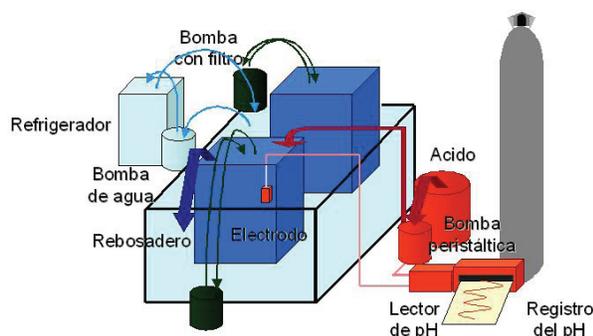


Fig. 1. Montaje experimental para la aplicación del tratamiento ácido y el mantenimiento de los individuos control.

Estas medidas se llevaron a cabo para evitar el efecto tamponador del  $\text{CO}_2$  atmosférico, que impide la obtención y el mantenimiento de un pH bajo constante. La acidificación del agua se alcanzó mediante la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Recaptur® 98%) diluido a pH 1.9. En el techo del tanque cerrado se instaló un rebosadero para permitir la salida del líquido sobrante: el equivalente al volumen de ácido entrante. Los iones bisulfato ( $\text{HSO}_4^-$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), resultantes de la ionización del ácido sulfúrico al combinarse con el agua, son inocuos para el pez. Durante cinco horas se suministró un flujo constante de ácido con una bomba peristáltica (Dinko D-21 F). La mezcla del ácido entrante y el agua del interior del tanque se favoreció con una bomba externa (Fluval 203) que al mismo tiempo actuó de filtro para eliminar los productos de desecho de los peces. El pH del agua se midió de modo permanente con un electrodo (Crisson PDA) instalado dentro del contenedor; y las variaciones se registraron sobre papel con un marcador de trazo continuo (Eurotherm Chessell 4101). Para conseguir la estabilidad de la acidez del agua, el electrodo de pH se conectó a un lector de pH (Crisson 220) con interruptor programable, y éste a la bomba peristáltica, de manera que se desconectaba automáticamente al alcanzarse el pH deseado y se

volvía a conectar, dando paso al ácido, cuando el pH superaba el deseado. Como controles se usaron otros ejemplares de trucha arco iris que se mantuvieron en un segundo tanque en condiciones similares, pero sin ácido. El agua de ambos tanques se mantuvo a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  colocándolos dentro de otro en el que discurría agua conectada a un circuito refrigerador externo.

El proceso experimental se realizó dos veces, con 10 ejemplares de trucha arco iris en cada ocasión. En el experimento uno se usaron cuatro truchas como control y seis truchas para la obtención de muestras con tiempos de postacidificación de cero, una y dos horas. En el dos se emplearon cuatro truchas control y seis para la extracción de las muestras con tiempos de postacidificación de cuatro, seis y ocho horas. Una vez transcurridos los tiempos establecidos para la toma de muestras, se sacaron los peces del tanque de experimentación y se anestesiaron mediante inmersión en MS222 (metanosulfonato de triclaína) a una concentración 1:15,000 (peso/volumen). Para los estudios histopatológicos se tomaron piezas de piel sin escamas de aproximadamente  $25 \text{ mm}^2$  de la zona dorsal de la cabeza del pez. El procesamiento de las muestras se realizó con los siguientes métodos:

- *Microscopía óptica.* Tras la extracción, las piezas se fijaron inmediatamente con glutaraldehído a 2% tamponado a pH 7.2 con PIPES (piperazina-N,N' bis [ácido 2-etanosulfónico]) 0.025 M. La fijación se llevó a cabo durante 72 h a  $4^\circ\text{C}$ , y posteriormente las piezas se lavaron en tampón (PIPES 0.025 M). Enseguida fueron posfijadas durante tres a cuatro horas en tetróxido de osmio a 1% en el mismo tampón a temperatura ambiente. Tras otro lavado, las muestras se dejaron durante toda la noche en acetato de uranilo a 2% tamponado igualmente a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas con series de acetona de graduación creciente, y se incluyeron en araldita (Durcupan ACM) usando óxido de propileno como líquido intermediario. De estos bloques de inclusión se obtuvieron secciones semifinas ( $0.5 \mu\text{m}$  de grosor) mediante un Ultratome IV LKB, que se tiñeron con fucsina básica y azul de metileno y se mon-

taron con Cytoseal. Finalmente las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon Labophot-2 con una cámara digital Leica DC 300.

- *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*. Inmediatamente después de la extracción, las muestras de piel se fijaron en glutaraldehído a 2% tamponado a pH 7.2 con PIPES 0.025 M. La fijación se realizó durante 48 h a 4 °C, y una vez concluida, las muestras fueron lavadas dos veces durante 10 min con el mismo tampón PIPES. Posteriormente se deshidrataron mediante series de etanol con graduación creciente. Tras usar iso-amiloacetato como líquido intermediario, se llevó a cabo la desecación por punto crítico en un Polaron E-3000. Por último, las muestras se recubrieron con oro en un metalizador Sputter Coater Polaron E5800 y se observaron en los microscopios electrónicos de barrido JEOL-6100 y Philips-XL30.

## Resultados

El tratamiento ácido al que fueron sometidas las truchas provocó alteraciones en la piel normal (Figs. 2 y 3), en las siguientes características: la cohesión de las células, que conlleva la aparición de espacios acantolíticos y mayor desprendimiento celular en las capas superiores, la continuidad de la superficie epidérmica, el grosor de la epidermis y el número de sus capas celulares, el número de células mucosas, su tamaño, su posición en la epidermis y la cantidad de secreción, el desarrollo normal del ciclo celular al aumentar la frecuencia de procesos necróticos en las células, la ubicación de los leucocitos y la localización de los gránulos pigmentarios de los melanóforos.

Con los TPA de cero, una y dos horas se produjo una pérdida de contacto entre las membranas de células epiteliales adyacentes, con la consecuente aparición de espacios acantolíticos. Las células afectadas presentaron una forma estrellada característica; los entrantes corresponden a zonas de alteración de la cohesión celular y las prolongaciones a puntos en los que se mantienen las uniones celulares (Figs. 4 y 5). En la superficie se apreció un notable incremento en el número de células necróticas, caracterizadas

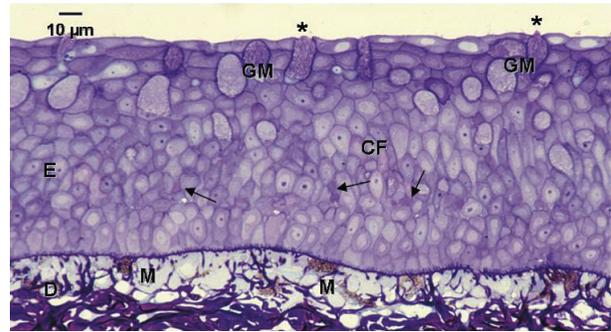


Fig. 2. Piel sana de trucha arco iris. La epidermis (E) es un epitelio pluriestratificado de células filamentosas (CF), con glándulas mucosas (GM) que vierten al exterior (\*). En las capas intermedias pueden observarse linfocitos dispersos (flechas). En la dermis (D), los gránulos de pigmento están concentrados en torno al núcleo de los melanóforos (M). Azul de metileno. Barra=10 µm.

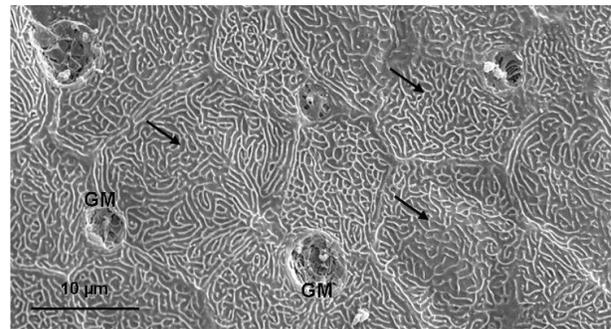
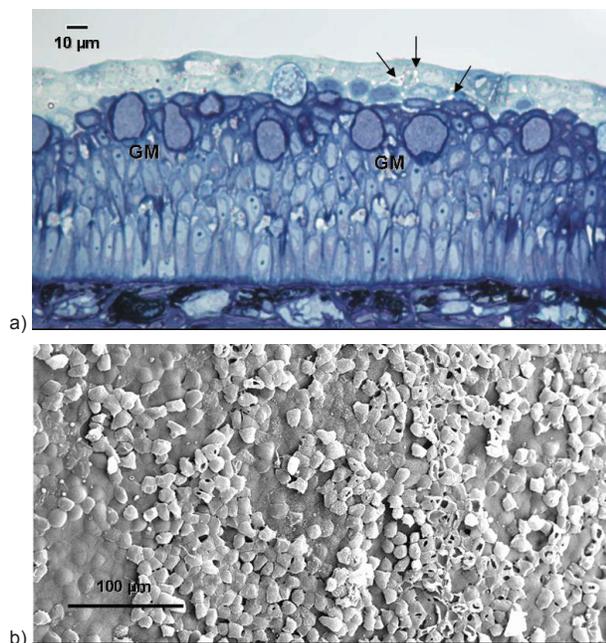


Fig. 3. Piel sana de trucha arco iris. La superficie de la epidermis muestra células epiteliales con micropliegues (flechas) y aberturas de glándulas mucosas (GM). SEM. Barra = 10 µm.

por hinchamiento, pérdida del relieve superficial y separación de la capa epitelial subyacente. El resultado fue una descamación celular acentuada en la capa superficial del epitelio (Fig. 4b).

Con TPA de cuatro horas se acentuaron aún más los espacios acantolíticos y la descamación celular. En algunas de estas muestras, la pérdida masiva de células provocó la ruptura de la continuidad de la superficie epidérmica —que en los peces sanos es lisa—, mostrando abundantes irregularidades; por lo que las células epiteliales redondeadas de las capas medias son las que están en contacto con el exterior (Fig. 6). Como consecuencia, el grosor epidérmico y el número de capas celulares disminuyeron respecto a los controles y a los TPA inferiores (Fig. 7).

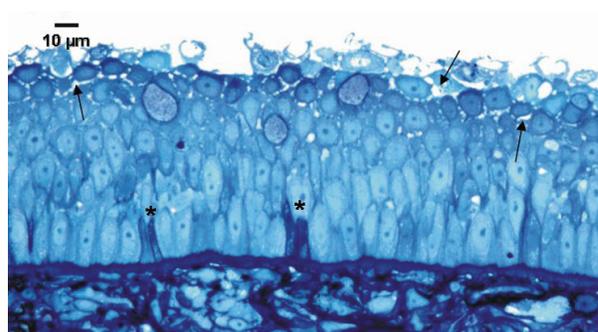


**Fig. 4.** TPA de una hora. *a)* Varias capas celulares en la parte superficial de la epidermis presentan espacios acantolíticos (flechas). En estas capas y en las subyacentes hay abundantes células mucosas (GM). Azul de metileno. Barra=10 µm.; *b)* En la superficie de la epidermis se observa una descamación acentuada de las células epiteliales. SEM. Barra=100 µm.

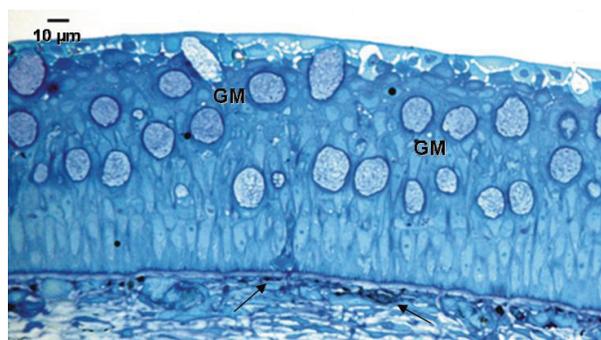


**Fig. 5.** TPA de dos horas. La epidermis presenta espacios acantolíticos en las capas superiores (flechas). Los gránulos de melanina están agrupados en el cuerpo celular de los melanóforos (M) y, en menor medida, distribuidos en las expansiones citoplasmáticas. Fucsina básica. Barra=10 µm.

Después de los TPA de seis y ocho horas, el tejido estaba más estructurado (Fig. 8). En la superficie de la epidermis apareció una capa continua de células epiteliales aplanadas, con gran cohesión y escasos espacios acantolíticos entre ellas. Con TPA de ocho horas, la epidermis presentó un gro-



**Fig. 6.** TPA de cuatro horas. La superficie celular aparece discontinua. Hay abundantes espacios acantolíticos que llegan a las capas epidérmicas medias (flechas). Se observa una disminución del número de capas y del grosor de la epidermis. El número de células mucosas no es elevado. Hay varias células necróticas (\*). Azul de metileno. Barra=10 µm.



**Fig. 7.** TPA de cuatro horas. Se observan numerosas células mucosas (GM) maduras en todo el grosor epidérmico, salvo en la zona basal. En la dermis los gránulos de melanina ocupan los procesos dendríticos de los melanóforos (flechas). Azul de metileno. Barra=10 µm.

sor y un número de capas celulares equiparables a los de la piel sana (Fig. 9).

Respecto a las células mucosas, en las muestras con TPA de una hora se observó que en la mitad superior abundaron las maduras, de gran tamaño, con gran cantidad de gránulos, y con orgánulos y núcleo marginales (Fig. 4a); algunas de ellas están inmersas en las capas que muestran un proceso de descamación masiva. En las muestras con TPA de dos horas, dichas células son escasas (Fig. 5), así como en algunas de las de cuatro horas que ya se ven afectadas por la discontinuidad epidérmica superficial (Fig. 6). Pero en algunas muestras con TPA de cuatro horas se vio un número muy elevado de células mucosas maduras en casi todo el grosor de la epidermis, desde las capas inferiores a la superficie aún no descamada (Fig. 7). En las de TPA de ocho horas, la can-

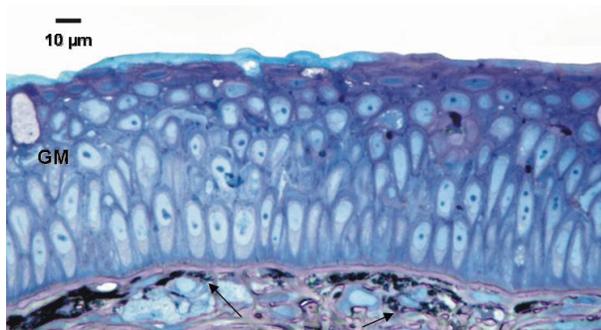


Fig. 8. TPA de seis horas. La superficie celular es continua. La epidermis presenta pocas capas celulares. Las células mucosas (GM) son escasas. Los gránulos pigmentarios aparecen en las prolongaciones dendríticas de los melanóforos (flechas). Azul de metileno. Barra=10 µm.

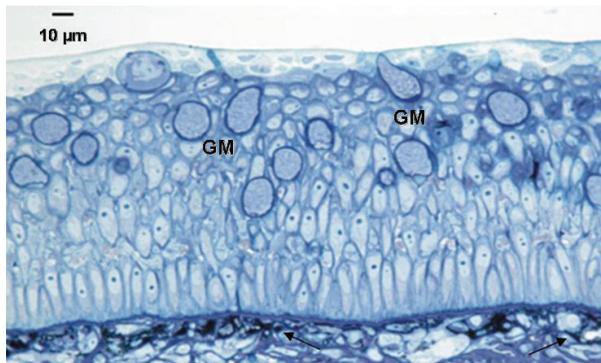


Fig. 9. TPA de ocho horas. Superficie epitelial continua. La epidermis presenta un número de capas y un grosor equivalentes a los de los controles. Hay abundancia de células mucosas (GM) en la mitad superior de la epidermis. Los gránulos pigmentarios están dispersos (flechas). Azul de metileno. Barra=10 µm.

tividad de células mucosas parece similar al de la epidermis sana (Fig. 9). En las células mucosas también se observaron procesos necróticos, sobre todo con el TPA de cuatro horas.

Por su parte, los linfocitos que se observan en la epidermis sana, habitualmente localizados a una altura media y a intervalos regulares (Fig. 2), se mantuvieron en número en las muestras de TPA de una hora (Fig. 4), pero en las de cuatro (Fig. 7) y seis horas (Fig. 8) disminuyó sensiblemente su número. Incluso en los TPA de ocho horas, cuando el grosor de la epidermis parece recuperado, fueron menos abundantes que en la piel sana (Fig. 9).

La localización de los gránulos de melanina en los melanóforos dérmicos varió con los tiempos de postacidificación. En los controles y en las muestras con TPA de una y dos horas se encontraron más concentrados en la parte central de la célula, alrededor del núcleo (Figs. 2, 4a y 5). Por el contrario, con TPA de cuatro, seis y ocho horas, presentaron una disposición más dispersa, extendiéndose a lo largo de las prolongaciones dendríticas de las células (Figs. 7, 8 y 9).

## Discusión

El pH utilizado en este trabajo (5.5) está dentro del intervalo señalado por The European Inland Fisheries Advisory Commission (1969) como seguro para la supervivencia de los peces (5–9). Sin embargo, el tratamiento ha sido suficiente para desencadenar un proceso de alteración en el tegumento, así como para permitir una recuperación posterior del mismo.

La mayoría de los efectos observados en la piel sometida a acidificación puede explicarse como una cadena de consecuencias producida a partir de los daños originados en la superficie de la epidermis. Así puede interpretarse la secuencia: alteración de uniones intercelulares, aparición de espacios acantolíticos, descamación acentuada, ruptura de la continuidad superficial y disminución del número de capas epiteliales. Todo ello conduce, en definitiva, a la eliminación de las células epiteliales directamente dañadas por el medio ácido en la superficie del tegumento. Debe tenerse presente que las fases se solapan y que hay un componente de variabilidad individual en el momento exacto de la manifestación de los efectos, pese a lo cual la tendencia temporal apreciada parece clara.

Los resultados de la acidificación experimental muestran que el bajo pH provoca una descamación de las capas epiteliales superiores, que alcanza su máximo en torno a las cuatro horas de postacidificación. Este proceso comienza con la formación de pequeños espacios intercelulares resultantes de la separación de las membranas plasmáticas de células adyacentes, que quedan unidas en determinados puntos de su superficie por desmosomas persistentes. McDonald (1983) ha postulado que el efecto atenuador de los io-

nes de calcio en las alteraciones causadas por el bajo pH pudiera deberse a su papel en la estabilización de las uniones intercelulares, ayudando así a mantener la integridad de la superficie epidérmica y disminuyendo la permeabilidad intercelular a los iones  $H^+$ . La apertura de espacios acantolíticos propicia la entrada de agua en ellos, por lo que se expanden y se incrementa la separación entre células. Finalmente, estos espacios conducen al desprendimiento de células superficiales al escindirse también las uniones desmosómicas.

A su vez, los procesos de pérdida celular son el origen del adelgazamiento epidérmico que ha sido también observado, aunque como resultado de tiempos mayores de exposición al medio ácido, en otros estudios sobre el efecto del bajo pH en el epitelio de otros teleósteos (Iger *et al.*, 1994a; Iger y Wendelaar-Bonga, 1994). Las discrepancias en los valores del tiempo en el que se alcanzan los mismos resultados pueden deberse a las diferencias en las especies objeto de estudio, los valores de pH empleados, la duración temporal del proceso de acidificación y la temperatura.

La disminución del grosor y del número de capas que componen la epidermis puede considerarse un efecto degenerativo directo del bajo pH sobre el epitelio. La fase de eliminación de las células superficiales dañadas concluye entre cuatro y seis horas después de haberse estabilizado el pH en 5.5, es decir, entre nueve y 11 h después de que los peces empezaran a sufrir el proceso de acidificación del medio. A partir de ese momento se observa claramente el inicio de la regeneración del tejido con el incremento de la cohesión celular, el cierre de la superficie y la recuperación progresiva del número de capas epiteliales. Dos horas más tarde, es decir, con TPA de ocho horas, 13 h después del inicio de la acidificación, el tegumento muestra características muy próximas a las normales; lo que indica un proceso de regeneración muy rápido que tiene lugar en un tiempo equiparable al que puede observarse en la regeneración de heridas, donde el sellado superficial se produce a partir de las tres horas, si bien se han dado valores muy diferentes en función de la temperatura y de la especie considerada (Phromsuthirak, 1977; Iger y Abraham, 1990).

Además, el hecho de no haberse observado procesos fagocíticos por parte de leucocitos migrantes entre las células epiteliales, parece indicar que el incremento de la descamación superficial es el principal método de eliminación de las células dañadas en la acidificación. Esto parece lógico, ya que el agente causal, el medio ácido, necesariamente opera sobre el tegumento en las células expuestas a éste, es decir en las que ocupan la superficie de forma natural o como resultado del daño y la eliminación de las que se encontraban sobre ellas. En *O. mykiss*, Iger *et al.* (1994a) describen la presencia de células necróticas sólo en las capas epiteliales más externas; sin embargo, en el presente trabajo se observó un incremento de tales células en todos los niveles del epitelio, lo que debería desencadenar la aparición de células fagocíticas, al menos en las capas más profundas, como ha sido puesto de manifiesto tanto en *O. mykiss* como en *Cyprinus carpio* (Iger y Wendelaar-Bonga, 1994).

Tras el proceso de eliminación de las capas superficiales dañadas directamente por la acidificación, el pez parece desarrollar una respuesta celular proliferativa en la que se supone participan todos los estratos celulares que componen la epidermis, ya que en teleósteos todas las células filamentosas son capaces de dividirse (Henrikson y Matoltsy, 1968). Esta recuperación del grosor epidérmico fue observada también por Iger y Wendelaar-Bonga (1994) en carpa (*C. carpio*), mostrando además, en exposiciones a pH 5, un engrosamiento epidérmico que supera el espesor de la epidermis sana. Sin embargo, en *O. mykiss* no se observó este tipo de efectos hiperplásicos. La regeneración de la epidermis sometida a acidificación también guarda similitud con lo observado en la piel de truchas sometidas a radiación experimental con UV, si bien, en el caso del pH ácido, al menos con valores de 5.5, no parece producirse la eliminación *in toto* que se observa cuando el agente causal es la radiación UV-B (Noceda *et al.*, 1997).

En la epidermis de teleósteos aparece un patrón de mucogénesis en vez de uno de queratinización, al producirse una capa mucosa de recubrimiento que se dispone sobre las células epidérmicas y cumple importantes funciones frente a agresiones causadas por factores del entorno y por organismos patógenos (Pickering, 1974; Ro-

berts, 1989). Los resultados obtenidos parecen indicar que la acidificación del medio da lugar a una respuesta inicial que consiste en una proliferación de las células mucosas en capas profundas, encaminada a un incremento en la producción de mucus. Puesto que la capa mucosa del exterior de la piel constituye, de hecho, la primera barrera de defensa, es lógico que la respuesta inmediata consista en reforzarla, como ha sido patente con cualquier tipo de agente etiológico, ya sea físico, químico o biológico (Iger *et al.*, 1994a; Iger *et al.*, 1994b; Noceda *et al.*, 1997).

Las observaciones realizadas con TPA de una hora, en las que se muestran células mucosas de pequeño tamaño en las capas epidérmicas inferiores, no permiten dilucidar si son consecuencia de la aparición de nuevas células o de la incipiente maduración de células inmaduras ya existentes. Zuchelkowski *et al.* (1986) sostienen que el aumento temprano en el número de células mucosas es aparente, siendo la maduración de células mucosas ya existentes, pero inmaduras, el efecto inicial del bajo pH. El hecho de que en algunas muestras de TPA de cuatro horas disminuya el número de células mucosas puede ser debido a que el ritmo con el que éstas alcanzan la superficie, vierten su contenido y son eliminadas, es mayor que el de producción de nuevas células. Pero a la disminución del número de células mucosas también debe contribuir la desaparición de las capas celulares más externas, que arrastran consigo a las células mucosas.

Esta misma razón, la desaparición de los estratos de células epiteliales entre los que se encuentran, podría explicar igualmente la disminución de linfocitos observada en los peces sometidos a acidificación. Si esta población de linfocitos desempeña, tal como parece sugerir su disposición en el pez sano, una función de alerta ante posibles infecciones, su disminución se traduciría en menor capacidad de defensa inmunológica frente a los agentes etiológicos externos. La acidificación del medio, por tanto, independientemente de su efecto directo, tendría una importante repercusión en el incremento de la susceptibilidad del pez a todo tipo de patógenos.

El proceso de dispersión de los melanosomas en las expansiones citoplasmáticas de los melanocitos también ha sido observado en *O. mykiss* (Iger *et al.*, 1994a) y *C. carpio* (Iger y Wendelaar-

Bonga, 1994). En estos casos se muestra, además, la penetración de procesos dendríticos de los melanocitos en las capas basales de la epidermis. En el trabajo experimental llevado a cabo no se observó esto, pero sí parece ponerse de manifiesto una tendencia de los pigmentos hacia la dispersión a medida que las muestras corresponden a mayores TPA. No obstante, no se puede afirmar que la acidificación sea necesariamente causa única de la redistribución de la melanina, ya que en todo caso hay que tener en cuenta que la movilización de los pigmentos es la base del funcionamiento normal de estas células pigmentarias.

### Conclusiones

La acidificación del medio, con el valor de pH empleado en el experimento (5.5), produce notables alteraciones histopatológicas en el tegumento de la trucha arco iris, que pueden significar un aumento de la susceptibilidad del animal a otros agentes etiológicos. No obstante los resultados también indican que la epidermis del pez tiene la capacidad de regenerarse y recuperar su estructura inicial tras permanecer ocho horas en el medio acidificado.

### Literatura citada

- BULLOCK, A.M. y R.J. Roberts. 1975. The dermatology of marine teleost fish. I. The normal integument. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 13:383–411.
- EUROPEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION. 1969. Water quality criteria for European freshwater fish—extreme pH values and inland fisheries. *Water Res.*, 3:593–611.
- FLETCHER, T.C. y P.T. Grant. 1969. Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.*, 115:658.
- HARRIS, J.E. y S. Hunt. 1973. Epithelial mucins of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Trans. Biochem. Soc.*, 1:98–100.
- HENRIKSON, R.C. y A.G. Matoltsy. 1968. The fine structure of teleost epidermis. I. Introduction and filament-containing cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 21:194–212.

- IGER, Y. y M. Abraham. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.*, 36:421–437.
- IGER, Y. y S.E. Wendelaar-Bonga. 1994. Cellular responses of skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. *Cell Tissue Res.*, 275:481–492.
- IGER, Y., P.H.M. Balm y S.E. Wendelaar-Bonga. 1994a. Cellular responses of the skin and changes in plasma cortisol levels of trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to acidified water. *Cell Tissue Res.*, 278:535–542.
- IGER, Y., H.A. Jenner y S.E. Wendelaar-Bonga. 1994b. Cellular responses in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Rhine water. *J. Fish Biol.*, 45:1119–1132.
- MARTÍNEZ, J.L. y M.V. López-Dóriga. 1995. Neutrophil granulocytes in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* L.: ultrastructural observations. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 27:459–465.
- MARTÍNEZ, J. L., M.V. López-Dóriga, G. G. Baschwits y C. Fernández-B. de Quirós. 1994. Ultrastructural observations on pigmented macrophages in the epidermis of the brown trout (*Salmo trutta* L.) *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 26: 481-487.
- MASON, J. 1989. Introduction. The causes and consequences of surface water acidification. En: R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown y J.A. Brown (eds.). *Acid toxicity and aquatic animals*. Society for Experimental Biology, Cambridge University Press. Cambridge. pp:1–12.
- MCDONALD, D.G. 1983. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. I. Branchial and renal net ion and H<sup>+</sup> fluxes. *J. Exp. Biol.*, 102:123–140.
- MCWILLIAMS, P.G. 1980. Acclimation to an acid medium in the brown trout *Salmo trutta*. *J. Exp. Biol.*, 88:269–280.
- MITTAL, A.K. y T.K. Banerjee. 1980. Keratinization versus mucus secretion in fish epidermis. *Linn. Soc. Symp.*, 9:1–12.
- NOCEDA, C., S.G. Sierra y J.L. Martínez. 1997. Histopathology of UV-B irradiated brown trout *Salmo trutta* skin. *Dis. Aquat. Org.*, 31:103–108.
- PHROMSUTHIRAK, P. 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.*, 11:193–206.
- PICKERING, A.D. 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.*, 6:111–118.
- PICKERING, A.D. y R. H. Richards. 1980. Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. *Proc. R. Soc. Edinb.*, 79B:93–104.
- ROBERTS, R.J. 1989. (ed.). *Fish Pathology*. 2nd ed, Baillière Tindall, Londres. 467p.
- SUNYER, J.O., E. Gómez, V. Navarro, J. Quesada y L. Tort. 1995. Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52:2339–2346.
- ZUCHELKOWSKI, E.M., R.C. Lantz y D.E. Hinton. 1986. Skin mucous cell response to acid stress in male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* (Lesueur). *Aquat. Toxicol.*, 8:139–148.