

# **EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS**



PROPUESTAS DE EXPERIENCIAS DE LABORATORIO PARA LA  
ENSEÑANZA DE LA FISIOLÓGÍA ANIMAL

Dellagnola, Federico A.

El mantenimiento de la homeostasis: propuestas de experiencias de laboratorio para la enseñanza de la fisiología animal / Federico A. Dellagnola. - 1a ed- - Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo. Secretaría de Investigación, Internacionales y Posgrado, 2025.

Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga  
ISBN 978-987-575-276-4

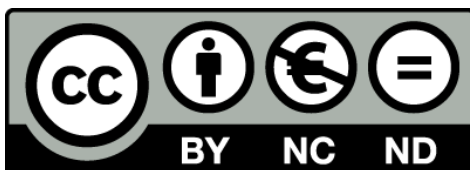
1. Fisiología. 2. Técnicas de Laboratorio. 3. Animales. I. Título.  
CDD 636.0892

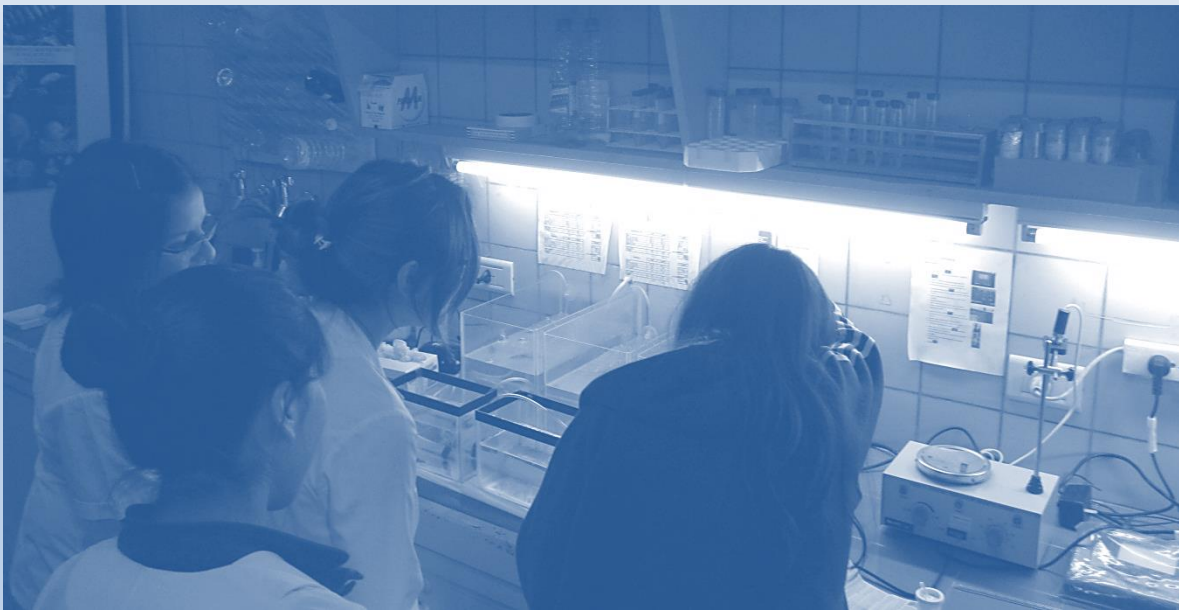
ISBN 978-987-575-276-4



Esta obra está bajo una licencia Creative Commons

Atribución/Reconocimiento-NoComercial-SinDerivados 4.0 Internacional





## **EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS**

### **PROPUESTAS DE EXPERIENCIAS DE LABORATORIO PARA LA ENSEÑANZA DE LA FISIOLÓGÍA ANIMAL**

**2026**



**Dr. Federico A. Dellagnola**

<sup>(1)</sup> Instituto de Histología y Embriología (IHEM – CONICET)

<sup>(2)</sup> Instituto de Fisiología-Facultad de Ciencias Médicas (FCM – UNCuyo)

Fotografía y micrografía óptica (páginas 1, 3, 8, 19, 20, 36, 40, 48, 66, 68, 81, 84, 93, 97, 106, 107, 110, 115, 133, 134, 138): Federico A. Dellagnola. Arte digital (páginas 19, 38, 68, 73, 83, 95, 112, 113, 114, 117, 118, 120, 125, 128, 129, 131): Federico A. Dellagnola.

# CONTENIDOS

<b>EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS .....</b>	<b>1</b>
<b>CONTENIDOS.....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<i>CONSIDERACIONES GENERALES.....</i>	<i>9</i>
<i>EL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO PARA DOCENCIA E INVESTIGACIÓN .....</i>	<i>10</i>
<i>EL BIOTERIO DESTINADO A MANTENER LOS ANIMALES.....</i>	<i>11</i>
<i>LA ESTADÍSTICA EN LAS EXPERIENCIAS DE FISIOLÓGÍA ANIMAL.....</i>	<i>15</i>
<i>RECOMENDACIONES PARA LA PRÁCTICA DEL LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL .....</i>	<i>16</i>
<b>2 EL LENGUAJE DE LAS NEURONAS.....</b>	<b>20</b>
Marco teórico .....	21
Objetivo general de aprendizaje y expectativas de logro .....	24
Material .....	25
Material de laboratorio ( <i>in silico</i> ).....	25
Metodología General.....	25
<i>PARTE A: POTENCIAL DE LA MEMBRANA EN REPOSO.....</i>	<i>25</i>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	26
Metodología y análisis de resultados .....	26
<i>PARTE B: CONSTANTE DE TIEMPO DE LA MEMBRANA.....</i>	<i>27</i>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	28
Metodología y análisis de resultados .....	28
<i>PARTE C: CONSTANTE DE LONGITUD DE LA MEMBRANA.....</i>	<i>29</i>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	30
Metodología y análisis de resultados .....	31
<i>PARTE D: POTENCIAL DE ACCIÓN AXÓNICO .....</i>	<i>32</i>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	33
Metodología y análisis de resultados .....	33
<b>3 OSMORREGULACIÓN EN EL AGUA .....</b>	<b>36</b>
Marco teórico .....	37
Los taxa del experimento.....	39
Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro .....	40
Material .....	41
Material de laboratorio .....	41
Material biológico.....	41
Metodología .....	41
Peces y anfibios.....	42
Crustáceos.....	43
Análisis de resultados .....	44
<b>4 EXCRECIÓN Y TOXICIDAD DEL NITRÓGENO .....</b>	<b>48</b>
Marco teórico .....	49
Los taxa del experimento.....	52
Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro .....	54
Material .....	55
Material de laboratorio .....	55
Material biológico.....	55
Metodología .....	55
Análisis de resultados .....	58
<b>5 LA HOMEOSTASIS DE LA MATERIA .....</b>	<b>66</b>
Marco teórico .....	67

Objetivo general de aprendizaje y expectativas de logro .....	70
<b>PARTE A: LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS SALIVALES .....</b>	<b>70</b>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	70
Material .....	70
Material de laboratorio .....	70
Material biológico.....	71
Metodología .....	71
Análisis de resultados .....	72
<b>PARTE B: UN ESTÓMAGO IN VITRO.....</b>	<b>74</b>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	74
Material .....	74
Material de laboratorio .....	74
Material biológico.....	74
Metodología .....	75
Análisis de resultados .....	76
<b>PARTE C: DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>78</b>
Objetivo parcial y expectativas de logro .....	78
Material .....	78
Material de laboratorio .....	78
Metodología .....	78
Análisis de resultados .....	79
<b>6 EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO .....</b>	<b>81</b>
Marco teórico .....	82
Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro .....	85
Material .....	85
Material de laboratorio .....	85
Material biológico.....	86
Metodología .....	86
Análisis de resultados .....	88
<b>7 CAMBIOS ANATÓMICOS EN RESPUESTA A DESAFÍOS FISIOLÓGICOS.....</b>	<b>93</b>
Marco teórico .....	94
Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro .....	97
Material .....	97
Material de laboratorio .....	97
Material biológico.....	100
Metodología .....	100
Análisis de resultados .....	111
<b>8 NOTAS .....</b>	<b>115</b>
<b>9 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>134</b>
<b>10 ANEXO I: EJEMPLO DE DOCUMENTO CICIAL PARA PROTOCOLOS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>138</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Propuesta de rúbrica para la corrección de informes de la práctica de laboratorio de Fisiología Animal .....	19
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de la interfaz de usuario del software MetaNeuron.....	23
<b>Figura 3.</b> Ejemplo de la interfaz de usuario del software Neurona.....	24
<b>Figura 4.</b> Regulación y conformidad de la presión osmótica extracelular respecto al ambiente.....	38
<b>Figura 5.</b> Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, la madrecita de agua, y la rana de uñas.....	40
<b>Figura 6.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con los valores experimentales de <i>X. laevis</i> , <i>J. lineata</i> , y <i>M. borellii</i> en agua dulce y agua salobre.....	45
<b>Figura 7.</b> Variación porcentual del peso en función del tiempo en 5 ejemplares de <i>X. laevis</i> , <i>J. lineata</i> , y <i>M. borellii</i> .....	46
<b>Figura 8.</b> El efecto de la ionización y temperatura en la toxicidad de NH <sub>4</sub> -N.....	51
<b>Figura 9.</b> Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, el caracol manzana, y el pez dorado.....	53
<b>Figura 10.</b> Límites máximos recomendables para una exposición aguda de amoníaco en distintos taxa de organismos acuáticos.....	54
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con los cálculos de volumen de solución de sulfato de amonio a utilizar en los acuarios experimentales.....	57
<b>Figura 12.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 6,5; 1 mg NAT/L).....	59
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 6,5; 5 mg NAT/L).....	59
<b>Figura 14.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 6,5; 10 mg NAT/L).....	60
<b>Figura 15.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 7,0; 1 mg NAT/L).....	60
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 7,0; 5 mg NAT/L).....	61
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 7,0; 10 mg NAT/L).....	61
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 8,0; 1 mg NAT/L).....	62
<b>Figura 19.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 8,0; 5 mg NAT/L).....	62
<b>Figura 20.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de <i>C. auratus</i> , <i>P. canaliculata</i> , y <i>M. borellii</i> (pH 8,0; 10 mg NAT/L).....	63
<b>Figura 21.</b> Variación de la frecuencia respiratoria en función de la concentración NAT en 5 ejemplares de <i>C. auratus</i> a un potencial hidrógeno de 6,5; 7,0; y 8,0.....	64
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de la anatomía del sistema digestivo de un invertebrado, el caracol manzana.....	68
<b>Figura 23.</b> Ejemplo de tabla a completar con las observaciones de color e intensidad de la solución luego de la experiencia de la Parte A.....	72
<b>Figura 24.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con el registro de las observaciones del experimento de la Parte A.....	73
<b>Figura 25.</b> Ejemplo de tabla a completar con las observaciones luego de la experiencia de la Parte B.....	76
<b>Figura 26.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con el registro de las observaciones del experimento de la Parte B.....	76
<b>Figura 27.</b> Volúmenes de reactivos para preparar las soluciones experimentales para la experiencia de la Parte C.....	79
<b>Figura 28.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo y gráfico de la Absorbancia vs Concentración de Tripsina de la Parte C.....	80
<b>Figura 29.</b> El índice metabólico de los animales en función de su peso corporal y efecto de la temperatura sobre la solubilidad del oxígeno en el agua.....	83
<b>Figura 30.</b> La especie animal elegida para el experimento: el pez limpiafondos.....	84
<b>Figura 31.</b> Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria branquial e intestinal de <i>H. paleatum</i> a 25, 10 y 32 °C.....	89
<b>Figura 32.</b> Variación de la frecuencia respiratoria branquial en función del tiempo en 6 ejemplares de <i>H. paleatum</i> a 25, 10 y 32 °C.....	90
<b>Figura 33.</b> Variación del pH y el oxígeno disuelto en función del tiempo a 25, 10 y 32 °C.....	91
<b>Figura 34.</b> Mecanismos moleculares observados en las células de cloruro de peces teleosteos.....	95
<b>Figura 35.</b> La especie animal elegida para el experimento: la madrecita de agua.....	97

<b>Figura 36.</b> Histología normal de los arcos branquiales de la madre de agua.....	106
<b>Figura 37.</b> Histología de las laminillas primarias de la madre de agua luego de dos tratamientos crónicos a diferente salinidad.....	107
<b>Figura 38.</b> Estimación de la superficie de estructuras histológicas con el programa Image-Pro plus.....	110
<b>Figura 39.</b> Área relativa porcentual de las células de cloruro, células accesorias, y espacios extracelulares respecto al área total de la laminilla primaria de <i>J. lineata</i> en agua dura y agua blanda.....	112
<b>Figura 40.</b> Comparación estadística del área ocupada por las células de cloruro, células accesorias, y espacios extracelulares en la laminilla primaria de <i>J. lineata</i> aclimatados a agua dura y blanda. ....	113
<b>Figura 41.</b> Comparación estadística del número de células de cloruro y células accesorias en la laminilla primaria de <i>J. lineata</i> aclimatados a agua dura y blanda. ....	114
<b>Figura 42.</b> Diagrama del equipamiento y disposición de un acuario experimental genérico. ....	117
<b>Figura 43.</b> Diseño experimental propuesto para la experiencia 3. ....	118
<b>Figura 44.</b> Diseño experimental propuesto para la experiencia 4. ....	120
<b>Figura 45.</b> Tabla de ítems a evaluar en la experiencia 4. ....	122
<b>Figura 46.</b> Diseño experimental propuesto de la experiencia 6. ....	125
<b>Figura 47.</b> Diagrama de la cabeza de un pez del género <i>Hoplisoma</i> .....	128
<b>Figura 48.</b> Diseño experimental propuesto para la experiencia 7. ....	129
<b>Figura 49.</b> Diagrama del set de tinción y diseño experimental propuesto para los preparados microscópicos de la experiencia 7. ....	131
<b>Figura 50.</b> Obtención de tejido branquial en ejemplares eutanasiados de <i>J. lineata</i> luego de dos tratamientos osmóticos diferentes.....	133

# 1 INTRODUCCIÓN





## CONSIDERACIONES GENERALES

La fisiología es la ciencia que se ocupa del estudio de la función animal. Ésta disciplina biológica intenta explicar bajo qué leyes y principios generales funciona un organismo, y las posibles modificaciones de esos principios en respuesta al ambiente dinámico que lo rodea. Históricamente, ha sido una ciencia con una gran cuota empírica y con muchísimas aplicaciones prácticas, no sólo en campos estrictamente biológicos, sino también en disciplinas médicas, veterinarias, ingenieriles y conservacionistas. Esa característica multidisciplinaria y experimental ha etiquetado a la docencia práctica de la fisiología como materia 'cara', 'difícil', o 'compleja' de enseñar.

Uno de los conceptos centrales de la fisiología es el mantenimiento del medio interno en forma continua bajo un complejo y dinámico proceso denominado homeostasis. Esa capacidad de mantener constante el medio interno, sea extracelular o intracelular, es una propiedad fundamental de la vida y prácticamente define al término. De hecho, todavía no hay consenso académico sobre si los virus, organismos acelulares que no tienen metabolismo ni capacidad autorreplicativa, pueden considerarse 'seres vivos'. Homeostasis no es sinónimo de equilibrio termodinámico, que en un sistema complejo como el cuerpo de un animal significa la muerte. La capacidad de mantener la homeostasis a niveles que constituyen la 'norma fisiológica' (por ejemplo, el valor de la constante de concentración de glucosa en los líquidos extracelulares) para una determinada variable (en el ejemplo, la glucosa) no es infinita, ni tampoco universal en todos los organismos. Consume, además, la mayoría de los recursos materiales y energéticos del que dispone un animal en un determinado momento y lugar. Es por ello que en este libro se intentará construir, a partir de la práctica del estudiante en el laboratorio, una visión fisiológica integrada abordando diferentes aspectos taxonómicos, ecológicos, evolutivos, y comparativos. Para la experiencia práctica en la fisiología animal se han seleccionado un conjunto de especies filogenéticamente distantes, evaluando en forma más o menos sencilla sus respuestas a algunos desafíos fisiológicos en condiciones controladas. Para minimizar el estrés y el posible sufrimiento de los sujetos animales, la elección de los taxa y los procedimientos de mantenimiento, experimentación, punto final y eutanasia fueron cuidadosamente elegidos, diseñados y avalados por comités *ad hoc* encargado de regular y asegurar el bienestar animal en investigación y docencia (como ejemplo, mostramos la presentación de los protocolos iniciales en [Anexo I](#); CICUAL -Comité Institucional para el Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio- Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza Argentina; aval N°104/2017). Por otra parte, y como muchas experiencias *in vivo* son dificultosas o incluso controvertidas desde un punto de vista de bienestar animal, se planificó una serie de experiencias *in vitro* de modo de poner a prueba ciertas hipótesis fisiológicas aceptadas por la comunidad científica.

Las actividades prácticas son una excelente excusa para integrar el conocimiento adquirido en forma puramente teórica, ya que 'fisiología' e 'integración' son dos palabras íntimamente relacionadas. Como en la planificación de cualquier experimento, es deseable modificar una variable fisiológica por vez (y por tanto poner a prueba igual número de hipótesis de trabajo), de modo de comprender el funcionamiento de un determinado sistema u organismo. Sin embargo, y a modo de ejercicio, se propone que los alumnos incluyan en el análisis conceptual aseveraciones y posibles explicaciones fisiológicas 'extendidas', que discurran un poco más allá de las inferencias estrictas del experimento. De este modo se pretende lograr una integración eficientemente de los conocimientos de la fisiología animal. Como bibliografía general, se recomienda material pedagógico específico de la Fisiología y la Biología Animal [1-5]. Sin embargo, también es útil tener a mano bibliografía algo más específica acerca de biología celular, molecular, histología, biología animal, y otras subdisciplinas científicas del campo de la biología; y por supuesto, de cada modelo animal individual (ver la selección en la [sección correspondiente](#)).

## **EL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO PARA DOCENCIA E INVESTIGACIÓN**

La manipulación y experimentación con animales en la ciencia y la enseñanza no está exenta de condicionamientos éticos y morales. En la actualidad, hay un consenso moral que establece como imprescindible el respetar y hacer cumplir en los animales, como sujetos sintientes susceptibles de derecho, normas y principios de Bienestar Animal. El bienestar animal puede definirse como la 'calidad de vida', física y mental, de un animal individual a cargo de seres humanos. Sin embargo, el concepto de calidad de vida es problemático ya que incorpora conceptos como 'sentimientos' y otras experiencias subjetivas en un sujeto 'consciente' que son muy difíciles de medir y evaluar científicamente. Dado que los docentes y científicos somos personas, estamos también cargados de normas y valores; gracias al auxilio de otras disciplinas (ej. la filosofía) hemos creado un marco normativo que guía la práctica científica con animales.

En la ética del bienestar animal, es común aplicar como guía de planificación de experimentos el concepto de las 'tres erres' (3R: Refinamiento, Reducción, y Reemplazo). 'Refinamiento' implica el uso y ajustes de la metodología experimental, de forma de aliviar o minimizar el sufrimiento, dolor y estrés. El dolor, definido como un sentimiento displacentero ante un daño o injuria corporal, es inferido por acciones etológicas ('comportamentales') que hacen que el animal evite, luego de un aprendizaje, las situaciones o tratamientos displacenteros o dolorosos. También se utilizan criterios anatómicos en base a la estructura del sistema nervioso animal (por ejemplo, ante la presencia de neurotransmisores, de pequeñas fibras nerviosas amielínicas sensitivas, o un sistema nervioso centralizado y desarrollado). Lamentablemente el esfuerzo de investigación es muy disparado entre los diferentes modelos, por lo que en la mayoría de los animales no se conoce inequívocamente si son capaces de sentir dolor tal cual lo hacemos nosotros. El estrés es un poco más fácil de cuantificar, ya que muchas veces está mediado por hormonas o sustancias locales medibles en los tejidos y líquidos corporales. Por otra parte, y en base a la respuesta comportamental ante situaciones displacenteras, se supone que todo animal experimenta algún tipo de sufrimiento. 'Reducción' es sencillamente disminuir el número de animales en cada experiencia, tarea que puede afectar sensiblemente la interpretación de los resultados (ver siguiente [sección](#)). El 'Reemplazo' implica intercambiar el modelo *in vivo* por uno *in silico* (reemplazo absoluto), o translocar un modelo animal por otro (reemplazo relativo), de forma que en el cambio se mejoren las condiciones de bienestar animal.

En este libro se han aplicado estos tres conceptos en la planificación de la práctica en la fisiología animal, usando métodos refinados (procedimientos y drogas anestésico-analgésicas inherentes a cada modelo [6-9]), reduciendo al mínimo indispensable el número de ejemplares por especie, o reemplazando el modelo por simulaciones o experimentos *in vitro*.

## **EL BIOTERIO DESTINADO A MANTENER LOS ANIMALES**

La ejecución y planificación de estas experiencias prácticas presuponen la existencia de una instalación ('bioterio') que aloje y mantenga a los animales de experimentación cuando éstos no son sometidos a experimentos. Por ello, antes de la planificación experimental, debemos pensar seriamente en las condiciones de nuestro bioterio. Un bioterio es, en términos prácticos, una instalación que aloja a los animales en un ambiente

adecuado para su supervivencia y/o reproducción, asegurando las condiciones de bienestar animal de las especies alojadas y la bioseguridad del personal que trabaja en él. Por otra parte, debe funcionar de forma estandarizada y predecible, de forma que se reduzca la fuente de variabilidad entre los sujetos experimentales y por lo tanto los resultados sean más consistentes. Existe numerosas guías bibliográficas para planificar, mejorar, y mantener bioterios en instituciones públicas dedicadas a la investigación y docencia [por ejemplo, véase [8](#), [10](#)]. Si el bioterio debe ser diseñado *de novo*, es conveniente respetar algunas reglas básicas, por ejemplo:

1. Deben ubicarse lejos de las instalaciones generales o de mucha circulación de personas, pero accesibles directamente desde el exterior para ingresar insumos o retirar desechos.
2. El personal que se encargue del bioterio debe estar bien capacitado en la teoría y práctica del manejo de los animales y en la planificación de las complejas tareas a realizar tanto a corto como a largo plazo. La capacitación, tanto desde un punto de vista técnico como ético, debe ser continua.
3. El ambiente general de la sala debe tener un control de temperatura, iluminación y humedad e idealmente con los servicios mecánicos fuera del bioterio para que su mantenimiento no genere estrés en los animales. Además, las salas deben contar con un sistema de ventilación suficiente para mantener el ambiente libre de vapores y/o exceso de humedad. Es muy importante que la instalación eléctrica cumpla todos los estándares de seguridad (protección diferencial por disyuntores) y esté, en la medida de lo posible, lo más alejada de fuentes de agua.
4. La sala general debe contar con instalaciones de agua caliente/fría y piletas con desagüe que permitan tanto la limpieza de recipientes e insumos en contacto con los animales, como el aseo del personal. Los pisos deben contar con material no resbaladizo y desagües en caso de derrames importantes de líquidos. Las paredes deben estar revestidas con material fácil de limpiar y desinfectar. Puertas y ventadas deben ser a prueba de ingreso de animales (roedores, mosquitos) desde el exterior.
5. Las especies alojadas deben estar separadas entre sí de forma de ajustar los parámetros ambientales adecuados; idealmente, debe existir un área apartada de ingreso de animales

nuevos ('cuarentena') y de enfermería, acondicionadas apropiadamente a los requerimientos de la especie. El fotoperiodo debe ajustarse según los requerimientos estacionales de la especie en la naturaleza. La alimentación debe estar en consonancia con las necesidades alimenticias y nutricionales específicas. El alojamiento, en lo posible, debe estar enriquecido ambientalmente para estimular la cognición y bienestar animal, simulando las condiciones naturales. Sin embargo, debe encontrarse un equilibrio entre enriquecimiento ambiental y estandarización de procesos (por ejemplo, de limpieza).

6. Existencia de un área acondicionada y apta para el almacenamiento de alimentos, desechos o drogas. Es importante contar con un refrigerador de tamaño adecuado.

7. El bioterio debe estar separado de los ambientes de experimentación o 'laboratorios', que son los sitios especialmente acondicionados para llevar adelante las experiencias.

Por otra parte, los bioterios para las especies acuáticas tienen obvias diferencias respecto a las terrestres. Una ventaja a destacar es que las especies mencionadas en nuestro libro necesitan menos espacio físico que el correspondiente a modelos murinos, por poner un ejemplo. Las especies de moluscos, crustáceos, peces y anfibios propuestas aquí para experiencias en Fisiología Animal han sido seleccionadas por su rusticidad, facilidad de mantenimiento, y pequeño tamaño. Todas ellas pueden ser mantenidas hasta completar su ciclo de vida en recipientes ('acuarios') relativamente pequeños y con un equipamiento estándar; sin embargo, este equipamiento mínimo debe estar presente para garantizar las normas de bienestar animal (las características individuales las mencionaremos en cada una de las experiencias). En general, las características que deben cumplir los recipientes contenedores e instalaciones de los bioterios de modelos acuáticos son:

1. Tamaño (volumen en litros) y forma (preferentemente rectangular) de la urna contenedora adecuado a la especie. Los animales no deben estar hacinados; por el contrario (salvo excepciones temporales) tampoco aislados de sus congéneres. El material preferentemente debe ser de vidrio, acrílico, o plástico.

2. Iluminación. Es conveniente instalar luces de intensidad y longitud de onda apropiada a la especie, con un fotoperiodo controlado por un temporizador.

3. Control de la temperatura del agua (si el bioterio tiene un control de aire ambiental eficiente, esto puede obviarse) a través de termómetros y termocalefactores con termostato incluido. Los acuarios de enfermería deben contar con termocalefactores en caso que deba utilizarse tratamiento hipertérmico combinado con quimioterapia para infecciones parasitarias externas [11].

4. Línea de aire con difusión controlada. En algunas especies puede ser necesaria además una bomba de recirculación interna, generalmente asociada a la filtración biológica. Este equipamiento asegura tanto el correcto intercambio de gases (principalmente  $O_2$  y  $CO_2$ ) entre la atmósfera y el agua del acuario, como la ausencia de estratificación térmica y química.

5. Filtro mecánico-biológico. Existen múltiples sistemas de filtración, tanto desde el punto de vista de diseño como de funcionalidad. Básicamente, cualquier filtro consta de una bomba de recirculación que fuerza al agua del acuario a pasar sobre material sintético, natural, de intercambio de sustancias químicas, o asociados a sistemas de sanidad (por ejemplo, adsorción por carbón activado o lámparas germicidas de luz UV). Sin embargo, en ellos debe asegurarse una función biológica: el establecimiento exitoso de colonias bacterianas de procariontes oxidantes de amonio y nitritos [12], productos que son potencialmente tóxicos para la vida acuática [13].

6. Aditivos químicos. Variables según la especie, pero debemos asegurarnos siempre la disponibilidad (y espacio físico adecuado) de ácidos, bases y sistemas de sales buffers para el control del pH; declorinantes y protectores de mucosa. Debemos también tener a mano sustancias analgésicas, antisépticas o quimioterápicas, tales como soluciones de azul de metileno, permanganato de potasio, formalina, antibióticos, antiparasitarios, anestésicos, etc.

7. Instrumental o reactivos de control. Es conveniente, si el tamaño del bioterio es considerable, contar con un control digital de temperatura, oxígeno y pH para monitorear grandes cantidades de agua. Además, no deben faltar termómetros sumergibles y tiras reactivas individuales para estimar el pH, sustancias nitrogenadas ( $NH_3/NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ), sistemas salinos (dureza temporal y permanente de carbonatos/bicarbonatos) y cloro.

Todos los insumos, materiales, y servicios que garantizan los puntos anteriores están disponibles en el mercado, tanto por parte de proveedores de laboratorio como proveedores de animales de compañía, y no debería ser un problema el adaptar el equipamiento a nuestras necesidades edilicias particulares.

## LA ESTADÍSTICA EN LAS EXPERIENCIAS DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Para establecer comparaciones matemáticas fiables entre diferentes grupos experimentales (con potencia estadística), los experimentos deben seguir rigurosos lineamientos en diseño y ejecución empírica. Esto implica proponer una clara pregunta inicial o hipótesis de trabajo, una correcta identificación de la variable de estudio, una precisa identificación de la unidad experimental (¿es un animal individual, una especie, o un acuario individual?), una correcta aleatorización para separar a las unidades experimentales y asignarlas a los diferentes tratamientos, un correcto número de repeticiones experimentales, y un control (disminución) de la variabilidad del experimento, ajustando las condiciones ambientales y el entrenamiento en la medición. Por otra parte, la estandarización genético-ambiental en un bioterio puede también disminuir la variabilidad, disminuyendo la posibilidad de que la diferencia entre dos o más grupos experimentales sea explicada por el azar. Todos estos factores son estudiados en profundidad por disciplinas bioestadísticas y muchas veces, si no se dispone de tiempo y conocimiento previo, son muy difíciles de identificar por los alumnos (aún por los docentes e investigadores). Sin embargo, el principal problema que enfrentamos en el estudio de la fisiología animal con animales vivos es el tamaño de la muestra ( $n$ ). Sucede que utilizando un diseño apropiado y cumpliendo correctas condiciones experimentales, el aumento de  $n$  aumenta la posibilidad de encontrar diferencias; pero en contraposición, es éticamente recomendable que  $n$  sea pequeño. Este problema es especialmente importante en experimentos con una variabilidad intrínseca muy grande, como ser el estudio de variables etológicas. Esto conduce al 'problema de las tres e': Estadístico ( $n$  insuficiente), Económico (el aumento de  $n$  es caro), y Ético (un  $n$  excesivo no es ético si se trabaja con animales). Un problema adicional es que un  $n$  grande disminuye la probabilidad que los comités de bioética animal aprueben los protocolos experimentales. En contraposición, un  $n$  demasiado pequeño también puede ser rechazado por ética, ya que, si el experimento no

tiene potencia estadística, el sacrificio de pocos animales habrá sido en vano porque los resultados no serán concluyentes.

Se debe aclarar que las experiencias de este libro están dedicadas a la docencia y no están diseñadas para obtener resultados estadísticos potentes, por lo que no se presentarán, salvo explícitas excepciones, recomendaciones acerca del uso de test estadísticos o resultados orientados a la estadística paramétrica. Por otra parte, el número de animales descripto para las experiencias tampoco permite una precisión y exactitud con altos niveles de significancia estadística (valor  $p$  pequeño). Sin embargo, y si el plan de estudios lo permite, es altamente recomendable articular estos contenidos con los responsables docentes de espacios curriculares relacionados con la bioestadística. Así se puede practicar, a partir de nuestras mediciones empíricas, el empleo de test de comparación de medias muestrales, diseños experimentales diferentes, cálculos de  $n$  mínimos, etc.

## **RECOMENDACIONES PARA LA PRÁCTICA DEL LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL**

Las experiencias propuestas en este libro han sido testeadas y usadas en la docencia universitaria de la fisiología animal durante varios años. Sin embargo, la manipulación por parte de los alumnos, el estado de salud, estadio del ciclo de vida, y la variabilidad fenotípico-genética de los individuos animales, sumado a un bajo tamaño estadístico de la muestra puede incrementar la dispersión de los resultados medidos en cada ensayo particular. Por otra parte, los programas de estudios de las universidades o colegios no son uniformes y varían tanto en el número como en la profundidad de tópicos fisiológicos a cubrir en el proceso de enseñanza -aprendizaje. Por ello es que se insta al tutor a utilizar esta sección como una guía general, susceptible a modificarse según el criterio docente. Las siguientes son simples recomendaciones para que el tutor saque el mayor provecho de los procedimientos experimentales en las experiencias prácticas de la Fisiología Animal propuestas:

1. Inculquemos a los alumnos el respeto de las normas de bioseguridad del laboratorio. Es deseable que el tutor proporcione y asegure el correcto uso de material de protección adecuado (guantes, material de seguridad descartable, etc.).



2. Si bien no se propone la utilización de material químico/biológico peligroso, es recomendable utilizar ropa adecuada en estas experiencias prácticas. Por ello, tutores y alumnos deberán usar guardapolvo cada vez que asistan al laboratorio. También es recomendable llevar el cabello recogido y evitar dentro de lo posible el uso de objetos personales como pulseras, relojes, aros o collares que pudieran interferir en la manipulación de elementos, preparación de reactivos, o manipulación de animales vivos.
3. Insistamos en el respeto de las normas de convivencia. Si ensuciamos, limpiamos. Si desordenamos, ordenamos. Es conveniente estimular el orden para que la actividad práctica sea lo más placentera posible.
4. Tratemos de ser cuidadosos en la manipulación tanto de sustancias irritantes como de animales vivos. Evitemos incidentes innecesarios o incómodos que nos desvíen del objetivo central de la experiencia práctica.
5. Capacitemos e instemos a los alumnos para identificar síntomas comportamentales o claros signos de sufrimiento del animal sujeto a experimentación, de forma de detener el experimento en caso de considerarlo necesario. Para ello debemos conocer de antemano las bases fisiológicas del estrés y la etología del modelo animal con el que estemos trabajando.
6. Tengamos clara la hipótesis para lo cual fue planificado el experimento. Los alumnos deben recordar que una hipótesis científica es una afirmación que es puesta a prueba, de modo que, al concluir la etapa experimental, esta afirmación es aceptada o rechazada.
7. Seamos críticos y minuciosos. Mantengamos a las variables que no están sometidas a prueba lo más uniformes posibles (controladas), de modo que las conclusiones sean consistentes y sólidas.
8. Es fundamental que los alumnos anoten no sólo el valor de la variable que medimos en el experimento, sino todo lo que 'observamos' o que llame la atención durante el período experimental, aunque no parezca relevante. Muchas de estas observaciones pueden ayudar luego en la correcta interpretación de los resultados experimentales.

9. Los alumnos deben identificar, si existe, cuál es el control del experimento. El grupo control, a diferencia del grupo experimental, es fundamental para establecer posibles diferencias estadísticamente significativas atribuidas a la variable experimental estudiada. Recordemos que las pruebas no están diseñadas para una potencia significativa alta. El control experimental puede ser positivo (utilizando un grupo control que sepamos de antemano responde efectivamente al diseño experimental) o negativo (que elimina posibles fuentes de sesgo o variables no puestas a prueba en nuestro diseño experimental).

10. Al concluir la experiencia, debemos definir bien qué es lo que cuantificamos, qué es lo que observamos, y cómo explicamos esas observaciones. Es útil que los alumnos infieran interpretaciones sobre mecanismos fisiológicos concretos por sobre generalizaciones metabólicas imprecisas.

11. Concluyamos sobre la hipótesis experimental. En una etapa inmediata posterior podemos discutir otros mecanismos fisiológicos y si el resultado experimental está de acuerdo con el marco teórico previo.

12. Nada mejor para fijar conocimientos, que describirlos! Alentemos a los alumnos a diseñar un breve pero sólido informe, que resuma concisamente toda la experiencia. Tomemos de guía las preguntas que proponemos aquí luego de la descripción de cada experiencia, pero con la suficiente libertad en plantear otras preguntas y posibles explicaciones alternativas.

13. El informe a desarrollar por los alumnos puede estructurarse en forma similar a un trabajo científico, es decir, con secciones bien definidas (por ejemplo, con un título, introducción, hipótesis/objetivos, materiales & métodos, y discusión/conclusión). Alentemos en el ejercicio de la escritura del informe la creatividad, pero con el uso de un correcto y conciso lenguaje científico y el respeto de los plazos temporales de entrega.

14. Es deseable que el tutor corrija el informe y haga una devolución al alumno en forma individual, siguiendo un criterio serio y uniforme. El siguiente es un ejemplo del criterio (rúbrica de evaluación, [Figura 1](#)) que puede utilizarse en la corrección de las experiencias prácticas de laboratorio de fisiología animal:

	<b>Grado máximo (4)</b>	<b>Grado intermedio (3)</b>	<b>Grado intermedio (2)</b>	<b>Grado mínimo (1)</b>
<b>Estructura del Informe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Secciones del informe (ej.: Introducción – Metodología – Hipótesis/objetivos – Resultados – Discusión y conclusiones) bien definidas.</li> <li>Títulos y subtítulos claros.</li> <li>Redacción acorde a la sección correspondiente (ej.: nunca infiere conclusiones en la sección de resultados).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Secciones del informe (ej.: Introducción – Metodología – Hipótesis – Resultados – Discusión y conclusiones) bien definidas.</li> <li>Títulos y subtítulos claros.</li> <li>A veces expresa interpretaciones en la sección resultados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Secciones del informe no muy bien definidas (ej.: mezcla la hipótesis con los objetivos, o no los define en absoluto).</li> <li>Títulos y subtítulos claros.</li> <li>Frecuentemente expresa interpretaciones en la sección resultados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Secciones no definidas.</li> <li>Sin títulos ni división en secciones.</li> <li>La redacción es muy incoherente y enrevesada.</li> </ul>
<b>Calidad de la escritura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No comete errores ortográficos o de sintaxis.</li> <li>La escritura es muy clara, concisa y coherente.</li> <li>Expresa las unidades de medida correctamente, e identifica claramente la variable a poner a prueba.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No comete errores ortográficos o de sintaxis.</li> <li>La escritura es clara, pero usa oraciones muy largas o a veces con uso incorrecto de verbos.</li> <li>Expresa las unidades de medida correctamente, e identifica claramente la variable a poner a prueba.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comete muy pocos errores ortográficos o de sintaxis.</li> <li>La escritura no es muy clara, es dificultoso seguir las ideas principales o el hilo conductor.</li> <li>Expresa las unidades de medida correctamente, e identifica claramente la variable a poner a prueba.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El informe está repleto de errores ortográficos y de sintaxis.</li> <li>Es imposible seguir las ideas principales o el hilo conductor.</li> <li>No expresa las unidades de medida correctamente, y no identifica claramente la variable a poner a prueba.</li> </ul>
<b>Creatividad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utiliza los resultados disponibles de forma muy original.</li> <li>Presenta (correctamente) los datos de forma diferente a los proporcionados en los resultados "crudos" del experimento.</li> <li>Indudablemente no hay "copy and paste".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utiliza los resultados disponibles de forma original.</li> <li>Presenta (correctamente) los datos de forma diferente a los proporcionados en los resultados "crudos" del experimento.</li> <li>No hay evidencia de "copy and paste".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utiliza los resultados disponibles de forma original.</li> <li>Presenta (correctamente) los datos de la misma forma a los proporcionados en los resultados "crudos" del experimento.</li> <li>Existe "copy and paste" pero sólo en la introducción.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utiliza los resultados disponibles escasa o nula interpretación.</li> <li>Presenta (incorrectamente) los datos de la misma forma a los proporcionados en los resultados "crudos" del experimento.</li> <li>Existe evidente "copy and paste".</li> </ul>
<b>Interpretación y validación de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interpreta correctamente los resultados, con originalidad y claridad.</li> <li>Presenta figuras o tablas elegantes y vistosas.</li> <li>Siempre que fue posible, validó estadísticamente los datos utilizando los test estadísticos correctos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interpreta correctamente los resultados.</li> <li>Presenta figuras o tablas correctamente.</li> <li>Validó estadísticamente los datos pero no utilizó los test estadísticos correctos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En general, interpreta correctamente los resultados.</li> <li>La presentación de figuras o tablas es correcta, pero con errores manifiestos en unidades, ejes o variables.</li> <li>No validó estadísticamente los datos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En general, interpreta pobremente los resultados.</li> <li>La presentación de figuras o tablas es inconsistente, errónea y muy pobre.</li> <li>No validó estadísticamente los datos.</li> </ul>

Figura 1. Propuesta de rúbrica para la corrección de informes de la práctica de laboratorio de Fisiología Animal

## 2 EL LENGUAJE DE LAS NEURONAS



## Marco teórico

El cuerpo de los animales es una máquina compleja altamente organizada en un cúmulo de células, tejidos, órganos y fluidos corporales que funciona completamente integrada. Este asombroso conjunto de moléculas biológicas, sus vías metabólicas, y sus variables fisiológicas están finamente controladas por tejidos y sistemas especializados. Dos de ellos se destacan como reguladores por excelencia: el control del sistema hormonal y el control del sistema nervioso. Este último, que es rápido y específico, permite a un animal recibir e interpretar estímulos, integrar la información interna y externa, y organizarla en una apropiada respuesta corporal. Específicamente, ese rol lo cumplen células altamente especializadas, derivadas del ectodermo y organizadas en complejos circuitos que se llaman neuronas. Estos circuitos no son simples teclas *on-off* análogos a los circuitos de las computadoras, sino que pueden ser modulados, filtrados o amplificados por esa intrincada y gigantesca red de células que conforman el sistema nervioso. En forma universal, las sorprendentes propiedades emergentes que poseen todos los sistemas nerviosos animales están basadas en sencillas propiedades eléctricas que poseen las neuronas. La comunicación nerviosa y su lenguaje particular, se basa en la conducción de corriente eléctrica a través de las células nerviosas. Esa corriente eléctrica puede pasar directamente de una neurona a otra (sinapsis eléctrica) o establecer relevos químicos (sinapsis química) entre una célula y otra, donde la señal eléctrica continúa en la dirección del circuito correspondiente.

A lo largo del estudio de la fisiología animal estudiaremos muchas de las propiedades emergentes del sistema nervioso, pero en este trabajo práctico nos centraremos en algunas de las propiedades que tienen las neuronas. La neurona típica es una célula polarizada, que tiene un núcleo y soma bien definido pero que extiende su protoplasma a través de finas, largas y extensas prolongaciones, denominadas neuritas. Esas neuritas pueden conducir la información (que si es mediada por una neurona presináptica es una corriente eléctrica) en forma aferente hacia el soma. Esas prolongaciones neuríticas aferentes de la célula postsináptica se llaman dendritas. La información eléctrica es modulada e integrada en el soma desde donde parte nuevamente en forma de corriente eléctrica eferente a través del axón, el cual termina generalmente en sinapsis con otras neuronas, aunque a veces la respuesta puede liberar sustancias mediadoras (neurohormonas) o volcarse sobre un tejido efector (como por ejemplo el músculo).

En esta actividad práctica exploraremos algunas de las propiedades eléctricas de las neuronas; veremos por ejemplo cómo se genera pasivamente un potencial de membrana basal o 'en reposo' simplemente por la permeabilidad selectiva de la membrana a algunos iones (que son los que, al ingresar o salir, determinan esa corriente eléctrica propagada a través de las neuritas). También estudiaremos de forma práctica algunas constantes que intervienen en las ecuaciones que describen la propagación eléctrica en la neurona, o cómo se integran en la neurona múltiples señales en el tiempo y el espacio. Para esto, haremos algunas simulaciones computacionales que permiten modelar el cambio de voltaje en la membrana de algunas neuronas utilizando el software MetaNeuron Versión 2.03 [14]. MetaNeuron es un programa ejecutable (no necesita instalación en la computadora personal) que ejemplifica en forma simple y gráfica algunas de las propiedades eléctricas de la neuronas [15].

La interfaz del programa es sencilla y permite modificar algunos parámetros a estudiar, escribiendo directamente el parámetro en la casilla o espacio de texto correspondiente, o moviendo el cursor de la computadora arriba o abajo sobre unas casillas grises. Algunos parámetros, sombreados de color gris, no pueden cambiarse, porque son variables dependientes de otros parámetros independientes (Figura 2A).

Otros parámetros (generalmente, umbrales de voltaje o cambios dinámicos en el potencial de membrana) pueden graficarse en la pantalla de la computadora. Las trazas del gráfico tienen diferentes colores, cuya referencia se muestra a la derecha de la pantalla. El eje X representa el tiempo (en milisegundos) mientras que el eje Y representa el voltaje (en milivoltios) (Figura 2B). Cambiando la opción 'Sweep duration' (tiempo de barrido) puede ampliarse o reducirse el rango del tiempo en el eje X.

Al seleccionar 'Range', aparece una familia de curvas que dependen del valor del parámetro definido. En el panel de rango se puede programar el valor de inicio y fin del rango del parámetro en cuestión, así como el valor de incremento deseado del parámetro (Figura 2C). Al mover el cursor sobre las curvas graficadas, en la esquina inferior derecha aparece en tiempo real el valor del voltaje en función del tiempo. Finalmente, la caja '3D' permite graficar en tres dimensiones el voltaje, tiempo y valor del parámetro elegido. Superponiendo el cursor encima del gráfico el mismo puede moverse libremente a través de sus tres ejes (Figura 2D). Éstas son sólo algunas de las posibilidades que ofrece este simulador neuronal.

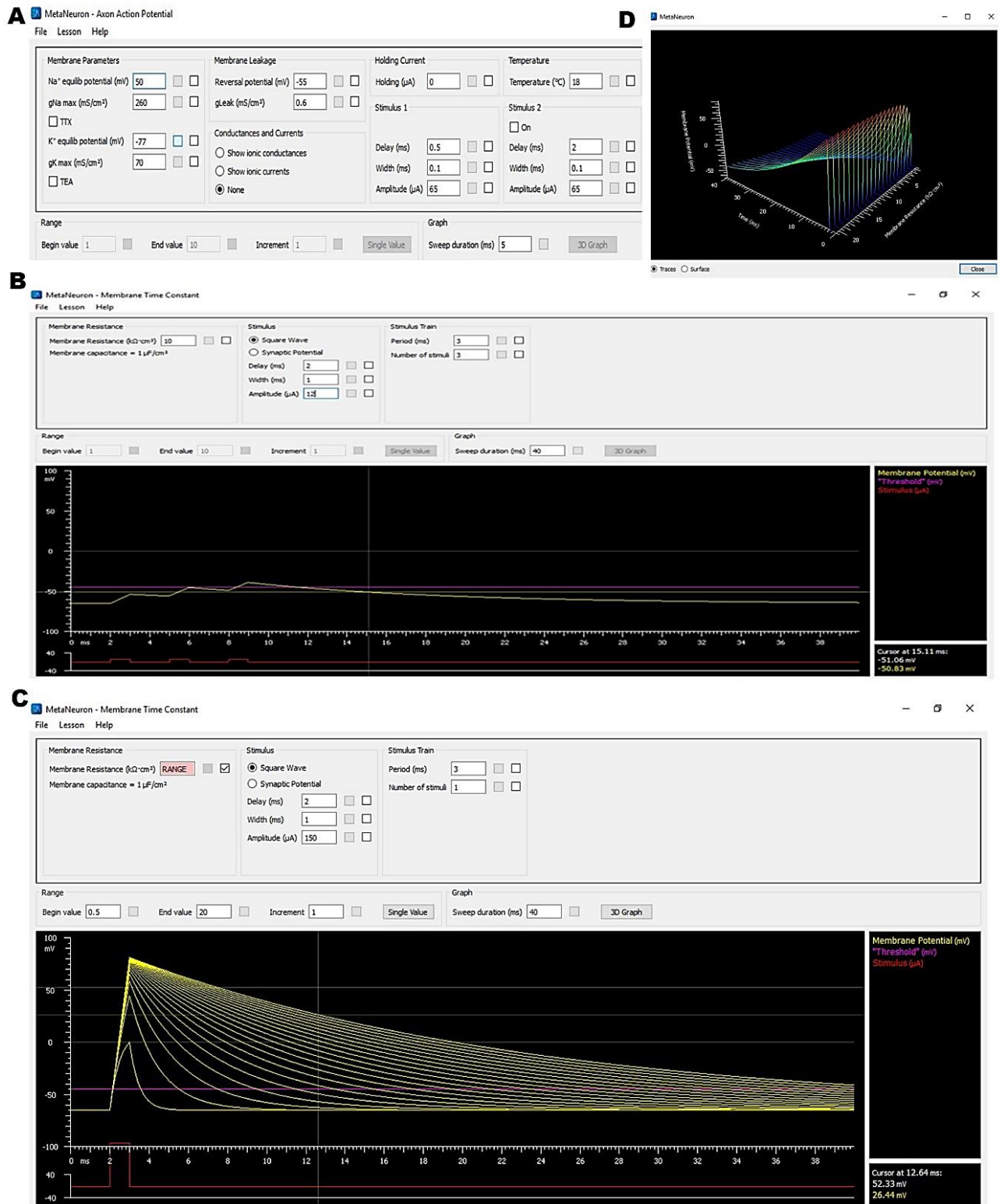


Figura 2. Ejemplos de la interfaz de usuario del software MetaNeuron

**A.** Casillas y opciones para cambiar algunos parámetros fisiológicos de la neurona en MetaNeuron. **B.** Trazas gráficas de algunos parámetros y referencias en colores de las curvas y potenciales de reposo. **C.** Familia de curvas al seleccionarse un rango de parámetros determinado en MetaNeuron. El eje X representa el tiempo (en milisegundos) mientras que el eje Y representa el voltaje (en mV). **D.** Gráfico 3D que muestra a los tres parámetros seleccionados y sus correspondientes familias de curvas en MetaNeuron. Imágenes obtenidas desde la interfaz del software [15].

Finalmente, utilizaremos otro simulador, Neurona 1.1.18, que cuenta con una excelente y amigable interfaz (Figura 3) desarrollada por PhET™ Interactive Simulations [16]. Este programa es excelente para entender e integrar cómo funcionan los canales iónicos involucrados en el potencial de acción del axón, y en particular para entender visualmente que los fenómenos eléctricos que estudiaremos ocurren siempre en adyacencias de la membrana plasmática sin afectar significativamente la carga eléctrica general del axón.

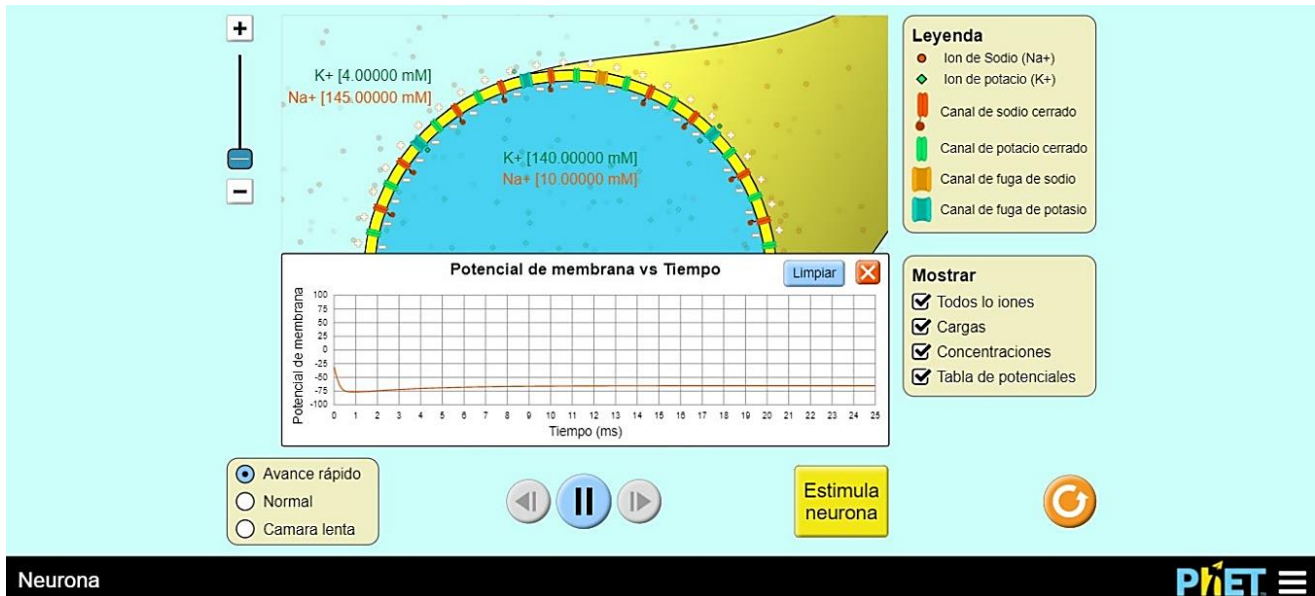


Figura 3. Ejemplo de la interfaz de usuario del software Neurona  
 Captura de pantalla del programa desarrollado en la Universidad de Colorado por PhET™ Interactive Simulations [16].

Nosotros exploraremos algunas de las posibilidades que ofrecen ambos programas a lo largo de este primer trabajo de laboratorio, al cual dividimos en cuatro partes con una breve introducción teórica asociada.

### Objetivo general de aprendizaje y expectativas de logro

El objetivo general de esta sección es que los estudiantes comprendan las bases electrofisiológicas de la transmisión de información en y entre las células nerviosas. Es deseable que luego de las experiencias los estudiantes sean capaces de comprender la importancia del sistema nervioso como conjunto integrador de las funciones orgánicas tanto a corto como mediano plazo, y que relacionen además la interacción con otros sistemas de control en marcos temporales diferentes.



## Material

Material de laboratorio (*in silico*)

- Computadora y acceso a internet.
- Software MetaNeuron versión 2.03. Es un programa gratuito, autoejecutable (no necesita instalación) que está disponible, con fines académicos, en la siguiente dirección Web: <https://www.metaneuron.org>.
- Software Neurona versión 1.1.18. Es un programa gratuito, autoejecutable disponible, con fines académicos, en la siguiente dirección Web: [https://phet.colorado.edu/sims/html/neuron/1.1.18/neuron\\_es\\_PE.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/neuron/1.1.18/neuron_es_PE.html).

## Metodología General

Esta práctica de fisiología es completamente virtual y se recomienda resolverse sobre la plataforma virtual de la institución. Para ello, deben cargarse y editarse las preguntas con suficiente anticipación, asegurando el acceso de los alumnos en un plazo previamente estipulado. La experiencia propuesta está dividida en cuatro partes con su correspondiente introducción teórica y metodología.

## PARTE A: POTENCIAL DE LA MEMBRANA EN REPOSO

En esta parte estudiaremos cómo se genera el potencial en reposo en la membrana de una neurona genérica, basado simplemente en la permeabilidad selectiva de cada ion dentro y fuera de la membrana. Aunque los canales proteicos y los iones pueden variar, en todos los potenciales de membrana participan siempre dos iones: el catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el catión Potasio ( $\text{K}^+$ ). El programa MetaNeuron calcula el potencial de equilibrio de cada ion utilizando la ecuación de Nernst:

$$\text{Potencial de equilibrio del ion X (mV)} = 58 \log ([\text{ion X}]_o / [\text{ion X}]_i)$$

Siendo  $[\text{ion X}]_o$  y  $[\text{ion X}]_i$  la concentración del ion estudiado fuera y dentro de la membrana plasmática respectivamente. Recordemos que el potencial de membrana no sólo depende de la suma de los potenciales individuales de cada ion, sino también de su permeabilidad relativa, como lo expresa la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$\text{Potencial de Membrana (mV)} = 58 \log \left( \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \right)$$

El programa MetaNeuron no incluye en su simulación al ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) que también contribuye *in vivo* al potencial de reposo.

### **Objetivo parcial y expectativas de logro**

El objetivo de esta sección es evaluar algunas propiedades del potencial electroquímico en equilibrio de los iones individuales y del potencial de membrana en reposo. Se espera que los alumnos identifiquen al catión sodio como principal componente extracelular y al catión potasio como principal catión intracelular, identificando además al catión potasio como principal determinante al potencial de membrana por ser 65 veces más permeable.

### **Metodología y análisis de resultados**

- En MetaNeuron, seleccionar en la solapa superior 'Lesson 1' (o alternativamente, la tecla F1).

#### **A.1. Potencial electroquímico en equilibrio:**

1. Varíe la concentración de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , tanto adentro como afuera de la célula. Registre el comportamiento de la curva de voltaje de cada ion.
2. ¿Cuál es el potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$  cuando el  $\text{Na}^+_o$  es igual a 100 mM y el  $\text{Na}^+_i$  es igual a 10 mM?
3. ¿Cuál es el potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$  cuando el  $\text{Na}^+_o$  es igual a 100 mM y el  $\text{Na}^+_i$  es igual a 100 mM?

4. ¿Cuál es el potencial de equilibrio de  $K^+$  cuando el  $K^+_o$  es igual a 10 mM y el  $K^+_i$  es igual a 100 mM? ¿Por qué?
5. ¿Qué efecto general tiene cambiar las concentraciones sobre el potencial de equilibrio electroquímico de cada ion?

### **A.2. Potencial de membrana en reposo:**

Con los valores predeterminados (File-Restore all to default), varíe la permeabilidad relativa de la membrana a  $K^+$  y  $Na^+$ . Establezca  $Na^+_o$  en 100 mM,  $Na^+_i$  en 10 mM,  $K^+_o$  en 10 mM y  $K^+_i$  en 100 mM.

6. ¿Cuál es el potencial de membrana cuando la permeabilidad relativa al  $Na^+$  es igual a 0 y la permeabilidad relativa al  $K^+$  es igual a 10?
7. ¿Cuál es el potencial de membrana cuando la permeabilidad relativa al  $Na^+$  es igual a 10 y la permeabilidad relativa al  $K^+$  es igual a 0?
8. ¿Cuál es el potencial de membrana cuando la permeabilidad relativa al  $Na^+$  es igual a 1 y la permeabilidad relativa al  $K^+$  es igual a 10? ¿Por qué pasa esto?
9. ¿Qué efecto tiene variar la permeabilidad relativa general (del sodio y potasio) sobre el potencial de membrana en reposo?

## **PARTE B: CONSTANTE DE TIEMPO DE LA MEMBRANA**

En esta parte estudiaremos una de las propiedades más importantes de la membrana neuronal, la constante de tiempo *tau* ( $\tau$ ). Cuando experimentalmente aplicamos una corriente eléctrica constante (con el sentido adecuado) a través de la membrana de una neurona, la membrana se despolariza en ambos sentidos con un curso de tiempo exponencial. De la misma forma (exponencial) el potencial de la neurita vuelve al potencial en reposo cuando cesa el estímulo. La constante de tiempo se define entonces como el tiempo en que la membrana tarda en alcanzar el 63% de su valor final (en la carga) o reducirse hasta un 37% de su valor inicial (en la descarga). Por otra parte, esta constante

depende de dos valores, la resistencia de la membrana ( $R_m$ ) y la capacitancia de la membrana (C) según la siguiente ecuación:

$$\text{Constante de Tiempo } \tau \text{ (ms)} = R_m C$$

La capacitancia de la neurona modelada por el programa MetaNeuron es de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  de membrana. El programa permite variar la resistencia de la membrana, el curso temporal, y la amplitud de la corriente aplicada. El valor por default de corriente se aplica en 1 ms de pulso despolarizante, que es una buena aproximación de lo que ocurre en una típica neurona con una sinapsis excitatoria rápida. El estímulo de corriente se muestra en rojo, mientras que el potencial umbral (por encima del cual se produciría un potencial de acción) se muestra en púrpura.

### ***Objetivo parcial y expectativas de logro***

El objetivo de esta sección es entender conceptos asociados a la constante de tiempo en el axón de una neurona típica, se espera que los alumnos sean capaces de calcular en forma teórico-práctica la constante  $\tau$  (tau) a partir de la fórmula matemática y desde el gráfico a partir de cálculos de porcentaje de caída de voltaje en las curvas simuladas; se espera además que puedan estimar el valor en el cual se podría iniciar un potencial de acción si diferentes potenciales locales (excitatorios o inhibitorios) se suman en el tiempo.

### ***Metodología y análisis de resultados***

- En MetaNeuron, seleccionar en la solapa superior 'Lesson 2' (o alternativamente, la tecla F2).

#### **B.1. Constante de tiempo de la membrana:**

10. Utilizando los parámetros predeterminados, determine la constante de tiempo de la membrana extrapolando con el cursor en el eje X el tiempo en que el potencial de membrana desciende a un valor de 63% del valor de referencia, luego que cesa el impulso de corriente aplicado.

11. Aumente el estímulo a  $150 \mu\text{A}$  y repita la medición.

12. El valor experimental obtenido de  $\tau$  ¿Es igual al obtenido por la ecuación?
13. El valor de  $\tau$  al cambiar la amplitud de la corriente ¿Ha cambiado? ¿Por qué?

### **B.2. Constante de tiempo y resistencia de la membrana:**

14. Con la amplitud del estímulo a  $150 \mu\text{A}$ , varíe la resistencia de la membrana. Marque la casilla de rango 'Resistencia de la membrana' y elija valores de rango de 0.5, 20 y 2 (valor inicial, valor final e incremento). Establezca la resistencia de la membrana en  $2 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ . ¿Cuál es la constante de tiempo de la membrana, medida a partir de la fase descendente de la respuesta?
15. Al mostrar la familia de curvas que muestran el efecto de variar la resistencia de la membrana utilizando la función de rango de MetaNeuron ¿Qué efecto tiene esto en las fases ascendente y descendente de la respuesta?

### **B.3. Sumación temporal de estímulos:**

16. Con los valores predeterminados (File - Restore all to default), aumente el 'número de estímulos' de 1 a 3. Este estímulo representa 3 potenciales sinápticos generados en intervalos de 2 ms. Observe cómo se suman las respuestas. Esta superposición de respuestas se denomina sumación temporal. Ahora reduzca la resistencia de la membrana de 10 a  $2 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ . ¿Qué efecto tiene disminuir la resistencia en la sumación temporal?
17. ¿En cuál valor de resistencia podría existir un potencial de acción? (observe la línea púrpura que muestra el umbral de excitación).

## **PARTE C: CONSTANTE DE LONGITUD DE LA MEMBRANA**

En esta sección, estudiaremos otra propiedad eléctrica que tienen las membranas plasmáticas de las neuronas y que está relacionada con la pérdida (pasiva) de voltaje en procesos neuronales desnudos (por ejemplo, las dendritas) a medida que la despolarización de la membrana plasmática avanza a lo largo de la dendrita. La descripción

del decaimiento (exponencial) del voltaje en función de la longitud que se produce en una dendrita fue formulada hace más de un siglo por las ecuaciones de la teoría del cable, que involucra en el modelo matemático asociados cilindros segmentados con capacitancia y resistencia ubicadas en paralelo. En las ecuaciones de cable intervienen entonces diversos parámetros, en particular la resistencia de la membrana ( $R_m$ ) la resistencia (o resistividad) interna de la dendrita ( $R_i$ ), la capacitancia de la membrana, y el diámetro de la dendrita. De esas ecuaciones cobra importancia una constante, la constante de longitud lambda ( $\lambda$ ) que se define como la distancia desde donde el voltaje cae al 37% de su valor original (o decae un 63%) luego de aplicar un estímulo despolarizante. En forma genérica, lambda se define genéricamente así:

$$\text{Constante de longitud } \lambda (\mu\text{m}) = \sqrt{(r_m/r_i)}$$

MetaNeuron considera a la dendrita como un proceso cilíndrico de un diámetro uniforme cuya membrana tiene una capacitancia de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  y cuyo estímulo se aplica a una distancia de  $X=0$ . Ambos valores de resistencia y el diámetro de las dendritas pueden ser cambiados en el programa.

MetaNeuron permite visualizar la respuesta de la neurona bajo dos formas gráficas; potencial vs distancia, o potencial vs tiempo. Cuando se marca la casilla 'Potencial sináptico' en la ventana 'Estímulo', se genera un potencial sináptico en  $X=0$ . El potencial se genera mediante una conductancia que tiene constantes de tiempo ascendente y descendente de 0,1 y 1,0 veces el 'Ancho del estímulo'. Las relaciones de voltaje vs distancia vs tiempo se pueden ver seleccionando la función 'Gráfico 3D'.

### **Objetivo parcial y expectativas de logro**

El objetivo de esta sección es evaluar conceptos asociados a la constante de longitud y el decaimiento del voltaje en función de la distancia en la dendrita de una neurona típica, se espera que el alumno calcule la constante  $\lambda$  (lambda) a partir de la fórmula matemática y desde el gráfico a partir de cálculos de porcentaje de caída de voltaje en las curvas simuladas; se espera también que el alumno sea capaz de inferir que el aumento del diámetro del proceso neuronal aumenta la constante lambda y la velocidad del impulso nervioso.

## Metodología y análisis de resultados

- En MetaNeuron, seleccionar en la solapa superior 'Lesson 3' (o alternativamente, la tecla F3).

### C.1. Constante de longitud: caída exponencial del voltaje en función de la distancia

Los valores de los parámetros predeterminados ilustran la caída exponencial en estado estable (lejos de su propia constante de tiempo) del potencial de membrana respecto a la distancia. La dendrita se despolariza durante 50 ms y el potencial de membrana se representa en  $t = 50$  ms.

18. Mida la constante de longitud de la membrana ( $\lambda$ ) que es la distancia a la que el potencial de membrana cae al 37% de su valor máximo.

19. Calcule el valor teórico de lambda utilizando la ecuación:

$$\text{Constante de longitud } \lambda \text{ (cm)} = 0.5 \sqrt{d(r_m/r_i)}$$

donde  $\lambda$  es la constante de longitud (en cm),  $d$  es el diámetro de la dendrita (en cm),  $r_m$  es la resistencia de la membrana ( $\Omega/\text{cm}^2$ ) y  $r_i$  es la resistividad interna ( $\Omega.\text{cm}$ ).

20. ¿Ambos valores de Lambda son iguales? ¿Por qué?

### C.2. Constante de longitud: Resistencia de la membrana, resistividad interna y diámetro dendrítico

21. Comenzando con los valores de los parámetros predeterminados por default (File - Restore all to default), varíe la resistencia de la membrana. ¿Cómo afecta esto a la constante de longitud?

22. Comenzando con los valores de los parámetros predeterminados, varíe la resistividad interna. ¿Cómo afecta esto a la constante de longitud?

23. Comenzando con los valores de los parámetros predeterminados, modifique la amplitud de corriente a 10 pA y varíe el diámetro de la dendrita de 0.05 a 3  $\mu\text{m}$  ¿Cómo afecta esto a la constante de longitud?

24. ¿Qué efecto tendría la variación del diámetro de un axón amielínico sobre la velocidad de propagación del potencial de acción en el axón?

## PARTE D: POTENCIAL DE ACCIÓN AXÓNICO

En esta sección, estudiaremos los notables fenómenos que ocurren en un axón típico de conducción rápida. En estas estructuras neuronales, ocurre un fenómeno despolarizante de membrana con características distintas a las que estudiamos en las dendritas. En las dendritas, la magnitud de la despolarización es proporcional a la corriente-estímulo aplicada; además, la amplitud de la señal decae exponencialmente con la distancia a lo largo de la dendrita. En los axones típicos, la despolarización es mucho más rápida (tanto en su fase despolarizadora o ascendente, como en su fase repolarizadora o descendente); ocurre en pocos milisegundos. Los 'picos' registrados contiguos (llamados potenciales de acción, potenciales 'todo o nada' o 'espigas') tienen la misma amplitud, independientemente de la intensidad de corriente estímulo.

Este tipo de brusco cambio de potencial ocurre siempre y cuando se alcance el umbral esperado para que se abran unos canales de sodio particulares, dependientes de voltaje. Estos canales de membrana son molecularmente complejos y poseen, en la cara que mira hacia la célula, un dominio que inactiva al canal cuando la despolarización por irrupción de sodio alcanza un valor determinado. Esa repentina irrupción de sodio al interior de la célula causa cambios de voltaje en las adyacencias de la membrana interna, lo cual abre unos canales de potasio especiales, sensibles a cambios de voltaje, llamados canales de potasio rectificadores retardados. Dos neurotoxinas, llamadas tetrodotoxina (TTX, ver [Nota 1](#)) y tetraetilamonio (TEA, ver [Nota 2](#)) disminuyen la conductancia al sodio y al potasio respectivamente, por el bloqueo de ambos canales voltaje-dependientes. La brusca salida de potasio y la relativa lentitud de la inactivación de los canales de potasio provocan una situación temporal de hiperpolarización de la membrana, determinando un periodo refractario. Durante ese período refractario (absoluto o relativo) la posibilidad de que se genere un segundo potencial de acción por otro estímulo despolarizante es nula o está muy disminuida.



En esta parte práctica, usaremos algunas características de MetaNeuron, y finalmente utilizaremos la simulación interactiva que ofrece el Software Neurona 1.1.18 del Proyecto PhET (Universidad de Colorado) para visualizar el proceso completo de la generación de un potencial de acción. En MetaNeuron, varios parámetros pueden modificarse por el usuario: el potencial de equilibrio de los canales de fuga y voltaje-dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como la conductancia de los mismos ( $g_{\text{Na max}}$ ,  $g_{\text{K max}}$ ,  $g_{\text{Leak}}$ , que representa la 'densidad' de canales por superficie de membrana). En las casillas TTX y TEA puede seleccionarse un bloqueo simulado de los canales de sodio y potasio voltaje-dependientes por tetrodotoxina y tetraetilamonio respectivamente, como también la temperatura. Por otra parte, la corriente de uno o dos estímulos puede cambiarse seleccionando las casillas 'Holding current', 'Stimulus 1' y 'Stimulus 2'. Finalmente, se puede visualizar la conductancia y corriente de cada uno de los iones por separado al seleccionar la casilla 'Show ionic conductances' o 'Show ionic currents' respectivamente.

### ***Objetivo parcial y expectativas de logro***

El objetivo de esta sección es estudiar conceptos relacionados al potencial de acción en un axón típico, se espera que los alumnos sean capaces de (1) estimar el valor del potencial umbral capaz de desencadenar un potencial de acción, (2) comprender el rol de los canales del cono axónico en el inicio de un potencial de acción, (3) predecir el efecto de venenos biológicos que modifican la resistencia de los canales iónicos involucrados en la generación y propagación de los potenciales de acción y finalmente (4) aprender que los cambios en tiempo y espacio de voltaje de la membrana de la neurona evaluados en esta experiencia práctica son fenómenos locales que a corto plazo no afectan la composición iónica y de carga eléctrica.

### ***Metodología y análisis de resultados***

- En MetaNeuron, seleccionar en la solapa superior 'Lesson 4' (o alternativamente, la tecla F4).

#### **D.1. Umbral del Potencial de Acción**

Varíe la amplitud del 'Estímulo 1'.

25. ¿Qué efecto tiene esto en la respuesta celular?
26. ¿Cuál es la amplitud del estímulo umbral (en  $\mu\text{A}$ ) para iniciar un potencial de acción?

### **D.2. Potenciales de acción y potencial de equilibrio de $\text{Na}^+$**

Establezca 'Amplitud del estímulo 1' en  $150 \mu\text{A}$ . El estímulo evocará un potencial de acción. Varíe el potencial de equilibrio de  $\text{Na}^+$ .

27. ¿Qué efecto tiene esto en el potencial de acción? ¿Por qué?

### **D.3. Canales de $\text{Na}^+$ e inicio del potencial de acción**

Los potenciales de acción a menudo se inician en el cono del axón, donde el axón abandona el cuerpo celular. El cono axónico tiene una alta densidad de canales de  $\text{Na}^+$ , lo que reduce el umbral para iniciar un potencial de acción. MetaNeuron se puede utilizar para medir el efecto de la densidad del canal de  $\text{Na}^+$  en el umbral de generación del potencial de acción.

Varíe el ' $g_{\text{Na}} \text{máx.}$ ' De  $200$  a  $380 \text{ mS/cm}^2$  en intervalo de  $20 \text{ mS/cm}^2$ . (La densidad del canal de  $\text{Na}^+$  es proporcional a  $g_{\text{Na}} \text{máx.}$ ). Recuerde utilizar la función 'rango'.

28. Determine el umbral para iniciar un potencial de acción en las curvas del rango comprendidas para  $260 \text{ mS/cm}^2$  y  $380 \text{ mS/cm}^2$  de ' $g_{\text{Na}} \text{máx.}$ '. ¿Por qué ocurre esto?

### **D.4. Conductancias del potencial de acción de la membrana**

Comenzando con los valores de los parámetros predeterminados (File - Restore all to default). Seleccione 'Mostrar conductancias iónicas' en la ventana 'Conductancias y corrientes'. Las trazas verde y azul muestran el curso temporal de las conductancias de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que se activan durante el potencial de acción.

29. ¿Por qué la conductancia de  $\text{K}^+$  se activa más lentamente y dura más que la conductancia de  $\text{Na}^+$ ?

## D.5. Bloqueo selectivo de los canales voltaje-dependientes

Comenzando con los valores de los parámetros predeterminados (File - Restore all to default). Seleccione alternativamente las casillas 'TTX' y 'TEA'. Observe lo que ocurre con el potencial de acción.

30. ¿Cuál es la explicación biológica a ese fenómeno?

Ingrese a la página del Software en línea Neurona 1.1.18 ([https://phet.colorado.edu/sims/html/neuron/latest/neuron\\_es.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/neuron/latest/neuron_es.html)).

Tildar en las casillas de la derecha 'todos los iones', 'cargas', 'concentraciones' y 'tabla de potenciales'. Estimula repetidamente a la neurona, variando si es necesario la velocidad en el panel izquierdo. Estudie detenidamente lo que ocurre cuando la onda despolarizante llega a los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes. Observe las tres configuraciones del canal de  $\text{Na}^+$  sensible a TTX (abierto-inactivo-cerrado) y el canal de  $\text{K}^+$  sensible a TEA (abierto-cerrado). Estudie detenidamente lo que ocurre con los canales de fuga de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

31. Observe el cambio de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a ambos lados de la membrana. ¿Es significativo?

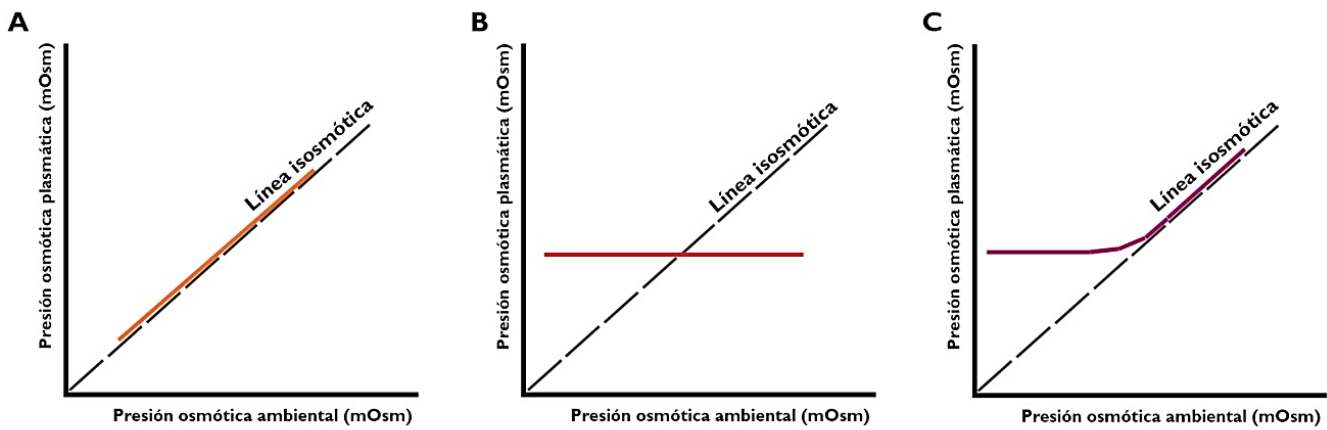
### 3 OSMORREGULACIÓN EN EL AGUA



## Marco teórico

El agua es la molécula cuantitativamente más importante del cuerpo de los animales, y puede representar desde un 60% del peso corporal (en un mamífero como el *Homo sapiens*) hasta un 98% en algunos animales acuáticos (por ejemplo, en especies de animales 'gelatinosos' del Filo Ctenophora). El agua es el solvente principal del interior de las células, pero también hay un porcentaje importante formando parte de los líquidos extracelulares. Estos últimos pueden estar presentes como agua intersticial, o formando parte sustancial del plasma. En ese solvente están disueltas diversas moléculas: proteínas, aminoácidos, glúcidos, productos nitrogenados, sistemas buffers y diversos iones inorgánicos. Esas moléculas generalmente no pueden atravesar la membrana plasmática, y por tanto participan en el fenómeno físico de ósmosis, que implica un movimiento del solvente (agua) a través de una membrana semipermeable debido a la presencia de partículas no difusibles, ejerciendo una presión osmótica permanente sobre la membrana. El solvente se mueve entonces desde el compartimento de menor concentración y atraviesa la membrana hacia el compartimento de mayor concentración de moléculas osmóticamente activas, hasta que la presión osmótica resultante equilibra el movimiento de agua y el flujo neto sea cero.

En los animales osmoconformadores las partículas osmóticamente activas participan de un equilibrio con lo que sucede en su ambiente ([Figura 4A](#)). En otros casos, los animales regulan con precisión su presión osmótica ([Figura 4B](#)), además de su composición iónica, y su volumen plasmático extracelular. Otras veces, los animales se comportan como reguladores en un determinado rango y como conformadores en otro rango de una misma variable ([Figura 4C](#)).



*Figura 4. Regulación y conformidad de la presión osmótica extracelular respecto al ambiente.*

La línea punteada de pendiente positiva corresponde a un valor osmótico teórico entre el ambiente y el plasma de un animal (línea de isosmolaridad). **A.** La línea anaranjada representa a un animal acuático osmoconformador. **B.** La línea roja representa la presión osmótica del plasma de un animal acuático osmorregulador. **C.** La línea violeta representa a un animal que se comporta como osmorregulador a presiones osmóticas ambientales bajas mientras que es un osmoconformador a mayores presiones osmóticas ambientales.

Los crustáceos dulceacuícolas, al igual que prácticamente la mayoría de los animales que habitan en agua dulce, tienen sus líquidos extracelulares más concentrados que el medio acuoso que los rodea. Estos organismos son identificados genéricamente como reguladores hiperosmóticos ya que sus mecanismos regulatorios se pondrán en marcha para sacar agua y/o incorporar iones del medio. Por su parte, en los crustáceos marinos su medio interno es aproximadamente isoosmótico respecto al agua de mar, y en principio habrá un equilibrio osmótico (aunque no necesariamente un equilibrio iónico).

Los peces teleósteos de agua dulce presentan características análogas a las descritas en los crustáceos de estos ambientes. Sin embargo, en ambientes marinos estos peces presentan un medio interno con una presión osmótica más baja que la presión osmótica del medio que los rodea. Esto implica que este animal tendrá a perder agua y deberá eliminar el exceso de iones en contra de un gradiente de concentración.

Los anfibios (que son generalmente animales semiacuáticos y de agua dulce), constituyen un grupo taxonómico particular en términos de regulación osmótica, ya que están dotados de una piel fina y un riñón con un escaso desarrollo de su médula renal. Esto implica que cuando las condiciones de salinidad de su hábitat se incrementan el animal será expuesto a una situación de pérdida de líquidos corporales sin la posibilidad de regular a través de la producción de una orina concentrada.

## Los taxa del experimento

En este práctico trabajaremos con ejemplares de tres especies, ubicadas filogenéticamente en los phyla Arthropoda y Chordata.

El primer taxon involucra a los 'camarones fantasma' (géneros *Macrobrachium* y *Palaemonetes*), un grupo de especies de crustáceos de agua dulce reconocibles por sus largas antenas y un cuerpo notablemente transparente ([Figura 5A](#)). Estos camarones son los crustáceos decápodos más conspicuos de la cuenca del Río de la Plata, y tienen una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana de Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil [[17](#)]. Allí viven y se alimentan en el fondo, dentro de la comunidad litoral béntica [[18](#)]. El género *Macrobrachium* Bate, 1868 es el género más diverso de la familia Palaemonidae Rafinesque, 1815, una familia de camarones de distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Muchas especies de camarones palemónidos son eurihalinas o capaces de soportar aguas salobres en parte de su desarrollo [[19](#)].

El segundo taxon elegido es *Jenynsia lineata* (Jenyns, 1842) ([Figura 5B](#)). Este es un pequeño pez vivíparo, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza, incluidos cuerpos de agua urbanos) gracias a su gran capacidad de resistir bajas temperaturas invernales y aguas de concentración salina elevada. Esta especie regula su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h cuando es expuesta a un incremento de la salinidad del medio [[20](#)]. *Jenynsia* está incluida en la familia Anablepidae (Garman, 1895), una pequeño taxon de peces ciprinodontiformes de origen marino, vivíparos y con un notable dimorfismo sexual, y pueden encontrarse actualmente en aguas dulces, salobres e incluso marinas [[21](#)].

La tercera especie de nuestro experimento es *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) ([Figura 5C](#)). Esta es una de las especies de anuros más conocidas, originaria del África subsahariana, y un animal modelo para estudios ontogénicos y fisiológicos [[22](#)]. Este animal es una verdadera máquina biológica ideal para encarar experiencias fisiológicas. Por ejemplo, es capaz de cambiar el metabolismo amoniotélico a ureotélico en respuesta a la deshidratación, es resistente a condiciones anóxicas, y especialmente tiene una alta tolerancia a las soluciones hiperosmóticas [[23](#)]. La rana de uñas está incluida en la familia Pipidae, que se caracteriza por la ausencia de lengua y un cuerpo aplanado en dirección dorsoventral, entre otros rasgos considerados ancestrales dentro del clado [[24](#)].

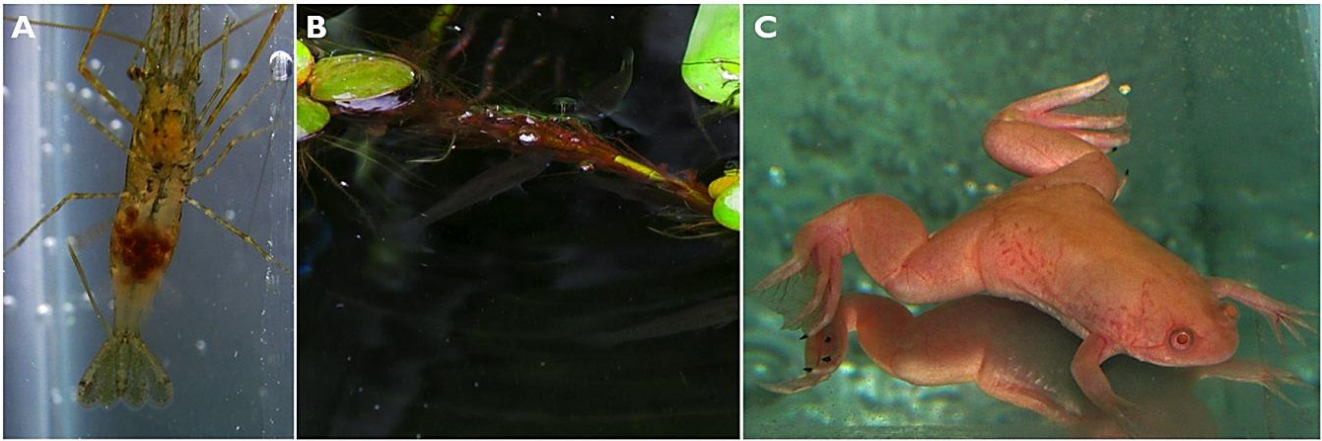


Figura 5. Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, la madrecita de agua, y la rana de uñas.

**A.** *Macrobrachium borellii* (Crustacea, Palaemonidae). **B.** *Jenyntia lineata* (Osteichthyes, Anablepidae). **C.** *Xenopus laevis* (Amphibia, Pipidae).

En este experimento evaluaremos la capacidad osmorreguladora de *M. borellii*, *J. lineata*, y *X. laevis* sometidos a medios con diferente osmolaridad (hiposmótico e hiperosmótico). Dicha evaluación se hará a través de un estudio de la ganancia o pérdida de agua en respuesta a su medio.

### **Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro**

Los objetivos de esta sección apuntan a que los estudiantes (1) entiendan los cambios fisiológicos que se producen en los peces teleósteos, anfibios y crustáceos cuando la concentración de su medio cambia en forma aguda, (2) extrapolen los resultados a la generalidad de los organismos acuáticos y (3) integren el conocimiento teórico adquirido desde un punto de vista de todos los sistemas corporales, centrado particularmente en los cambios osmóticos de los compartimentos extracelulares (linfa, sangre, hemolinfa) e intracelulares. Adicionalmente, es esperable que hipoteticen las ventajas ecológicas y evolutivas de organismos que pueden aclimatarse rápidamente a medios acuáticos osmóticamente fluctuantes.



## Material

### Material de laboratorio

- 6 acuarios acondicionados (ver [Nota 3](#)) divididos en dos grupos experimentales (ver [Nota 4](#)).
- Redes de seda o tejido sintético de diferentes tamaños.
- Balanza.
- Pipetas Pasteur.
- Cajas de Petri plásticas.
- Recipiente plástico graduado de 5 L.
- Vasos de precipitado graduado de 500 mL y 1000 mL.
- Cloruro de sodio (NaCl; PM: 58,44 g/mol).
- Tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PM 158,11 g/mol); solución stock 100 g/L (ver [Nota 5](#)).

### Material biológico

- 3-5 ejemplares adultos (>3 cm longitud total) de *Macrobrachium* sp.-*Palaemonetes* sp. (Crustacea, Decapoda).
- 3-5 ejemplares adultos (ver [Nota 6](#)) de *Jenynsia lineata* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes).
- 3-5 ejemplares juveniles (>4; <8 cm de longitud total) de *Xenopus laevis* (Amphibia, Anura).

## Metodología

1. *Preparación de agua dulce declorada*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 4 L de agua corriente. Con la pipeta Pasteur, agregar 2 gotas de solución stock de tiosulfato de sodio por litro de agua. Repetir hasta completar el volumen de los acuarios experimentales.

2. *Preparación de agua salobre al 0,5%*: Pesar 15 g de NaCl y disolver en 3 litros de agua corriente declorada con tiosulfato de sodio (2 gotas de solución stock por litro de

agua) por cada acuario experimental de agua salobre. Esperar hasta la disolución completa de la sal.

3. *Acondicionamiento de los acuarios experimentales* (ver [Nota 3](#)): Fijar una línea de aire con una piedra difusora, ventosa y regulador de flujo. Fijar el termocalentador sumergible y el termómetro de alcohol en las paredes del acuario. Cargar cuidadosamente con el agua apropiada (grupo 1: agua dulce de clorada; grupo 2: agua salobre al 0,5%). Conectar la línea de aire al compresor de aire y regular la salida de forma de establecer un burbujeo homogéneo y suave.

4. Llenar el grupo 1 de acuarios con agua corriente de clorada, y el grupo 2 de acuarios con agua salobre de clorada, llenando hasta unos 2-3 cm del borde superior. Esta última no debe tener ningún tipo de sal precipitada. Ajustar los termocalefactores y esperar a que la temperatura se estabilice en un rango de 20-25 °C en todos los acuarios experimentales.

#### Peces y anfibios

5. Ubicar la Caja de Petri sobre la balanza y tarar.

6. Desde los acuarios de mantenimiento, trasladar a los ejemplares en forma individual en vasos de precipitado de tamaño adecuado, en la misma agua del bioterio de mantenimiento, a los acuarios llenos con agua dulce de clorada.

7. Tomar cada ejemplar cuidadosamente con la red, escurrir el agua y pesar cada uno de los ejemplares (peso inicial) ubicándolos dentro de la Caja de Petri. La maniobra requiere cierta experticia ya que la presencia de agua no escurrida induce mucho error en la estimación de peso en ejemplares pequeños.

8. Introducir a los ejemplares en los acuarios experimentales con agua salobre (grupo 2) durante 3 minutos (escurrir antes y después de introducirlos).

9. Repetir la maniobra del punto 7 a los 3, 6, 9, 12 y 15 minutos, revisando el estado físico de cada uno de los ejemplares antes de la operación. Si se detectan signos considerables de estrés fisiológico o del sistema nervioso (exceso de mucosidad epitelial,

pérdida de equilibrio, respiración irregular), imponer el punto final humanitario recomendado para el experimento por el comité de bioética animal, que en este caso implica regresar al animal al acuario con agua dulce de clorada. Anotar cuidadosamente el peso.

10. Luego de los procedimientos en agua salobre, introducir a los ejemplares los acuarios experimentales de agua dulce de clorada, repitiendo la maniobra del punto 7 a los 18, 21, 24, 27 y 30 minutos. Anotar cuidadosamente el peso.

11. Mantener a los animales en los acuarios de agua dulce de clorada, sin agregar alimentos, por al menos 24 h. Si se detectan signos irreversibles en el estado de salud, seguir el procedimiento de eutanasia programada ([Anexo I.7.2](#)).

## Crustáceos

12. Ubicar la Caja de Petri sobre la balanza y tarar.

13. Desde los acuarios de mantenimiento, trasladar a los ejemplares en forma individual en vasos de precipitado de tamaño adecuado, en la misma agua del bioterio de mantenimiento.

14. Tomar cada ejemplar cuidadosamente con la red, escurrir el agua y pesar cada uno de los ejemplares (peso inicial) ubicándolos dentro de la Caja de Petri. La maniobra requiere cierta experticia ya que la presencia de agua no escurrida induce mucho error en la estimación de peso en ejemplares pequeños.

15. Introducir a los ejemplares en el agua salobre durante 6 minutos (escurrir antes y después de introducirlos).

16. Repetir la maniobra del punto 7 a los 12, y 24 minutos, revisando el estado físico de cada uno de los ejemplares antes de la operación. Si se detectan signos considerables de estrés fisiológico o perturbación del sistema nervioso (ver [Nota 7](#)) suspender inmediatamente el experimento, trasladando a los animales a los acuarios con agua dulce de clorada. Anotar cuidadosamente el peso.

17. Luego de los procedimientos en agua salobre, introducir a los ejemplares los acuarios experimentales de agua dulce de clorada, repitiendo la maniobra del punto 7 a los 30, 36, 42 y 48 minutos. Anotar cuidadosamente el peso.

18. Mantener a los animales en los acuarios de agua dulce de clorada, sin agregar alimentos, por al menos 24 h. Si se detectan signos irreversibles en el estado de salud, seguir el procedimiento de eutanasia programada ([Anexo I.7.2](#)).

### ***Análisis de resultados***

Anotar los datos obtenidos en las celdas de una hoja de cálculo en todos los tiempos experimentales para cada ejemplar de peces, anfibios, y crustáceos ([Figura 6](#)). En otra hoja, anotar las diferencias de peso absolutas, o expresarlas como porcentaje del peso inicial. Si hay al menos tres repeticiones, los alumnos pueden además calcular datos de dispersión (varianza, desvío estándar, etc.). Es conveniente guardar las hojas en un mismo archivo. Graficar entonces la diferencia porcentual vs el tiempo ([Figura 7](#)).

		Peso (g)					
Especie	Ejemplar	t=0	t=3 min	t=6 min	t=9 min	t=12 min	t=15 min
<i>Xenopus laevis</i>	1	12,44	11,91	10,93	10,44	10,1	10
	2	5,49	5,11	4,55	4,38	4,27	4,26
	3	6,81	6,37	6,09	5,89	5,81	5,77
	4	3,93	3,01	2,56	2,39	2,3	2,29
	5	4,91	3,81	3,27	3,04	2,88	2,89
<i>Jenynsia lineata</i>	1	2,78	2,72	2,71	2,68	2,69	2,68
	2	2,95	2,88	2,86	2,81	2,8	2,79
	3	3,88	3,81	3,79	3,75	3,75	3,74
	4	1,72	1,7	1,65	1,63	1,62	1,61
	5	1,9	1,85	1,82	1,77	1,74	1,72
<i>Macrobrachium borellii</i>	1	0,89	-	0,81	-	0,79	-
	2	1,21	-	1,16	-	1,09	-
	3	1,33	-	1,27	-	1,24	-
	4	0,96	-	0,88	-	0,86	-
	5	0,68	-	0,66	-	0,6	-

		Peso (g)							
Especie	Ejemplar	t=18 min	t=21 min	t=24 min	t=27 min	t=30 min	t=36 min	t=42 min	t=48 min
<i>Xenopus laevis</i>	1	10,93	12,9	12,65	12,4	12,43	-	-	-
	2	4,89	5,59	5,51	5,48	5,5	-	-	-
	3	6,38	7,2	6,94	6,8	6,82	-	-	-
	4	3,39	4,21	4,12	3,94	3,92	-	-	-
	5	3,99	5,02	5,12	4,94	4,91	-	-	-
<i>Jenynsia lineata</i>	1	2,71	2,73	2,77	2,79	2,78	-	-	-
	2	2,81	2,83	2,9	2,99	2,96	-	-	-
	3	3,78	3,83	3,9	3,88	3,89	-	-	-
	4	1,65	1,67	1,72	1,74	1,73	-	-	-
	5	1,72	1,8	1,84	1,89	1,92	-	-	-
<i>Macrobrachium borellii</i>	1	0,71	-	0,67	-	0,7	0,73	0,8	0,83
	2	1,01	-	0,89	-	0,91	1,12	1,14	1,15
	3	1,21	-	1,18	-	1,19	1,22	1,26	1,3
	4	0,81	-	0,77	-	0,77	0,82	0,86	0,88
	5	0,56	-	0,51	-	0,52	0,59	0,62	0,63

Figura 6. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con los valores experimentales de *X. laevis*, *J. lineata*, y *M. borellii* en agua dulce y agua salobre.

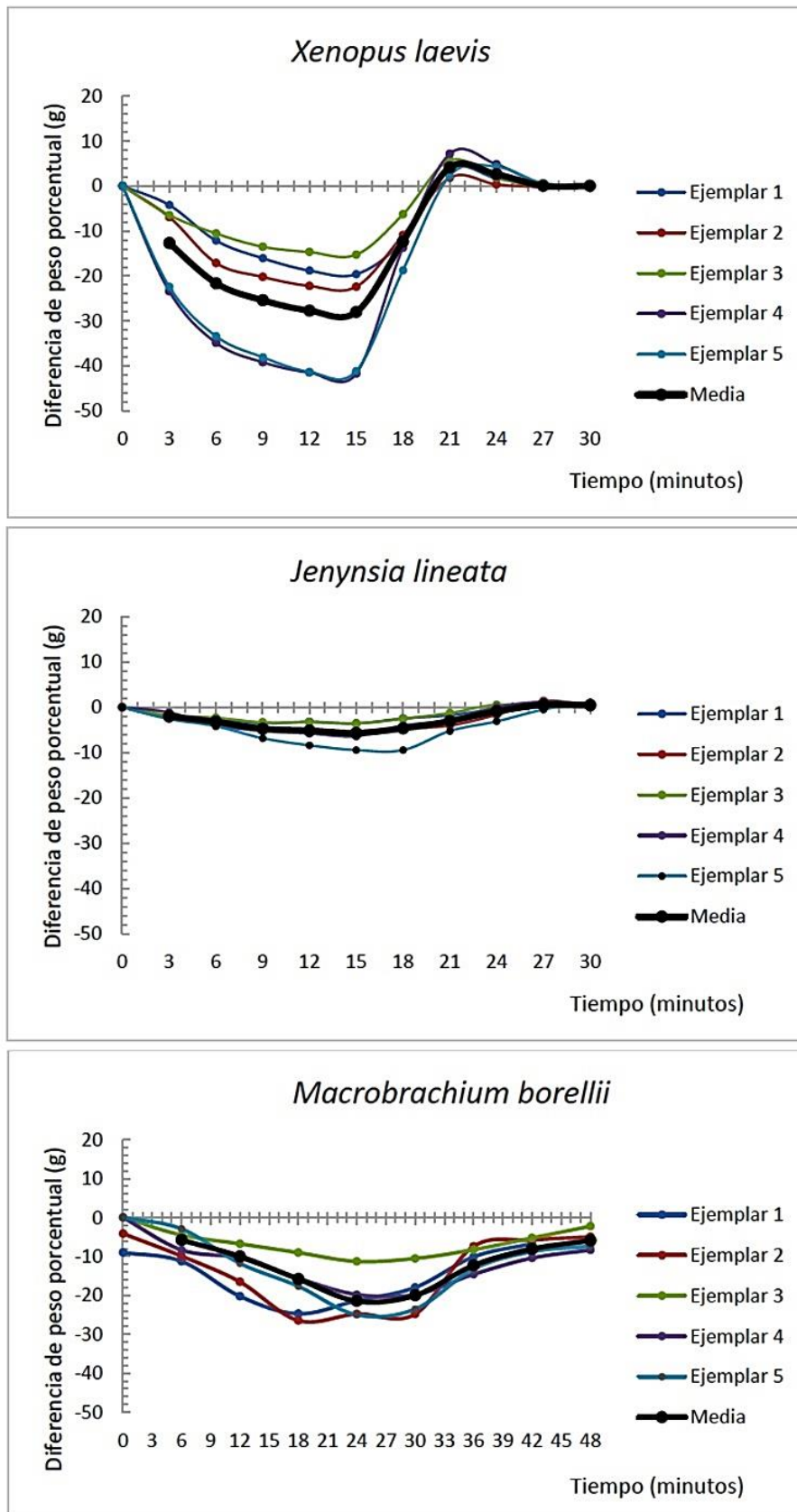
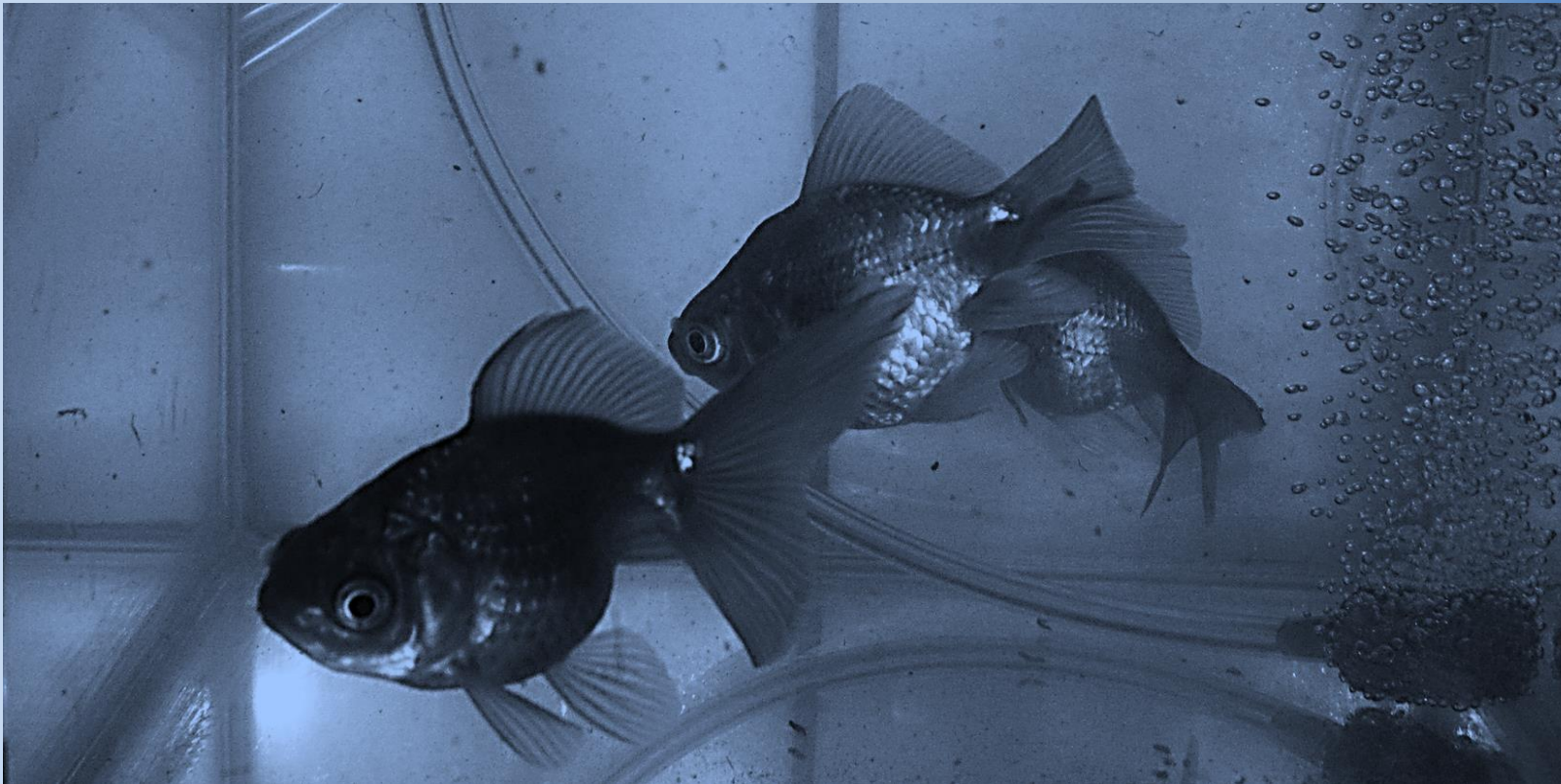


Figura 7. Variación porcentual del peso en función del tiempo en 5 ejemplares de *X. laevis*, *J. lineata*, y *M. borellii*.

1. Discutir y concluir sobre los resultados, focalizando la discusión en las siguientes preguntas orientativas:
2. ¿Cuál es la interpretación fisiológica respecto al cambio de peso en los animales? ¿Es posible inferir que los cambios en el peso se deben al intercambio del solvente por las diferentes osmolaridades del medio interno y el ambiente?
3. En peces y anfibios, ¿Cuál de los dos procesos (deshidratación y rehidratación) ocurre más rápido? ¿Por qué?
4. ¿Cuál es comportamiento osmótico (hídrico y electrolítico) del camarón de río, cuando está en agua dulce y cuando se encuentra en aguas salobres? ¿Qué pruebas se obtuvieron en el experimento que confirmen la respuesta?
5. ¿Las diferencias en la cubierta corporal (queratinización de la piel, escamas, exoesqueleto) de los organismos observados ayudan a explicar los resultados?
6. ¿Cuáles son los tejidos o epitelios en los cuales no se puede regular el intercambio de agua? Tomando en cuenta la experiencia práctica, ¿qué órganos estarían involucrados en el intercambio de agua osmótica en los diferentes taxa?
7. Desde un punto de vista ecofisiológico-evolutivo, ¿supone una ventaja adaptativa la aclimatación a medios con diferente salinidad? ¿Por qué entonces no todos los organismos presentan esa capacidad de aclimatación fisiológica?

## 4 EXCRECIÓN Y TOXICIDAD DEL NITRÓGENO





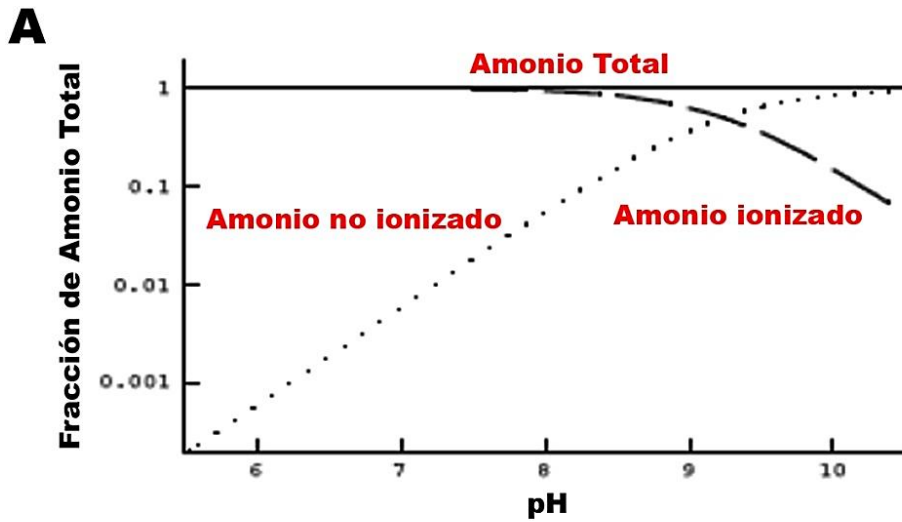
## Marco teórico

El metabolismo de la materia en los sistemas vivos es complejo y es una resultante de procesos catabólicos y anabólicos, de cuyo balance depende el mantenimiento homeostático. La energía en forma de materia fluye a través de los organismos y se almacena fundamentalmente bajo la forma de enlaces químicos en diferentes macromoléculas (como glucógeno, triglicéridos, creatina-fosfato o proteínas). Luego, los animales pueden utilizar esta fuente de energía a través de su catabolismo, obteniéndose pequeños productos oxidados de los cuales ya no es posible utilizar electrones para generar energía. El carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, constituyen los elementos principales de las moléculas biológicas. El catabolismo aeróbico de los glúcidos y triglicéridos tiene como productos finales proporciones diferentes de  $H_2O$  y  $CO_2$ . El metabolismo del nitrógeno involucra el movimiento de grupos amino entre aminoácidos (desaminación) y otras transformaciones incluidas en ciclos metabólicos, que dan como productos finales tres compuestos nitrogenados principales: el amoníaco ( $NH_3$ ), la urea ( $CO(NH_2)_2$ ), y el ácido úrico y moléculas equivalentes ( $C_5H_4N_4O_3$ ) [25]. Schmidt-Nielsen [3] postuló que el producto final del metabolismo de nitrógeno está relacionado con las características de su hábitat, la disponibilidad de agua para eliminar los diferentes catabolitos y de energía. Así, como regla general, la inmensa mayoría de los animales acuáticos son amoniotélicos. En el transcurso de la evolución, en el antecesor de los vertebrados, surgió la capacidad de sintetizar el compuesto urea (animales ureotélicos), que es el producto nitrogenado generado en el ciclo de la urea-ornitina. Este proceso, que implica utilización de energía ATP y pérdida de materia carbonada, está presente en los peces cartilaginosos (Chondroichthyes) y en los mamíferos (Mammalia). La capacidad de sintetizar ácido úrico como producto final nitrogenado surgió una sola vez en los vertebrados (aves y reptiles: Sauropsida) pero la 'purinotelia' *sensu lato* es una condición común entre muchos invertebrados. La síntesis de ácido úrico (animales uricotélicos) es más costosa aún en materia y energía que la síntesis de urea y amoníaco, y el compuesto se forma como vía común del metabolismo de las proteínas y purinas.

¿Por qué entonces la excreción de nitrógeno se ha diversificado hacia estas tres grandes estrategias? La respuesta a esta pregunta hay que buscarla por la cantidad de agua necesaria para la excreción del producto nitrogenado final. Al parecer, el ureotelismo y uricotelismo surgió en forma independiente como respuesta a una creciente presión de

selección para conservar el agua en medios donde ésta es un bien escaso, ya que la urea y (especialmente) el ácido úrico, necesitan muy poca agua para su excreción cuando la comparamos con el amoníaco. Éste último compuesto es muy soluble en agua (y, por lo tanto, dentro de las células) por lo que es necesario una gran cantidad de 'agua externa' para disolver este amoníaco intracelular. Por otro lado, la pérdida extra de materia y energía necesaria para la síntesis de urea y ácido úrico puede verse compensada no sólo por el ahorro de agua, sino por la pérdida de toxicidad respecto al amoníaco. El amoníaco es una molécula pequeña, polar pero no ionizada, capaz de atravesar las membranas celulares. Se comporta además como una base, por lo que puede cambiar el pH intracelular y en consecuencia alterar el funcionamiento y estructura de las enzimas y proteínas internas.

El amoníaco o amonio libre ( $\text{NH}_3$ ) está en equilibrio con la forma ionizada del compuesto, el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ([Figura 8A](#)). Como el metabolismo general del organismo es ácido, una parte de este amoníaco se excreta como sales de amonio vía renal o branquio-tegumental. El amonio es un compuesto que no puede atravesar las membranas por su carga eléctrica y por lo tanto es menos tóxico que el amoníaco. A nivel ecosistémico, el amoníaco es fundamental como macronutriente para las proteínas de los seres fotosintéticos (plantas y algas). También puede ser utilizado como fuente de electrones por algunas bacterias, que transforman secuencialmente el amoníaco/amonio en nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), los cuales pueden ser también incorporados por los organismos fotosintéticos para la biosíntesis de moléculas nitrogenadas. Estas características químico-ecológicas hacen que el amonio/amoníaco disuelto en el agua sea escaso en cuerpos de agua oligotróficos. En ciertas condiciones, como ambientes muy eutrofizados o con una carga orgánica importante, existe una mayor concentración de amoníaco en el agua. En esta situación, que es extremadamente común en condiciones de cultivo de organismos acuáticos extensivos que no tienen una carga bacteriana nitrificante suficiente, puede acumularse amoníaco [[26](#)]. Según la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) un valor de 17 mg/L de nitrógeno-amoníaco total es el límite máximo de concentración tolerable para una exposición aguda de una hora promedio para la vida acuática (a pH 7 y 20 °C) [[27](#)], aunque la toxicidad del compuesto está en función del pH y de la temperatura del medio ([Figura 8B](#)).



**B**

Temperatura (°C)

pH	0-10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
6.5	51	48	44	41	37	34	32	29	27	25	23	21	19	18	16	15	14	13	12	11	9.9
6.6	49	46	42	39	36	33	30	28	26	24	22	20	18	17	16	14	13	12	11	10	9.5
6.7	46	44	40	37	34	31	29	27	24	22	21	19	18	16	15	14	13	12	11	9.8	9.0
6.8	44	41	38	35	32	30	27	25	23	21	20	18	17	15	14	13	12	11	10	9.4	8.5
6.9	41	38	35	32	30	28	25	23	21	20	18	17	15	14	13	12	11	10	9.4	8.6	7.9
7.0	38	35	33	30	28	25	23	21	20	18	17	15	14	13	12	11	10	9.4	8.6	7.9	7.3
7.1	34	32	30	27	25	23	21	20	18	17	15	14	13	12	11	10	9.3	8.5	7.9	7.2	6.7
7.2	31	29	27	25	23	21	19	18	16	15	14	13	12	11	9.8	9.1	8.3	7.7	7.1	6.5	6.0
7.3	27	26	24	22	20	18	17	16	14	13	12	11	10	9.5	8.7	8.0	7.4	6.8	6.3	5.8	5.3
7.4	24	22	21	19	18	16	15	14	13	12	11	9.8	9.0	8.3	7.7	7.0	6.5	6.0	5.5	5.1	4.7
7.5	21	19	18	17	15	14	13	12	11	10	9.2	8.5	7.8	7.2	6.6	6.1	5.6	5.2	4.8	4.4	4.0
7.6	18	17	15	14	13	12	11	10	9.3	8.6	7.9	7.3	6.7	6.2	5.7	5.2	4.8	4.4	4.1	3.8	3.5
7.7	15	14	13	12	11	10	9.3	8.6	7.9	7.3	6.7	6.2	5.7	5.2	4.8	4.4	4.1	3.8	3.5	3.2	2.9
7.8	13	12	11	10	9.3	8.5	7.9	7.2	6.7	6.1	5.6	5.2	4.8	4.4	4.0	3.7	3.4	3.2	2.9	2.7	2.5
7.9	11	9.9	9.1	8.4	7.7	7.1	6.6	3.0	5.6	5.1	4.7	4.3	4.0	3.7	3.4	3.1	2.9	2.6	2.4	2.2	2.1
8.0	8.8	8.2	7.6	7.0	6.4	5.9	5.4	5.0	4.6	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	1.9	1.7
8.1	7.2	6.8	6.3	5.8	5.3	4.9	4.5	4.1	3.8	3.5	3.2	3.0	2.7	2.5	2.3	2.1	2.0	1.8	1.7	1.5	1.4
8.2	6.0	5.6	5.2	4.8	4.4	4.0	3.7	3.4	3.1	2.9	2.7	2.4	2.3	2.1	1.9	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2
8.3	4.9	4.6	4.3	3.9	3.6	3.3	3.1	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	1.9	1.7	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.96
8.4	4.1	3.8	3.5	3.2	3.0	2.7	2.5	2.3	2.1	2.0	1.8	1.7	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.93	0.86	0.79
8.5	3.3	3.1	2.9	2.7	2.4	2.3	2.1	1.9	1.8	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	0.98	0.90	0.83	0.77	0.71	0.65
8.6	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	1.9	1.7	1.6	1.5	1.3	1.2	1.1	1.0	0.96	0.88	0.81	0.75	0.69	0.63	0.58	0.54
8.7	2.3	2.2	2.0	1.8	1.7	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.94	0.87	0.80	0.74	0.68	0.62	0.57	0.53	0.49	0.45
8.8	1.9	1.8	1.7	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.93	0.86	0.79	0.73	0.67	0.62	0.57	0.52	0.48	0.44	0.41	0.37
8.9	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.93	0.85	0.79	0.72	0.67	0.61	0.56	0.52	0.48	0.44	0.40	0.37	0.34	0.32
9.0	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.93	0.86	0.79	0.73	0.67	0.62	0.57	0.52	0.48	0.44	0.41	0.37	0.34	0.32	0.29	0.27

Figura 8. El efecto de la ionización y temperatura en la toxicidad de  $NH_4-N$ .

**A.** Fracción de Amonio ionizado y no-ionizado en función del pH. **B)** Valor máximo aceptado para la vida acuática en agua dulce de Nitrógeno-Amonio total en función del pH y la temperatura. Los valores están expresados como Nitrógeno-Amonio Total (NAT) en mg/L. Modificado de EPA [27].

## Los taxa del experimento

En esta experiencia estudiaremos el posible efecto tóxico que tiene una solución de sales de amonio sobre tres taxa de animales acuáticos distanciados filogenéticamente; un crustáceo, *Macrobrachium* sp./*Palaemonetes* sp. (Decapoda, Palaemonidae); un molusco, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae) y un pez óseo, *Carassius auratus* (Cypriniformes, Cyprinidae) ([Figura 9](#)).

En primer lugar, se eligió al camarón fantasma como modelo artrópodo. *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) ([Figura 9A](#)) es uno de los crustáceos decápodos más conspicuos de la cuenca del Río de la Plata, y tiene una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil [[17](#)], que vive y se alimenta en la comunidad litoral béntica [[18](#)]. El género *Macrobrachium* Bate, 1868 es el género más diverso de la familia Palaemonidae Rafinesque, 1815, una familia de camarones de distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Los crustáceos decápodos son animales completamente amoniotélicos.

En segundo lugar, trabajaremos con el gasterópodo dulceacuícola *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) ([Figura 9B](#)). Este caracol es notable desde todo punto de vista. Es nativo de la cuenca del Río de la Plata y es por lejos la especie mejor estudiada y conocida por su enorme capacidad invasora [[28-31](#)]. La especie ha expandido en el país su área de distribución original, colonizando otros ambientes del oeste y sur del país. Si bien este animal es un respirador dual, vive en el agua y como tal, es amoniotélico. Sin embargo, se ha descrito que acumulan ácido úrico concentrado en cuerpos cristaloides alojados en un tejido perivascular, con una posible función antioxidante durante el periodo de estivación [[32](#)]. *Pomacea canaliculata* pertenece a la familia Ampullariidae Gray, 1824 incluye moluscos de agua dulce y está representada por 9 géneros y más de 150 especies. Están distribuidos en zonas tropicales, en cuerpos de agua lóticos y lénticos de África, Asia y Sudamérica.

Por último, se trabajará en esta experiencia con el pez dorado, una especie muy apreciada en acuarismo; *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) ([Figura 9C](#)) es un pez exótico, de los cuales existen numerosas formas obtenidas por selección artificial. La especie es resistente, y suele vivir en el bentos de ambientes lóticos, a veces eutróficos, ricos en vegetación [[21](#)]. *Carassius* es un pez teleósteo, taxón que excreta la mayor parte del nitrógeno residual bajo la forma de amoniaco a nivel del epitelio branquial, el cual es el órgano excretor de nitrógeno por excelencia [[33](#)]. La familia Cyprinidae Rafinesque, 1815

es una de las más ricas a nivel específico dentro de los peces, y son todos animales de distribución en América del Norte, África, y Eurasia [21]. Algunos miembros han desarrollado una capacidad invasora asombrosa, y pueden encontrarse en todo el mundo, como por ejemplo la carpa común (*Cyprinus carpio*), la cual es considerada una de las 100 peores especies invasoras del mundo [31].

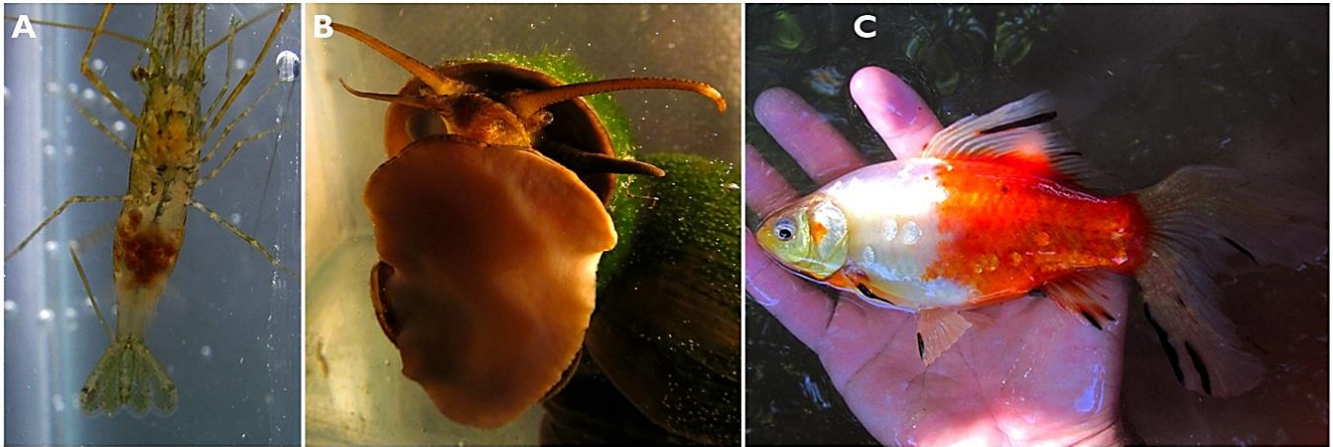


Figura 9. Las especies animales elegidas para el experimento: el camarón fantasma, el caracol manzana, y el pez dorado.

**A.** *Macrobrachium borellii* (Crustacea, Palaemonidae). **B.** *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **C.** *Carassius auratus* (Osteichthyes, Cyprinidae).

Los valores de toxicidad aguda difieren entre los distintos taxa, siendo los peces y los moluscos generalmente más resistentes que los invertebrados bentónicos (Figura 10). Los signos característicos de toxicidad aguda por amoníaco son inmovilidad, pérdida del equilibrio, y mortalidad [27]. En los animales donde esto puede evaluarse, la toxicidad por amonio no ionizado puede también evaluarse por un incremento en la ventilación branquial, ya que el amoníaco daña el epitelio branquial [34], causa acidosis metabólica [35] desacopla la fosforilación oxidativa en el cerebro [36] y afecta la actividad osmorreguladora y circulatoria [37, 38].

<b>Taxa (agua dulce)</b>	<b>Exposición aguda (mg NAT/l)</b>	<b>Exposición crónica (mg NAT/l)</b>
<i>Peces óseos</i>	<b>4-33</b>	<b>1-7</b>
<i>Crustáceos bentónicos</i>	<b>6-8</b>	<b>2-3</b>
<i>Otros invertebrados (anélidos, moluscos, etc.)</i>	<b>17-23</b>	<b>4-5</b>

Figura 10. Límites máximos recomendables para una exposición aguda de amoníaco en distintos taxa de organismos acuáticos.

La tabla muestra rango de valores máximos promedio de concentración tolerable en exposiciones de una hora de duración, recomendables por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos para exposiciones agudas y crónicas en diferentes taxa (géneros y especies) de agua dulce. Los valores están expresados como Nitrógeno-Amonio total (NAT) en mg/L. Modificado de EPA [27].

### **Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro**

El objetivo general de esta sección es que los alumnos entiendan el mecanismo de toxicidad del amoníaco en función del potencial hidrógeno del medio externo en animales acuáticos. Los objetivos específicos de esta sección apuntan a que los estudiantes (1) registren el efecto sobre la frecuencia respiratoria en peces teleósteos; y (2) evalúen cualitativamente el efecto del amoníaco sobre el comportamiento y la fisiología de estrés en diferentes modelos invertebrados. Esta experiencia nos permitirá además repasar los mecanismos de excreción del nitrógeno en los animales y las ventajas/desventajas fisiológicas de cada molécula nitrogenada como producto de excreción. Adicionalmente, es esperable que hipoteticen las ventajas ecológicas y evolutivas de organismos hipoteticen sobre la capacidad de recuperación de los organismos ante pulsos de contaminación nitrogenada en el ambiente.

## Material

### Material de laboratorio

- 6 acuarios acondicionados (ver [Nota 3](#)) divididos en tres grupos experimentales (ver [Nota 8](#)).
- Redes de seda o tejido sintético de diferentes tamaños.
- Balanza analítica.
- PHmetro electrónico o cintas de papel indicadoras de pH.
- Pipetas Pasteur.
- Varillas de plástico.
- Recipiente plástico graduado de 5 L.
- Vasos de precipitado graduado de 500 mL y 1000 mL.
- Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , PM 158,11 g/mol); solución stock 100 g/L (ver [Nota 5](#)).
- Ácido clorhídrico 1N.
- Hidróxido de sodio 1N.
- Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , PM 132 g/mol), solución 1M.

### Material biológico

- 5 ejemplares juveniles ( $>2$ ,  $< 5$  cm de longitud estándar; ver [Nota 9](#)) del pez *Carassius auratus*.
- 5 ejemplares adultos ( $> 3$  cm longitud total) del camarón *Macrobrachium* sp./*Palaemonetes* sp.
- 5 ejemplares adultos ( $> 2$  cm de longitud recta de la concha, ver [Nota 10](#)) del caracol *Pomacea canaliculata*.

## Metodología

1. *Preparación de agua dulce declorada*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 4 L de agua corriente. Con la pipeta Pasteur, agregar 2 gotas de solución stock de

tiosulfato de sodio por litro de agua. Repetir hasta completar el volumen de los acuarios experimentales.

2. *Acondicionamiento de los acuarios experimentales* (ver [Nota 3](#)): Fijar una línea de aire con una piedra difusora, ventosa y regulador de flujo. Fijar el termocalentador sumergible y el termómetro de alcohol en las paredes del acuario. Cargar cuidadosamente con el agua. Conectar la línea de aire al compresor de aire y regular la salida de forma de establecer un burbujeo homogéneo y suave.

3. Desde los acuarios de mantenimiento, trasladar a los ejemplares en forma individual en vasos de precipitado de tamaño adecuado, en la misma agua del bioterio de mantenimiento.

4. Dividir a los animales en los tres acuarios, procurando ubicar un ejemplar de cada especie por acuario.

5. Calcular el volumen necesario de solución stock de sulfato de amonio necesaria para obtener valores de amonio total de aproximadamente 1, 5, y 10 mg/L de Nitrógeno-Amonio total (NAT) por cada acuario experimental ([Figura 11](#)).



<b>Elemento</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Compuesto</b>
Hidrógeno	<b>H</b>	<b>1</b>	-
Oxígeno	<b>O</b>	<b>16</b>	-
Nitrógeno	<b>N</b>	<b>14</b>	-
Azufre	<b>S</b>	<b>32</b>	-
Sulfato de amonio	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	-	<b>132</b>
Catión amonio	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	-	<b>18</b>

**NAT (%)                    18,76**

<i>Solución madre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [M]</i>	1	
<i>Solución madre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [g/l]</i>	<b>132</b>	
<i>Solución madre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mg NAT/ml)</i>	36	<b>0,036</b>
<i>Solución final [mg NAT/l] t=1</i>	1	<b>0,000001</b>
<i>Solución final [mg NAT/l] t=2</i>	5	
<i>Solución final [mg NAT/l] t=3</i>	10	
<i>Vf (μl)</i>	3000000	

	<b>Vi solución madre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (μl)</b>		
	<b>t=1</b>	<b>t=2</b>	<b>t=3</b>
	<b>83,3</b>	<b>416,7</b>	<b>833,3</b>
<b>pH (acuario 2)</b>	6,5	6,5	6,5
<b>pH (acuario 1)</b>	7	7	7
<b>pH (acuario 3)</b>	8	8	8

Figura 11. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con los cálculos de volumen de solución de sulfato de amonio a utilizar en los acuarios experimentales.

6. Llenar las peceras con agua de clorada. Conectar aireación suave.
  
7. Llevar el pH del acuario experimental 1 a 7,0. Con cuidado, modificar el pH del acuario (ver [Nota 11](#)) experimental 2 hacia el valor 6,5 (agregando HCl). Hacer lo mismo en el acuario experimental 3, de forma de llevar el pH hacia el valor 8,0 (con el agregado de NaOH).
  
8. Una vez estabilizado el pH, introducir los animales en los acuarios procurando el menor estrés posible. Esperar al menos 15 minutos a que los animales estabilicen su ritmo respiratorio. Puede en esta instancia registrarse frecuencia respiratoria y datos cualitativos comportamentales como instancia control de la experiencia (ver punto 9).

9. Agregar a cada acuario la cantidad suficiente de sulfato de amonio, de modo de llegar a una concentración final de 1 mg NAT/L ( $t=1$ ). Luego de 15 minutos, anotar y registrar el ritmo respiratorio (en base a los movimientos operculares) del pez, la secreción mucosa y el comportamiento general de las tres especies; adicionalmente, con ayuda de la varilla plástica, evaluar el comportamiento de huida del camarón fantasma (ver [Nota 12](#)).

10. Posteriormente, elevar la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta 5 mg NAT/L. Proceder como en el punto 9. En el caso de registrar un comportamiento franco de intoxicación en los animales, imponer el punto final humanitario recomendado para el experimento por el comité de bioética animal, que en este caso implica regresar al animal al acuario con agua libre de amonio.

11. Luego de 15 minutos, elevar la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta 10 mg NAT/L. Proceder como en el punto 9. En el caso de registrar un comportamiento franco de intoxicación en los animales, imponer el punto final humanitario recomendado para el experimento por el comité de bioética animal, que en este caso implica regresar al animal al acuario con agua libre de amonio.

### **Análisis de resultados**

1. Anotar los datos obtenidos (cualitativos y cuantitativos) en diferentes hojas de cálculo para cada pH estudiado en todos los ejemplares de peces, crustáceos y gasterópodos (pH 6,5: 1 mg NAT/L, [Figura 12](#); 5 mg NAT/L, [Figura 13](#); 10 mg NAT/L, [Figura 14](#); pH 7,0: 1 mg NAT/L, [Figura 15](#); 5 mg NAT/L, [Figura 16](#); 10 mg NAT/L, [Figura 17](#); pH 8,0: 1 mg NAT/L, [Figura 18](#); 5 mg NAT/L, [Figura 19](#); 10 mg NAT/L, [Figura 20](#)). Es conveniente guardar las hojas en un mismo archivo. Graficar ritmo respiratorio de *Carassius auratus* vs concentración de amonio NAT ([Figura 21](#)); graficar también el ritmo respiratorio de *Carassius auratus* en función del pH a una misma concentración de amonio. Identificar forma y pendientes de las curvas. Si hay al menos tres repeticiones, los alumnos pueden además calcular datos de dispersión (varianza, desvío estándar, rangos, etc.) en las variables cuantitativas.

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares /min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón /10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>
1 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	54	N/A	normal	N/A	- -	-	-
		2	63	N/A	normal	N/A	+ -	-	-
		3	38	N/A	normal	N/A	- -	-	-
		4	50	N/A	normal	N/A	- -	-	-
		5	63	N/A	normal	N/A	- -	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	normal	N/A	- -	-	-
		2	N/A	0	normal	N/A	- -	-	-
		3	N/A	0	normal	N/A	- -	-	-
		4	N/A	0	normal	N/A	- -	-	-
		5	N/A	0	normal	N/A	- -	-	-
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	N/A	+	- -	-	-
		2	N/A	N/A	N/A	++	+ -	-	-
		3	N/A	N/A	N/A	+++	- -	-	-
		4	N/A	N/A	N/A	++	- -	-	-
		5	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+ -	-

Figura 12. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 6,5; 1 mg NAT/L). Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares /min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón / 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>
5 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	56	N/A	normal	N/A	-	-	-
		2	54	N/A	normal	N/A	+	-	-
		3	45	N/A	normal	N/A	-	-	-
		4	54	N/A	normal	N/A	-	-	-
		5	62	N/A	normal	N/A	-	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		2	N/A	1	normal	N/A	-	-	-
		3	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		4	N/A	1	normal	N/A	-	-	-
		5	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	++	-	-	-
		2	N/A	N/A	-	+++	-	-	-
		3	N/A	N/A	-	++	+	-	-
		4	N/A	N/A	-	++	-	-	-
		5	N/A	N/A	-	++	+	-	-

Figura 13. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 6,5; 5 mg NAT/L). Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>
<b>10 mg NAT/litro</b>	<i>Carassius auratus</i>	1	58	N/A	normal	N/A	+	-	-
		2	55	N/A	normal	N/A	+	-	-
		3	40	N/A	normal	N/A	-	-	-
		4	60	N/A	+	N/A	-	-	-
		5	65	N/A	normal	N/A	+	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		2	N/A	0	normal	N/A	+	-	-
		3	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		4	N/A	1	normal	N/A	-	-	-
		5	N/A	1	normal	N/A	-	-	-
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	+++	+	-	-
		2	N/A	N/A	-	++	-	-	-
		3	N/A	N/A	-	+++	+	-	-
		4	N/A	N/A	-	+++	+	-	-
		5	N/A	N/A	-	++	?	-	-

Figura 14. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 6,5; 10 mg NAT/L). Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>
<b>1 mg NAT/litro</b>	<i>Carassius auratus</i>	1	58	N/A	normal	N/A	-	-	-
		2	61	N/A	normal	N/A	-	-	-
		3	49	N/A	normal	N/A	-	-	-
		4	70	N/A	normal	N/A	-	-	-
		5	60	N/A	normal	N/A	-	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		2	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		3	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		4	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
		5	N/A	0	normal	N/A	-	-	-
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	N/A	+	-	-	-
		2	N/A	N/A	N/A	++	+	-	-
		3	N/A	N/A	N/A	+++	-	-	-
		4	N/A	N/A	N/A	++	-	-	-
		5	N/A	N/A	N/A	++	+	-	-

Figura 15. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 7,0; 1 mg NAT/L). Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>	
5 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	56	N/A	normal	N/A	-	-	-	
		2	63	N/A	normal	N/A	+	-	-	
		3	52	N/A	N/A	normal	N/A	-	-	-
		4	71	N/A	N/A	+	N/A	+	-	-
		5	64	N/A	N/A	normal	N/A	-	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	normal	N/A	-	-	-	
		2	N/A	1	normal	N/A	-	-	-	
		3	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
		4	N/A	1	normal	N/A	-	-	-	
		5	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	++	-	-	-	
		2	N/A	N/A	-	+++	+	-	-	
		3	N/A	N/A	-	++	+	-	-	
		4	N/A	N/A	-	++	-	-	-	
		5	N/A	N/A	-	+	+	-	-	

Figura 16. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 7,0; 5 mg NAT/L).

Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>	
10 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	58	N/A	normal	N/A	+	-	-	
		2	69	N/A	normal	N/A	+	-	-	
		3	59	N/A	N/A	normal	N/A	-	-	-
		4	80	N/A	N/A	+	N/A	-	-	-
		5	71	N/A	N/A	normal	N/A	++	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	+	N/A	-	-	-	
		2	N/A	0	normal	N/A	+	-	-	
		3	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
		4	N/A	1	+	N/A	+	-	-	
		5	N/A	1	+	N/A	-	-	-	
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	+++	+	-	-	
		2	N/A	N/A	-	-	-	+	-	
		3	N/A	N/A	-	+++	+	-	-	
		4	N/A	N/A	-	+++	+	-	-	
		5	N/A	N/A	-	-	-	+	-	

Figura 17. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 7,0; 10 mg NAT/L).

Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>	
1 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	49	N/A	normal	N/A	-	-	-	
		2	66	N/A	normal	N/A	+	-	-	
		3	59	N/A	N/A	+	N/A	+	-	-
		4	61	N/A	N/A	normal	N/A	-	-	-
		5	65	N/A	N/A	normal	N/A	-	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	normal	N/A	-	-	-	
		2	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
		3	N/A	1	+	N/A	+	-	-	
		4	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
		5	N/A	0	normal	N/A	-	-	-	
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	N/A	++	-	-	-	
		2	N/A	N/A	N/A	++	+	-	-	
		3	N/A	N/A	N/A	+++	-	-	-	
		4	N/A	N/A	N/A	++	+	-	-	
		5	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+	-	-

Figura 18. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 8,0; 1 mg NAT/L).

Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>*4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>	
5 mg NAT/litro	<i>Carassius auratus</i>	1	60	N/A	++	N/A	-	-	-	
		2	70	N/A	+	N/A	+	-	-	
		3	71	N/A	N/A	normal	N/A	+	-	-
		4	74	N/A	N/A	+	N/A	+	-	-
		5	72	N/A	N/A	++	N/A	-	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	+	N/A	-	-	-	
		2	N/A	1	normal	N/A	+	-	-	
		3	N/A	1	+	N/A	-	+	-	
		4	N/A	1	+	N/A	-	+	-	
		5	N/A	1	normal	N/A	-	+	-	
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	+	-	+	-	
		2	N/A	N/A	-	+	+	-	-	
		3	N/A	N/A	-	-	+	-	-	
		4	N/A	N/A	-	+	-	++	-	
		5	N/A	N/A	-	-	+	-	-	

Figura 19. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 8,0; 5 mg NAT/L).

Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

	Especie	Ejemplar	Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min) <sup>*1</sup>	Frecuencia respiratoria pulmonar (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup>	Secreción mucosa <sup>*3</sup>	Reactividad <sup>4</sup>	Excitación nerviosa <sup>*5</sup>	Depresión nerviosa <sup>*6</sup>	Muerte <sup>*7</sup>
<b>10 mg NAT/litro</b>	<i>Carassius auratus</i>	1	89	N/A	++	N/A	+	-	-
		2	101	N/A	+	N/A	+	-	-
		3	104	N/A	++	N/A	-	-	-
		4	98	N/A	+++	N/A	-	-	-
		5	92	N/A	++	N/A	++	-	-
	<i>Pomacea canaliculata</i>	1	N/A	1	+	N/A	-	-	-
		2	N/A	1	+	N/A	+	-	-
		3	N/A	1	++	N/A	-	-	-
		4	N/A	1	+	N/A	+	-	-
		5	N/A	1	+	N/A	-	-	-
	<i>Macrobrachium borellii</i>	1	N/A	N/A	-	-	-	-	+
		2	N/A	N/A	-	-	-	+	-
		3	N/A	N/A	-	-	-	++	-
		4	N/A	N/A	-	-	-	-	+
		5	N/A	N/A	-	-	-	+	-

Figura 20. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria y otras variables experimentales de *C. auratus*, *P. canaliculata*, y *M. borellii* (pH 8,0; 10 mg NAT/L).

Referencias <sup>\*1-7</sup> ver [Nota 12](#).

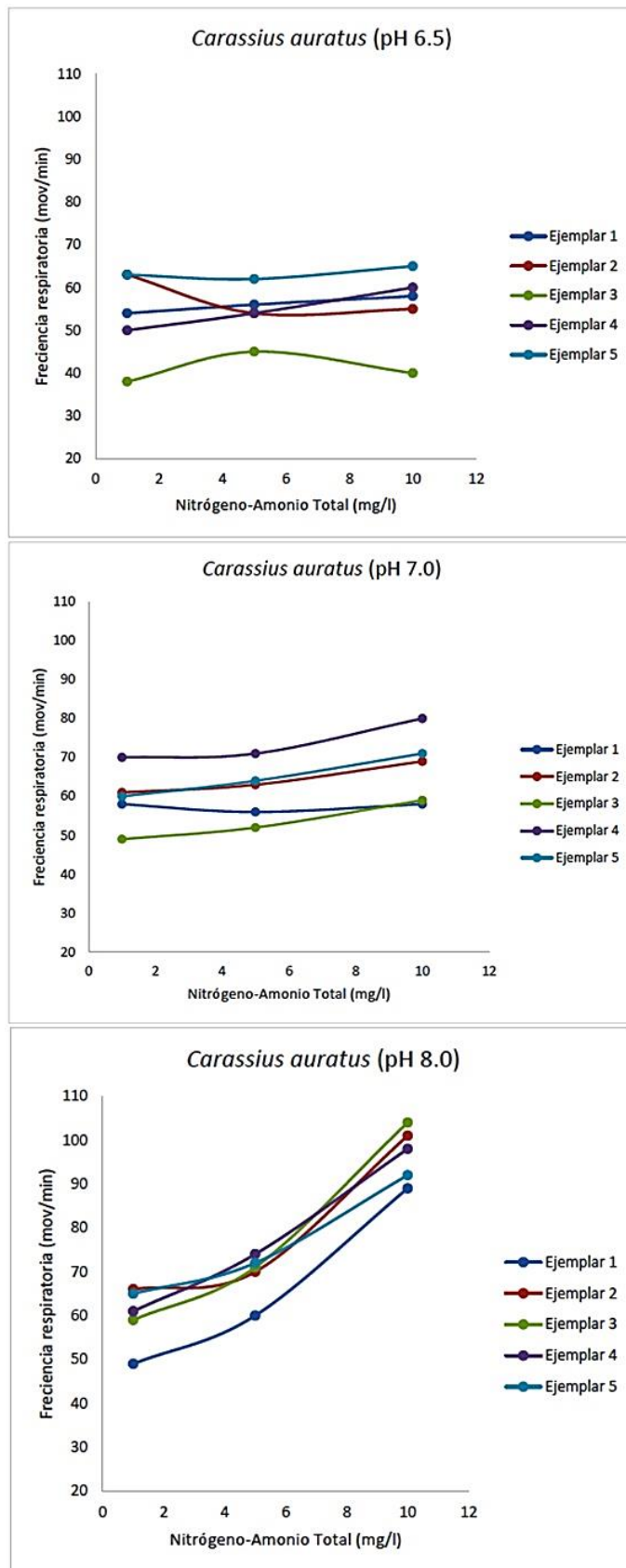


Figura 21. Variación de la frecuencia respiratoria en función de la concentración NAT en 5 ejemplares de *C. auratus* a un potencial hidrógeno de 6,5; 7,0; y 8,0.



2. Discutir el comportamiento de los invertebrados en función de la concentración de amonio total y el pH.
3. Discutir y concluir sobre los resultados generales, focalizando la discusión en las siguientes preguntas orientativas:
4. ¿A qué se atribuye el efecto tóxico del amonio libre? Correlacione la forma, solubilidad y tamaño de la molécula con sus efectos celulares.
5. ¿Cómo relaciona el cambio comportamental en los invertebrados y la concentración de amonio libre? Prestar atención al efecto neurológico y a la ionización de la molécula en función de la barrera hematoencefálica ¿Puede atravesarla como forma ionizada?
6. ¿Cómo influiría la temperatura sobre el efecto tóxico del amonio libre un organismo animal? ¿Cuál es la explicación fisiológica?

## 5 LA HOMEOSTASIS DE LA MATERIA



## Marco teórico

Los mecanismos fisiológicos que mantienen el medio interno constante funcionan en condiciones normales por múltiples bucles autorregulatorios. Sin embargo, estos mecanismos de retroalimentación no son cerrados, sino que necesitan de un flujo de energía y recambio de materia. La entrada de materia nueva involucra el ingreso, vía ingestión de alimentos, de los nutrientes necesarios para mantener la homeostasis y estructura corporal: hablamos de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, y minerales.

Los animales han desarrollado diferentes estrategias de alimentación a lo largo de la evolución. Por ejemplo, muchos animales acuáticos se alimentan filtrando al alimento de la columna del agua por estructuras especializadas. Otros establecen asociaciones simbióticas con otros organismos, quienes son los encargados de sintetizar los compuestos necesarios para el funcionamiento del huésped. Sin embargo, la mayoría de los animales se alimentan de otros organismos sobre los que predan y digieren en el tubo digestivo para luego absorber los componentes esenciales a medida que llegan al intestino.

La digestión es el proceso de transformación de los alimentos, previamente ingeridos, en sustancias más sencillas para ser absorbidos, ya que en términos generales la mucosa gastrointestinal no puede hacerlo cuando los alimentos están en su forma natural. El sistema digestivo es un tubo abierto, generalmente de un solo sentido, que cuenta con órganos y varias glándulas accesorias como las glándulas salivales, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas de los vertebrados, o la glándula digestiva ('hepatopáncreas'), glándulas salivales o glándulas unicelulares en los invertebrados ([Figura 22](#)).

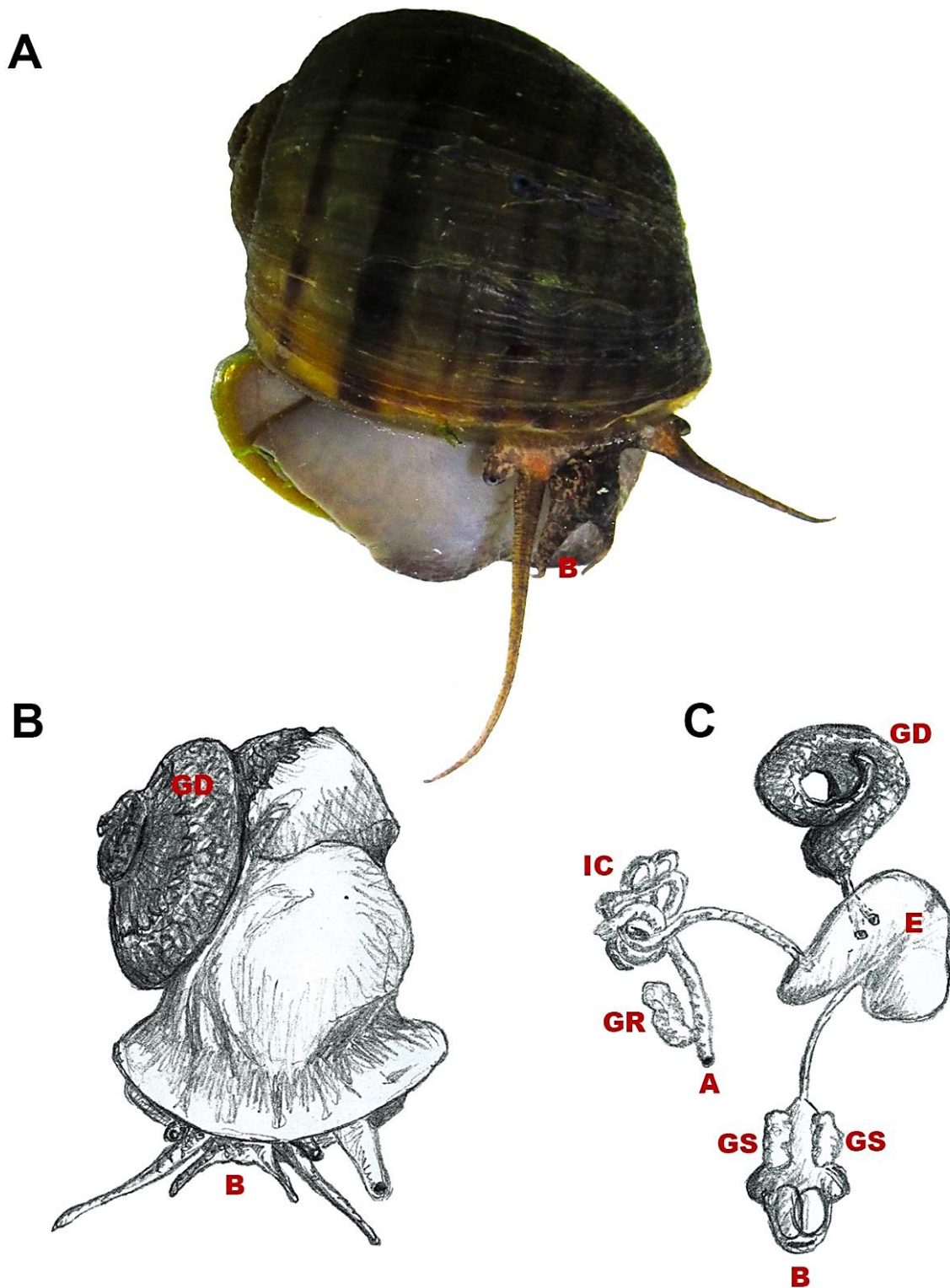


Figura 22. Ejemplo de la anatomía del sistema digestivo de un invertebrado, el caracol manzana. **A.** Aspecto externo *in vivo* de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Ampullariidae, Gastropoda). **B.** Ilustración que muestra la topografía de los órganos internos del molusco, luego de retirar su concha. **C.** Esquema simplificado del tubo digestivo. En letras rojas, se indican órganos y estructuras anatómicas. B: boca. GD: glándula digestiva. GS: glándula salival. E: estómago. IC: intestino contorneado. GR: glándula rectal. A: ano. Modificado de Dellagnola 2015 [39].

La fisiología de la digestión puede dividirse en dos etapas; una etapa mecánica (o masticación) y una etapa química (por medio de enzimas que degradan el alimento en sus compuestos más simples). Como ocurre en la mayoría de los mecanismos fisiológicos que estudiaremos, esta división es sólo a los fines didácticos y de facilitar nuestra comprensión de lo observado. La realidad indica que ambas etapas comienzan ya en la boca. En los vertebrados, por la masticación se corta, muele y tritura la comida sólida; facilitando de esta forma la deglución y ampliando la superficie del bolo alimenticio para la acción de las enzimas digestivas. Al mismo tiempo, las glándulas salivales secretan, entre otros compuestos, enzimas amilasas. Las amilasas pueden desdoblar los azúcares complejos que forman el almidón en azúcares simples. Posteriormente, este bolo alimenticio pasa hacia el esófago, por el cual ingresa finalmente a un ensanchamiento del tubo digestivo denominado estómago. En el estómago se secretan varias sustancias, pero sólo dos hemos de destacar: el ácido clorhídrico sintetizado por las células oxínticas, y el pepsinógeno (cimógeno) sintetizado por las células principales. El pepsinógeno se convierte en pepsina en medio ácido. Tanto el ácido como la enzima pepsina son capaces de convertir el sustrato proteico del alimento en pequeños polipéptidos.

El páncreas y el hígado en conjunto aportan al intestino delgado, lugar donde comienza la última etapa de digestión extracelular, una gran cantidad de sales biliares, bicarbonato, y enzimas lipasas que se encargan, por una parte, de neutralizar el ambiente ácido del alimento que proviene del estómago, y por otro lado de emulsionar las grasas para su descomposición enzimática posterior. Entre otras enzimas, se destaca la tripsina, que también se secreta como cimógeno, pero se activa en el intestino siendo su actividad óptima a pH alcalino. Esta enzima es una endopeptidasa que rompe enlaces peptídicos específicos (lisina/arginina) y continúa la degradación de los polipéptidos iniciada en el estómago. De esta forma, las proteínas liberan a los aminoácidos componentes de su estructura primaria, que continúan su flujo unidireccional, junto con los demás componentes esenciales del alimento, hacia el epitelio intestinal. Los aminoácidos son entonces absorbidos por las microvellosidades intestinales desde donde pasan a la linfa, la cual es conducida hacia el sistema venoso y de allí al hígado, órgano regulador del metabolismo energético por excelencia.

## ***Objetivo general de aprendizaje y expectativas de logro***

El objetivo general es que los estudiantes comprendan la multitud de procesos fisiológicos que ocurren a lo largo de la variable topología del tubo digestivo de un animal. Es deseable que luego de las experiencias los estudiantes sean capaces de identificar las principales moléculas que nutren y conforman los polímeros constitutivos del cuerpo animal, y que relacionen además estos procesos digestivos con la transformación de los solutos orgánicos y el balance de ingesta y pérdida de materia y energía.

## **PARTE A: LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS SALIVALES**

### ***Objetivo parcial y expectativas de logro***

El objetivo de esta sección es evaluar la actividad catalítica de la amilasa de origen salival y el pH adecuado para su funcionamiento. Se espera que los alumnos reconozcan a la amilasa salival como la primera enzima catabólica de carbohidratos, identificando además al pH de neutralidad como ideal para su funcionamiento catalítico.

### ***Material***

Material de laboratorio

- Balanza analítica.
- Pipetas Pasteur.
- 4 varillas de vidrio.
- 4 tubos transparentes graduados tipo Falcon de 15 mL.
- 2 vasos de precipitado graduados (50 y 250 mL)
- Agua destilada.
- Yodo molecular ( $I_2$ ; PM: 253,81 g/mol).
- Yoduro de potasio (KI; PM: 166,01 g/mol).
- Solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.1M pH 7.4 (ver [Nota 13](#)).
- Solución de ácido clorhídrico 1N.

## Material biológico

- Saliva.
- Fécula de maíz (½ cucharada chica de café, equivalente a 5 mL, es suficiente).

## Metodología

1. *Preparación de solución enriquecida en almidón:* En el vaso de precipitado de 250 mL agregar aproximadamente 2 mL de fécula de maíz o 1 g (la densidad de la fécula comercial de maíz es aproximadamente 0,5g/mL) y 20 mL de agua destilada. Calentar la solución en el mechero, agitando constantemente, o hacerlo en un agitador magnético de temperatura constante, de forma de facilitar la disolución del almidón.
2. *Preparación de solución de Lugol (1%):* Pesar 0,5 g de I<sub>2</sub>, 1 g de KI y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Disolver primero el KI en un poco de agua, luego agregar el yodo molecular (que se disuelve gracias al complejo de triyoduro) y finalmente completar el volumen a 100 mL.
3. *Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PB) pH 7.4:* tomar 1,98 mL de solución 1M fosfato de potasio monobásico y 8,02 mL de solución 1M de fosfato de potasio dibásico (ver [Nota 13](#)), completando con 90 mL de agua destilada.
4. *Preparación de solución PB-HCl.* Tomar 2 mL de solución PB y agregar, gota a gota, solución de ácido clorhídrico 1N hasta disminuir el pH a valores ácidos (1-4) (ver [Nota 14](#)).
5. Agregar a cada tubo Falcon un volumen igual de solución almidonada (2 mL) a temperatura moderada (el calor excesivo puede modificar la actividad catalítica de la amilasa).
6. Colectar en el vaso de precipitado de 50 mL unos 5 mL de saliva.
7. Agregar 2 mL de PB en el tubo 1,2, y 3. En el Tubo 4 agregar 2 mL de PB-HCl.

8. Agregar 2 mL de agua destilada en el tubo 1 y 1,5 mL en el tubo 2.
9. Agregar con pipeta Pasteur 0,5 mL de saliva en el tubo 2, y 2 mL de saliva en el tubo 3 y 4. Mezclar por inversión suave.
10. Agregar dos gotas de solución de Lugol a cada tubo. Mezclar por inversión suave.
11. Registrar las observaciones (color e intensidad de color de la solución; ver [Nota 15](#)) a diferentes intervalos de tiempo (0, 5, y 15 min). Interpretar los resultados.

### **Análisis de resultados**

1. Confeccionar una tabla con las observaciones de la experiencia ([Figura 23](#)).

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Solución de almidón (ml)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>PB (ml)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>
<b>PB-HCl (ml)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
<b>Saliva (ml)</b>	<b>-</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>2</b>	<b>1,5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Lugol (gotas)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Color (t=0)</b>				
<b>Color (t= 5 min)</b>				
<b>Color (t=15 min)</b>				

*Figura 23. Ejemplo de tabla a completar con las observaciones de color e intensidad de la solución luego de la experiencia de la Parte A.*

2. Identificar el control y los tratamientos del experimento. Registrar el color de la solución de Lugol en los diferentes tratamientos y a los diferentes tiempos ([Figura 24](#)). Explicar los resultados de cada uno.
















Tubo	1	2	3	4	
Solución de almidón (ml)	2	2	2	2	
PBS (ml)	2	2	2	-	
PB-HCl (ml)	-	-	-	2	
Saliva (ml)	-	0,5	2	2	
H <sub>2</sub> O (ml)	2	1,5	-	-	
Lugol (gotas)	2	2	2	2	Lugol + agua
Color (t=0)					
Color (t= 5 min)					
Color (t=15 min)					

Figura 24. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con el registro de las observaciones del experimento de la Parte A.

## PARTE B: UN ESTÓMAGO *IN VITRO*

### **Objetivo parcial y expectativas de logro**

El objetivo de esta sección es evaluar *in vitro* el efecto del pH estomacal sobre un alimento rico en proteínas y su relación con la masticación. Se espera que los alumnos reconozcan la importancia que tiene la maceración mecánica previo a los procesos químicos de digestión, y reconozcan el efecto de la acidez en el estómago sobre los alimentos previo a la acción de enzimas lumbinales.

### **Material**

#### Material de laboratorio

- Espectrofotómetro UV equipado con cubetas de cuarzo.
- Agitador vórtex (opcional).
- Bisturíes o cuchillas afiladas.
- Pinzas metálicas de disección.
- Pipetas automáticas (100-1000  $\mu$ L)
- Puntas descartables (100-1000  $\mu$ L).
- 4 tubos transparentes graduados tipo Falcon de 15 mL.
- 4 vidrios de reloj.
- 1 probeta graduada de 25 mL.
- Agua destilada.
- Ácido clorhídrico 0.1 N

#### Material biológico

- 4 trozos pequeños de carne (magra) de res, de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>.

## Metodología

- 1- Agregar 5 mL de agua destilada en el primer tubo y 2,5 mL en el segundo.
- 2- Agregar con cuidado en el segundo tubo 2,5 mL de solución de ácido clorhídrico 0,1N; y 5 mL en el tercer y cuarto tubo.
- 3- Colocar los trozos de carne sobre los vidrios de reloj. En los tres primeros, picar la carne con los bisturíes hasta obtener un material disgregado relativamente homogéneo. Dejar intacto el cuarto trozo de carne.
- 4- Colocar, en cada uno de los tres primeros tubos, un trozo de carne que previamente fue picado con el bisturí. En el cuarto tubo coloque el trozo entero de carne sin picar. Esperar durante 15 minutos, agitando vigorosamente por unos 15 segundos a intervalos de 2 minutos (a mano o con ayuda de un agitador vórtex).
- 5- Con una pinza comparar la textura y el 'alimento' extraído (quimo) de cada uno de los tubos.
- 6- Tomar 100  $\mu$ L de la solución de cada tubo y diluir en 900  $\mu$ L de agua destilada. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV a 280 nm de longitud de onda (ver [Nota 16](#)). Restar la absorbancia del blanco (1 mL de agua destilada para el tratamiento 1 y 100  $\mu$ L de solución de HCl 0.1 N diluidos en 900  $\mu$ L de agua destilada para el tratamiento 2, 3 y 4) a la misma longitud de onda. Anotar los resultados en la tabla adjunta.

## Análisis de resultados

1. Confeccionar una tabla con los resultados obtenidos ([Figura 25](#)).

Tubo	1	2	3	4
Carne	picada	picada	picada	entera
H <sub>2</sub> O (ml)	5	2,5	-	-
HCl 0.1N (ml)	-	2,5	5	5
Textura				
Turbidez				
Absorbancia (280 nm)				

Figura 25. Ejemplo de tabla a completar con las observaciones luego de la experiencia de la Parte B.

Identificar el control y los tratamientos del experimento. Registrar en una hoja de cálculo la textura de la carne, la turbidez y la absorbancia de la solución en los diferentes tratamientos ([Figura 26](#)). Explicar los resultados de cada uno.

Tubo	1	2	3	4
Carne	picada	picada	picada	entera
H <sub>2</sub> O (ml)	5	2,5	-	-
HCl 0.1N (ml)	-	2,5	5	5
Textura <sup>*1</sup>	=	+	+++	++
Turbidez <sup>*2</sup>	+	+	++	=
Absorbancia (280 nm)	0,044	0,135	0,207	0,046
Textura <sup>*1</sup>	Disminución cualitativa de la consistencia al pinzarse.			
Turbidez <sup>*2</sup>	Cualitativa relativa a t=0			

Figura 26. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con el registro de las observaciones del experimento de la Parte B.

2. ¿En qué tubo la carne cambió más de textura del alimento? ¿Por qué?
3. ¿Por qué es posible comparar este proceso químico *in vitro* con la digestión?
4. ¿Qué diferencias encuentra con el proceso que ocurre en el estómago?
5. ¿Qué diferencia se encontró entre la carne picada y la carne entera?
6. Si observó diferencias en la absorbancia, ¿A qué la atribuye?

## PARTE C: DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

### *Objetivo parcial y expectativas de logro*

El objetivo de esta sección es evaluar *in vitro* la hidrólisis enzimática de proteínas en la digestión animal. Se espera que los alumnos reconozcan, luego de la experiencia anterior acerca del efecto de la acidez y la mecánica masticatoria, el efecto neto de las enzimas sobre las macromoléculas para completar el proceso digestivo luminal.

### *Material*

Material de laboratorio

- Balanza analítica.
- Mechero.
- Espectrofotómetro UV equipado con cubetas de cuarzo.
- Pipetas automáticas (100-1000  $\mu$ L).
- Puntas descartables (100-1000  $\mu$ L).
- Vaso de precipitado de vidrio de 50 mL.
- 4 microtubos Eppendorf de 2 mL.
- Ácido clorhídrico (0,1 N).
- Gelatina (solución al 2 %).
- Tripsina (solución stock 5mg/mL).

### *Metodología*

1- *Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PB) pH 7.4:* tomar 495  $\mu$ L de solución 1M fosfato de potasio monobásico y 2,005 mL de solución 1M de fosfato de potasio dibásico (ver [Nota 13](#)), completando con 22,5 mL de agua destilada.

2- *Preparación de solución PB-HCl.* Tomar 4 mL de solución PB y agregar, gota a gota, solución de ácido clorhídrico 0,1N hasta disminuir el pH a valores ácidos (1-4) (ver [Nota 14](#)).

3- *Preparación de Solución PB-Gelatina (2%)*. Tomar 5 mL de solución PB y agregar al vaso de precipitado de vidrio; pesar 0,1 g de gelatina (ver [Nota 17](#)) y agregar a la solución PB. Calentar lentamente en el mechero sin que la solución alcance a hervir hasta la completa disolución de la gelatina, agitando continuamente. Esperar a que la temperatura baje lo suficiente (ver [Nota 18](#)) sin que la solución gelifique.

4- Agregar con la micropipeta en los 4 microtubos Eppendorf 1000  $\mu\text{L}$  de *solución PB-Gelatina (2%)* en estado líquido. Ubicar en la heladera a 4°C hasta que gelifique completamente.

5- Una vez solidificada la gelatina, adicionar 0,5 mL de solución preparada según la tabla de la [Figura 27](#):

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>PB-HCl (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	-	-	-	450
<b>Tripsina 5 mg/ml (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	-	10	50	50
<b>PB (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	500	490	450	-

*Figura 27. Volúmenes de reactivos para preparar las soluciones experimentales para la experiencia de la Parte C.*

6- Incubar 1 hora a temperatura ambiente (ver [Nota 17](#)). A intervalos regulares ( $\sim 10$  min), mezclar la fase líquida superior pipeteando suavemente sin tocar la interfase gelificada de la gelatina.

7- Tomar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de cada tubo y diluir en 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro UV a 280 nm de longitud de onda (ver [Nota 16](#)). Restar la absorbancia del blanco (1 mL de solución PB + enzima a concentración adecuada para los microtubos 1, 2 y 3 y Solución PB-HCl + enzima a concentración adecuada para el microtubo 4) a la misma longitud de onda.

### **Análisis de resultados**

1. Identificar el control y los tratamientos del experimento. Anotar los valores de absorbancia de cada tratamiento, corrigiendo las cuentas si fue necesaria una dilución, y graficar la absorbancia en función de la tripsina adicionada en cada tratamiento ([Figura 28](#)). Interpretar los resultados.

Tubo	1	2	3	4
Gelatina 2% (µl)	700	700	700	700
HCl 0.1 N (µl)	-	-	-	450
Tripsina 5mg/ml (µl)	-	10	50	50
H <sub>2</sub> O (µl)	500	490	450	-
Gelificación <sup>*1</sup>	=	=	=	licuación
Absorbancia	0,01	0,091	0,234	1,146

Gelificación<sup>\*1</sup> cualitativa respecto a t=0 (sólido).

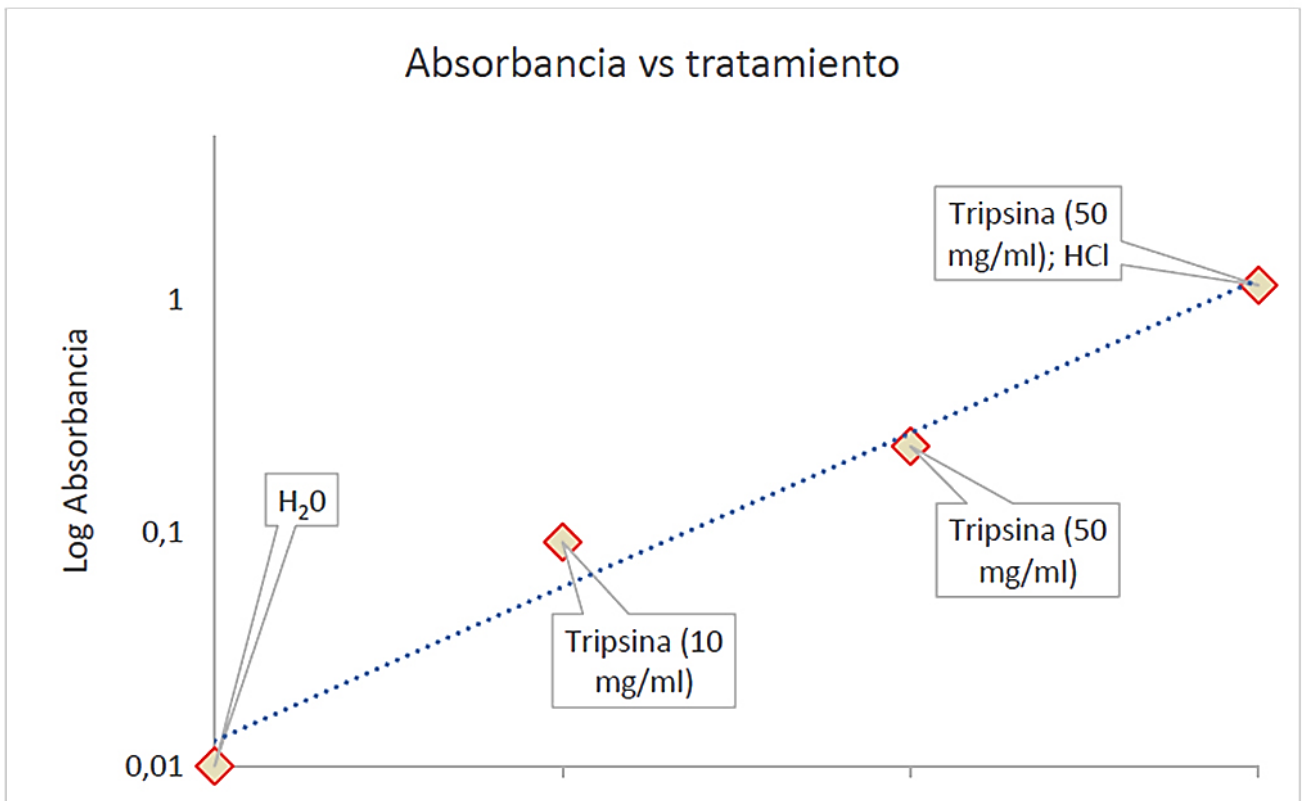


Figura 28. Ejemplo de organización de hoja de cálculo y gráfico de la Absorbancia vs Concentración de Tripsina de la Parte C.



## 6 EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO



## Marco teórico

La temperatura es posiblemente el parámetro físico que más influye en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos. Este parámetro es una medida de una de las formas de energía de la materia, el calor. Sin embargo, el calor, a diferencia de la energía química, eléctrica, y mecánica, es una forma de energía que no realiza ningún tipo de trabajo en los organismos vivos. ¿Por qué entonces es tan importante en el estudio de la fisiología? Por una razón fundamental: los efectos *indirectos* de la temperatura afectan al metabolismo, aumentando la velocidad de las reacciones químicas al aumentar la temperatura, y disminuyendo la solubilidad de los gases en medio acuoso.

Uno de los parámetros más significativos para estudiar la velocidad de consumo de energía en un organismo es el índice metabólico (IM). Este parámetro expresa la cantidad de energía necesaria que necesita un animal para mantener el cuerpo en funcionamiento por unidad de tiempo. El índice metabólico puede medirse directamente por calorimetría, o indirectamente por la medición del consumo de oxígeno de un animal. Diversas variables pueden alterar el índice metabólico de un organismo, por ejemplo, el ejercicio y el consumo de alimentos. Por eso los indicadores utilizados tienen que estar estandarizados, manteniendo a los animales en ayuno y en reposo al realizar la experiencia. En estas condiciones controladas, es posible definir entonces un valor medio de índice metabólico basal (en animales homeotermos) o un índice metabólico estándar (en animales poiquilotermos). Es importante destacar que en los animales que no regulan su temperatura existen tantos IME como temperaturas posibles.

Además, el índice metabólico es una función alométrica respecto al peso corporal y no directa ([Figura 29A](#)). Esto conduce al concepto de índice metabólico específico para el peso. De esta curva puede deducirse que los animales pequeños tienen un índice metabólico específico más elevado en función del peso que los animales grandes. Existen numerosas explicaciones a este fenómeno, aunque la más extendida es la que plantea una mayor relación superficie-volumen en los animales pequeños, y en consecuencia una mayor velocidad de pérdida de calor hacia el medio externo.

Por otra parte, la solubilidad del oxígeno (en condiciones de saturación) disminuye drásticamente al aumentar la temperatura del agua, a salinidad y presión equivalentes ([Figura 29B](#)). En pocas palabras, las aguas frías tienen una mayor capacidad de contener oxígeno que las aguas más cálidas.

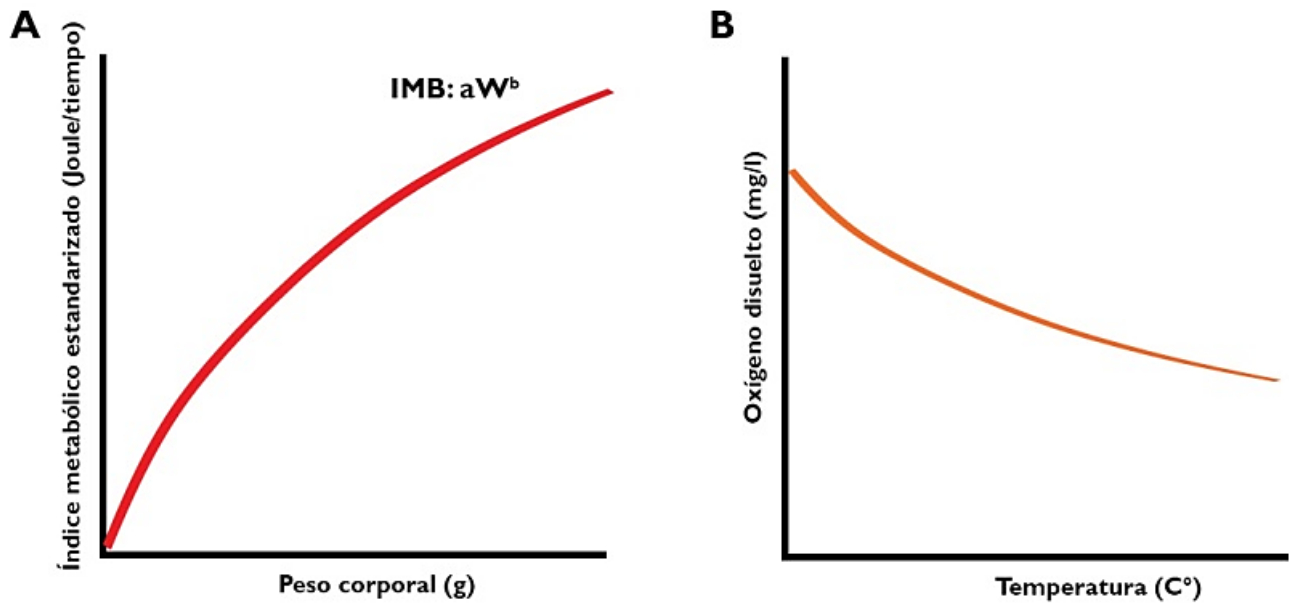


Figura 29. El índice metabólico de los animales en función de su peso corporal y efecto de la temperatura sobre la solubilidad del oxígeno en el agua.

**A.** Curva teórica que muestra la relación alométrica entre el índice metabólico estándar y el peso de un animal. La curva responde a la ecuación  $IMB=aW^b$ ; donde IMB: índice metabólico basal; W. peso del animal, y a-b son constantes. **B.** Curva teórica que muestra la relación inversa entre la concentración de oxígeno en el agua y la temperatura del agua. El valor de concentración del gas corresponde al valor de saturación para cada temperatura.

Estos efectos de la temperatura sobre el metabolismo y la solubilidad de los gases tienen una enorme importancia en el mantenimiento de la homeostasis, particularmente en animales acuáticos que viven en los trópicos, o que viven en regiones templadas con veranos calurosos. Los animales acuáticos tienen además otro problema a resolver y que se origina por la elevada conductividad térmica y capacidad calórica del agua respecto al aire (el agua conduce el calor unas 25 veces más rápido que el aire). Los animales acuáticos pequeños tienden a perder calor más rápidamente que los grandes, y necesitan en consecuencia un mayor consumo por gramo de tejido, oxígeno que está menos disponible en solución. Es entonces que los animales acuáticos pequeños tenderán a aumentar la superficie de intercambio de gases (superficie branquial, por ejemplo) en situaciones de estrés térmico crónico, o aumentando el ritmo respiratorio y cardíaco en situaciones agudas.

Los peces son el grupo de vertebrados más exitoso, con una riqueza específica estimada en unas 32.500 especies [40]. Esta diversidad se ve reflejada también en las diversas estrategias fisiológicas que han desarrollado a través del camino evolutivo para

resolver algunos desafíos ambientales, como ser la antinomia 'índice metabólico-oxígeno disuelto'. Dentro de los peces óseos (Osteichthyes) uno de los órdenes más diversos es el de los Siluriformes ('Bagres' o 'Peces gato'), que cuenta con unas 2800 especies descritas. La riqueza específica de los Siluriformes corresponde a casi el 40% de las especies de peces de agua dulce registradas en Argentina [41]. Los bagres son conocidos peces que han desarrollado la capacidad de respirar aire atmosférico de forma independiente en varios clados, y la respiración dual suele activarse cuando la concentración de oxígeno en el agua es baja [42]. Esta respiración de aire puede cuantificarse por el número de veces que el animal tiene que ascender a la superficie a respirar (ya que la mayoría de los bagres son habitantes del bentos en los cuerpos de agua). Aquí trabajaremos con ejemplares de *Hoplisoma paleatum* (ex. *Corydoras paleatus*; fam. Callichthyidae) (Figura 30) una pequeña especie de bagre acorazado de origen paranoplatense, muy conocida en la afición acuarística. La especie ha sido trasplantada fuera de su área original, desarrollando poblaciones estables hacia el sur y el oeste de la Argentina (incluyendo algunos cuerpos de agua de Mendoza, Dellagnola obs. pers.), lo que proporciona una idea de su rusticidad, resistencia tanto al frío como al calor y disponibilidad de individuos; características que lo hace apto para esta experiencia.



Figura 30. La especie animal elegida para el experimento: el pez limpiafondos. *Hoplisoma paleatum* (Jenyns, 1842) (Osteichthyes, Callichthyidae), un pequeño 'pez gato acorazado' nativo del país, en el acuario.

## Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro

El objetivo general de esta sección es que los alumnos identifiquen el principal factor (la temperatura) que influye en el índice metabólico de animales ectotérmicos. Los objetivos específicos de esta sección apuntan a que los estudiantes (1) analicen el efecto de la temperatura sobre la frecuencia respiratoria de un animal acuático con respiración dual, *Hoplisoma paleatum*; y (2) evalúen el efecto de la temperatura y el consumo de oxígeno en función del tamaño corporal en el mismo modelo animal. Esta experiencia nos permitirá además repasar los factores biológicos que influyen en el índice metabólico, y a través de la estimación de frecuencia respiratoria e intercambio de gases en el agua, revisar los métodos indirectos de estimación del IM en los animales.

## Material

### Material de laboratorio

- 6-9 acuarios acondicionados (ver [Nota 3](#)) divididos en tres grupos experimentales (ver [Nota 19](#)).
- 12 separadores rígidos de ~1 cm de tamaño de poro (ver [Nota 20](#)).
- Redes de seda o tejido sintético de diferentes tamaños.
- Bolsas de gel refrigerante (ver [Nota 19](#)).
- Balanza analítica.
- PHmetro.
- Oxímetro o test colorimétrico de oxígeno (ver [Nota 21](#)).
- Pipetas Pasteur.
- Recipiente plástico graduado de 5 L.
- Probeta de 500 mL.
- Vasos de precipitado graduado de 500 mL y 1000 mL.
- Agua destilada.
- Cloruro de sodio (NaCl; PM: 58,44 g/mol).
- Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , PM 158,11 g/mol); solución stock 100 g/L (ver [Nota 5](#)).

## Material biológico

- 9 ejemplares pequeños de *Hoplisoma paleatum*, ayunados desde el día anterior.
- 9 ejemplares grandes de *Hoplisoma paleatum* ayunados desde el día anterior.

## Metodología

1. *Preparación de agua dulce declorada*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 4 L de agua corriente. Con la pipeta Pasteur, agregar 2 gotas de solución stock de tiosulfato de sodio por litro de agua. Repetir hasta completar el volumen de los acuarios experimentales.
2. *Acondicionamiento de los acuarios experimentales de agua corriente declorada* (ver [Nota 3](#)): Fijar una línea de aire con una piedra difusora, ventosa y regulador de flujo. Fijar el termocalentador sumergible y el termómetro de alcohol en las paredes del acuario. Cargar cuidadosamente con el agua. Conectar la línea de aire al compresor de aire y regular la salida de forma de establecer un burbujeo homogéneo y suave.
3. *Preparación de agua reconstituida con NaCl*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 3,5 L de agua destilada con el agregado de 1,75 g de NaCl; agregar además 390 mL de agua corriente (ver [Nota 22](#)) con la probeta de 500 mL. Utilizando la pipeta Pasteur, agregar 1 gota de solución stock de tiosulfato de sodio. Repetir hasta completar el volumen de los seis acuarios experimentales.
4. Desde los acuarios de mantenimiento, trasladar a los ejemplares en forma individual en vasos de precipitado de tamaño adecuado, en la misma agua del bioterio de mantenimiento.
5. Dividir a los peces en los seis acuarios, procurando ubicar tres ejemplares 'pequeños' y tres ejemplares 'grandes' por acuario experimental (es recomendable medir la longitud estándar de los peces y separarlos entonces en dos grupos, el primero conformado por los ejemplares con mayores valores de longitud estándar (LE) y el segundo grupo conformado por los individuos de menores valores de LE; ver [Nota 23](#)). Ubicar aleatoriamente un

ejemplar pequeño y un ejemplar grande por cada espacio delimitado por separadores, de forma que sean fácilmente reconocibles individualmente por el observador.

6. En los acuarios designados como control experimental, ubicar a los peces a la misma temperatura que el acuario de mantenimiento (20-25 °C). Esperar que los animales se habitúen al acuario al menos por unos 10 minutos y proceder con el experimento. Desconectando la aireación, contar los movimientos operculares por minuto cada 10 minutos, repitiendo hasta finalizar cuarenta minutos totales experimentales desde el primer conteo. Durante ese período de tiempo, contar además el llenado intestinal de los ejemplares (ver [Nota 24](#)).

7. En los acuarios destinados al tratamiento hipotérmico, ubicar a los peces y bajar lentamente la temperatura con las bolsas de geles refrigerantes a 10 °C. Una vez alcanzado este punto, esperar 10 minutos. Desconectando la aireación, contar los movimientos operculares por minuto cada 10 minutos, repitiendo hasta finalizar cuarenta minutos totales experimentales desde el primer conteo. Durante ese período de tiempo, contar además el llenado intestinal de los ejemplares.

8. En los acuarios destinados al tratamiento hipertérmico, ubicar a los peces y aumentar en forma lenta pero uniforme la temperatura del agua ajustando los termocalefactores a 32 °C. Desconectando la aireación, contar los movimientos operculares por minuto cada 10 minutos, repitiendo hasta finalizar cuarenta minutos totales experimentales desde el primer conteo. Durante ese período de tiempo, contar además el llenado intestinal de los ejemplares.

9. En caso de detectar signos de descompensación franca (natación anormal, pérdida de equilibrio) imponer el punto final humanitario recomendado para el experimento por el comité de bioética animal, que en este caso implica regresar, lentamente, el agua del acuario a temperaturas de 20-25 °C.

10. A los 0, 20 y 40 minutos de cada experimento, medir el pH y el oxígeno disuelto del agua.

11. Al finalizar la última medición, conectar nuevamente la aireación y regresar gradualmente la temperatura a 20-25 °C.

### **Análisis de resultados**

1. Anotar los datos obtenidos en diferentes hojas de cálculo para cada uno de los tratamientos térmicos en ambas categorías cualitativas de tamaño relativo ([Figura 31](#)). Identificar forma y pendientes de las curvas. Si hay al menos tres repeticiones, los alumnos pueden además calcular datos de dispersión (varianza, desvío estándar, rangos, etc.). Se recomienda centralizar todos los registros y gráficos en un mismo archivo de hoja de cálculo.

2. Graficar frecuencia respiratoria de *Hoplisoma paleatum* vs el tiempo (movimientos/min; [Figura 32](#)), y el número absoluto de eventos de respiración intestinal (eventos/min) en rangos temporales de 10 minutos para todas las categorías de tamaños y tratamientos. Se recomienda centralizar todos los registros y gráficos en un mismo archivo de hoja de cálculo.

3. Anotar y graficar el pH del acuario en función del tiempo, y la concentración de oxígeno disuelto del acuario en función del tiempo ([Figura 33](#)). Se recomienda centralizar todos los registros y gráficos en un mismo archivo de hoja de cálculo.



		Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min a 25 °C)					Respiración intestinal (eventos absolutos a 25 °C)			
Ejemplar	Longitud estándar	t=0	t=10	t=20	t=30	t=40	t=0/10	t=10/20	t=20/30	t=30/40
1	1.6	50	55	62	66	78	1	0	1	2
2	1.8	54	60	64	66	72	2	1	2	0
3	2.1	60	64	66	70	84	0	1	1	1
4	4.1	40	45	52	56	60	0	0	0	1
5	4.5	46	52	54	56	62	0	0	1	1
6	4.9	42	48	56	62	66	0	0	0	1

		Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min a 10 °C)					Respiración intestinal (eventos absolutos a 10 °C)			
Ejemplar	Longitud estándar	t=0	t=10	t=20	t=30	t=40	t=0/10	t=10/20	t=20/30	t=30/40
1	1.7	26	32	36	42	46	0	0	0	0
2	2.7	36	42	42	48	50	0	0	0	1
3	1.9	36	44	42	46	48	0	0	0	0
4	4.7	24	26	30	36	36	0	0	0	0
5	5.7	26	30	36	36	40	0	0	0	0
6	6	30	26	36	42	45	0	0	0	0

		Frecuencia respiratoria branquial (mov. operculares/min a 32 °C)					Respiración intestinal (eventos absolutos a 32 °C)			
Ejemplar	Longitud estándar	t=0	t=10	t=20	t=30	t=40	t=0/10	t=10/20	t=20/30	t=30/40
1	1.8	78	84	96	120	124	3	2	5	7
2	1.9	82	90	114	120		2	2	4	6
3	1.8	80	90	116	122	130	4	4	7	9
4	4.9	70	78	90	110		2	2	4	5
5	4.7	76	80	86	110		2	3	3	5
6	5.5	80	84	90	116	120	2	2	4	6

Figura 31. Ejemplo de organización de hoja de cálculo con la frecuencia respiratoria branquial e intestinal de *H. paleatum* a 25, 10 y 32 °C.

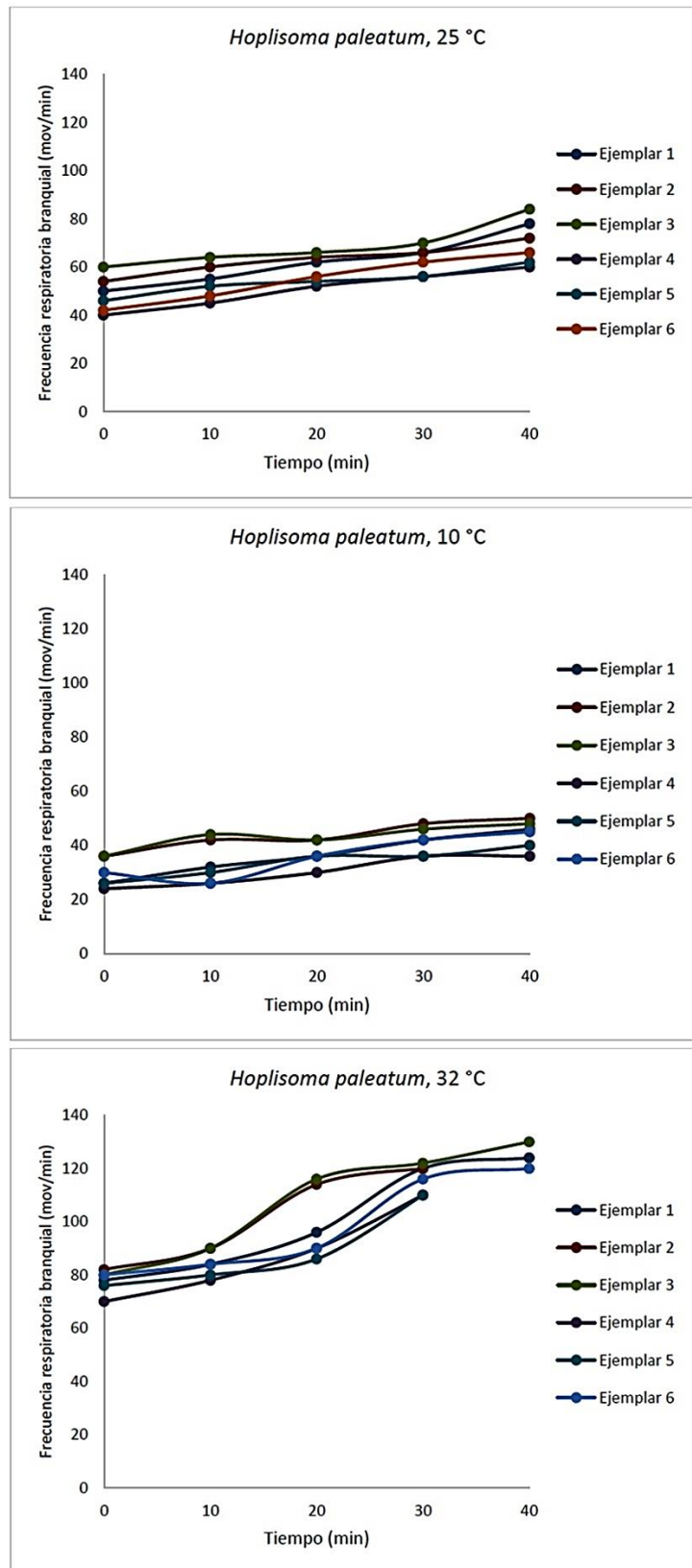


Figura 32. Variación de la frecuencia respiratoria branquial en función del tiempo en 6 ejemplares de *H. paleatum* a 25, 10 y 32 °C.

Los ejemplares 1-3 corresponden a las mayores longitudes estándar (LE), mientras que los ejemplares 4-6 a los de menor LE.

	Temperatura(°C)	pH			Oxígeno disuelto (mg/l)		
		t=0	t=20	t=40	t=0	t=20	t=40
Acuario 1	25	7,1	7,07	6,9	8	6,9	4,9
Acuario 2	10	7,05	7,04	7,02	8	8	7,4
Acuario 3	32	7,15	6,94	6,5	6	4,4	1,5

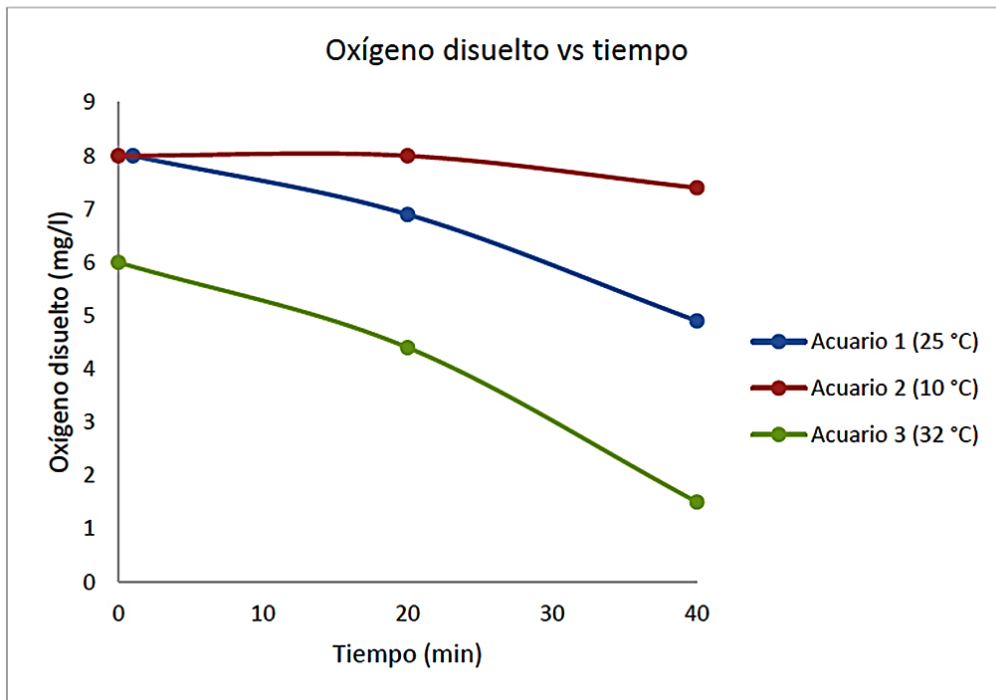
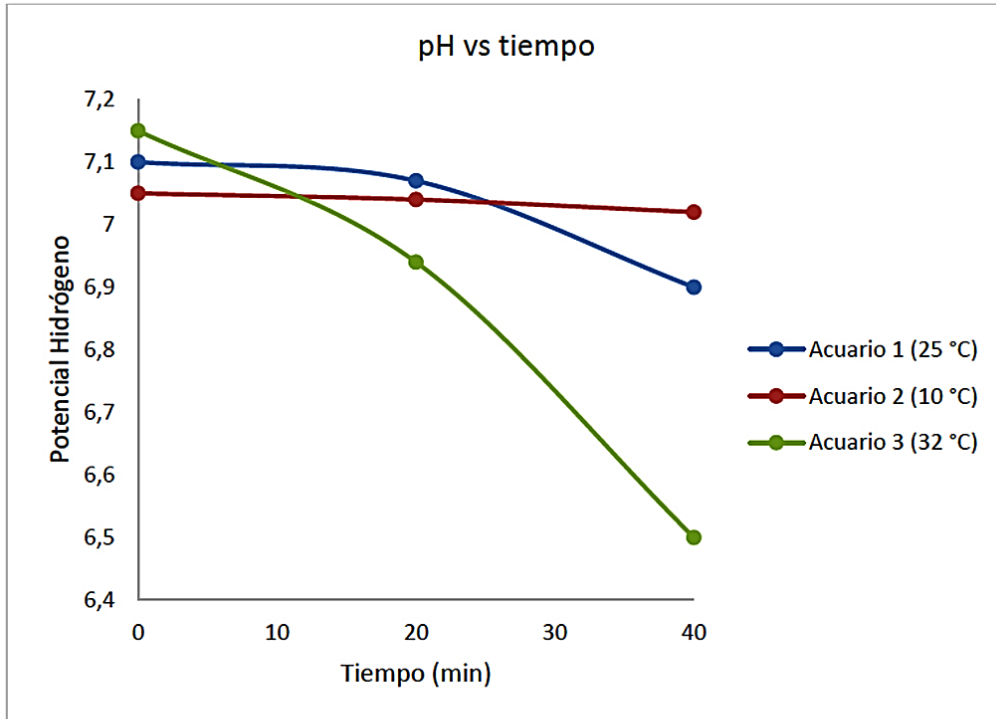


Figura 33. Variación del pH y el oxígeno disuelto en función del tiempo a 25, 10 y 32 °C.

4. Discutir y concluir sobre los resultados, tomando en cuenta las siguientes preguntas:
5. ¿Qué efecto tiene la temperatura sobre el metabolismo? ¿Qué efecto tiene la temperatura sobre las necesidades de oxígeno en organismos aeróbicos?
6. ¿Es esperable encontrar diferencias significativas según el tamaño corporal? ¿Cómo serían esas diferencias teóricas? ¿Se observó en la experiencia práctica? ¿Qué otros factores influyen en el índice metabólico? Ordene a esos factores según su importancia cuantitativa de influencia en el IM.

## 7 CAMBIOS ANATÓMICOS EN RESPUESTA A DESAFÍOS FISIOLÓGICOS



## Marco teórico

La fisiología y la anatomía son disciplinas íntimamente relacionadas. Muchos cambios fisiológicos se traducen en cambios morfológicos si el estímulo ambiental ocurre durante un tiempo prolongado o crónico. Los mediadores entre el estímulo ambiental y la respuesta morfológica final son típicamente respuestas nerviosas, inmunológicas, y especialmente hormonales. Si bien los desafíos ambientales pueden ser muy diversos, uno de los más importantes que enfrentan los animales acuáticos es la regulación de las sales y los iones presentes en los líquidos del plasma. Los iones juegan un rol clave en el mantenimiento de los potenciales de membrana, en la regulación osmótica, y en el contenido de agua del organismo. En el líquido extracelular, ciertos iones tienden a ser abundantes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) mientras que otros son escasos ( $\text{K}^+$  por ejemplo). Otros iones tienen una norma fisiológica plasmática con un rango sumamente estrecho (por ejemplo,  $\text{Ca}^{+2}$ ) ya que participan en procesos fisiológicos vitales como señalización intracelular, la regulación de los potenciales de membrana, la contracción muscular, entre otros.

La fisiología clásica, basada fundamentalmente en la regulación hidrosalina de los mamíferos como modelo, describe al riñón como el principal órgano de excreción y balance electrolítico del medio interno. Sin embargo, los Osteichthyes (o 'peces óseos') el grupo que engloba a más de la mitad de las especies de cordados [21], utilizan principalmente las branquias como órgano regulador del balance hidrosalino. Los peces óseos son hipoosmóticos cuando viven en el mar (los fluidos extracelulares del pez están menos concentrados que el agua de mar), pero son hiperosmóticos en agua dulce (es decir, el plasma está más concentrado que el agua). La solución fisiológica que adoptaron estos animales en agua dulce es interesante; produciendo grandes cantidades de orina diluida, de modo de compensar la ganancia natural de agua por osmosis. Al mismo tiempo, poseen una gran capacidad para incorporar sales del medio a través de las branquias, que de otra forma se perderían siguiendo su gradiente de concentración. Por el contrario, en agua salada, los peces óseos tienden a deshidratarse, ya que el agua tiende a seguir el gradiente osmótico (el agua de mar tiene el doble o más osmolaridad que la sangre del pez). El animal compensa esta situación bebiendo grandes cantidades de agua de mar. Sin embargo, esta solución fisiológica acarrea un nuevo problema: la incorporación de enormes cantidades de iones al plasma (el agua marina es una solución compleja de iones con una salinidad promedio de 3,5% p/v, de la cual  $\frac{3}{4}$  partes corresponde a sal de mesa,  $\text{NaCl}$ ).

Los Osteichthyes marinos desarrollaron entonces una gran capacidad de excretar activamente sales hacia el medio externo, función compartida entre las branquias (que excretan la mayoría de los iones monovalentes) y el riñón (que excreta los iones divalentes). Por consecuencia, las branquias no son simples órganos especializados en el intercambio gaseoso, sino que juegan un rol fundamental en el intercambio iónico y en la regulación de la osmolaridad plasmática. Desde un punto de vista histológico, tres tipos celulares pueden reconocerse en el tejido branquial típico: células pavimentosas (especializadas fundamentalmente en el intercambio gaseoso), células accesorias 'mucosas' (produciendo una secreción que actúa como protección mecánica e inmunitaria) y células de cloruro o ionocitos, que son las células especializadas en la regulación iónica branquial [43]. Las células de cloruro son extremadamente versátiles, y responden al estrés ambiental de diferentes formas con las señales neurohormonales adecuadas (glucagón, leucotrienos, cortisona, acetilcolina, adrenalina, etc.) [44, 45]. En agua marina, estas células branquiales son capaces de disminuir activamente la concentración de cloruro de sodio sérico (Figura 34A) mientras que en agua dulce son capaces de transportar activamente cloruro de sodio desde el agua, en un transporte acoplado con la excreción de protones y amoníaco (Figura 34B).

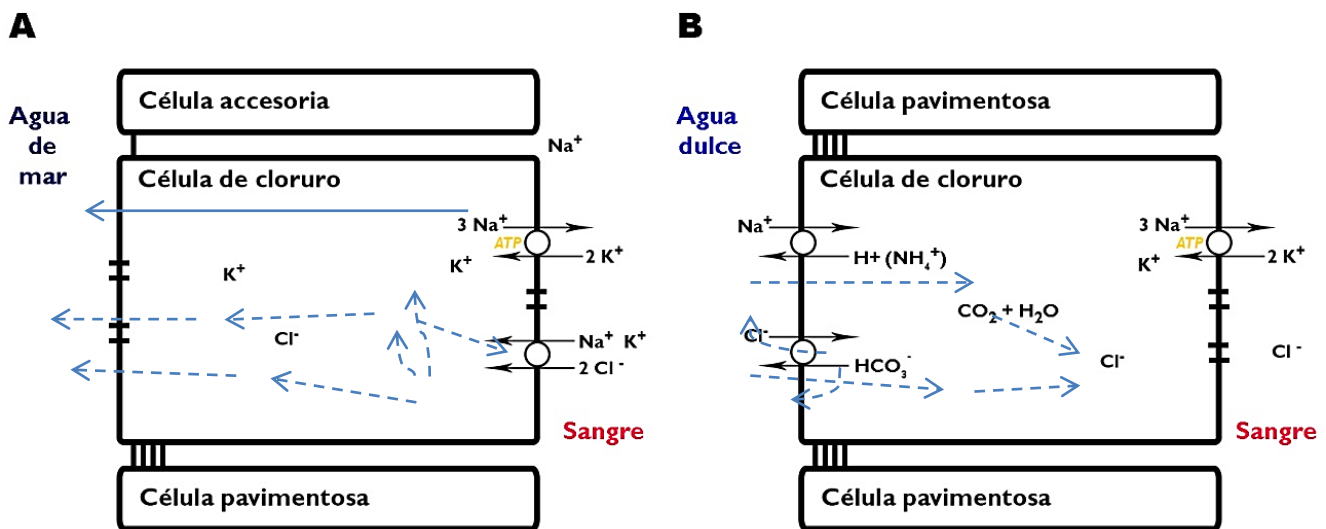


Figura 34. Mecanismos moleculares observados en las células de cloruro de peces teleosteos.

**A.** Situación fisiológica de las células de cloruro en un teleosteo en agua de mar. **B.** Situación fisiológica de las células de cloruro de un teleosteo en agua dulce. El transporte activo y cotransporte está representado por líneas continuas, mientras que la difusión pasiva está representada por líneas azules discontinuas. La línea azul continua, corresponde a la difusión paracelular de sodio. Las uniones intracelulares estrechas están representadas por cuatro líneas negras, mientras que las uniones celulares laxas están representadas por una sola línea negra. Adaptado de *Fish Physiology*, Vol. 14 [45].

Las células de cloruro cumplen en agua dulce otra función extremadamente importante. Son las encargadas de transportar activamente el ion  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el plasma desde el agua. Esto es especialmente importante en los peces que vive en aguas 'blandas', que por definición son aguas pobres en iones divalentes y salinidad general. Es notable la proliferación que puede verse de estas células branquiales, en peces que viven en aguas pobres en  $\text{Ca}^{+2}$ , aún a costa de reducir proporcionalmente el número de células pavimentosas, y por tanto, la membrana respiratoria [1].

En general, los peces óseos viven o en el mar o en agua dulce, pero existe un número relativamente importante de especies que pueden vivir y aclimatarse a aguas de salinidad fluctuante en relativamente cortos períodos de tiempo. Uno de estos animales es *Jenynsia lineata* (Jenyns, 1842), comúnmente conocida como la 'madrecita de agua'. Este es un pequeño pez vivíparo, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza, incluidos cuerpos de agua urbanos; [Figura 35](#)) gracias a su gran capacidad de resistir bajas temperaturas invernales y aguas de concentración salina elevada o mínima. La madrecita de agua es común de encontrar también en cuencas endorreicas hipersalinas como ser la laguna mar Chiquita (Córdoba) o la Laguna de Llanquanelo (Mendoza) (Dellagnola, obs. pers). Incluso puede habitar estuarios y desembocaduras de arroyos a escasa distancia del mar, o, en raras ocasiones, la costa marina [46]. La especie posee entonces una gran capacidad de amortiguar los cambios de salinidad del medio, ajustando su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h [20]. *Jenynsia* está incluida en la familia Anablepidae (Garman, 1895), un pequeño taxón de peces ciprinodontiformes de origen marino, vivíparos y con un notable dimorfismo sexual; que puede encontrarse actualmente en aguas dulces, salobres e incluso marinas [21].





Figura 35. La especie animal elegida para el experimento: la madrecita de agua. *Jenynsia lineata* (Osteichthyes, Anablepidae), ejemplar silvestre proveniente del arroyo Carrizal, cuenca del Río Tunuyán, Mendoza.

### **Objetivos de aprendizaje y expectativas de logro**

Los objetivos de esta experiencia apuntan a que los estudiantes evalúen los cambios histológicos provocados en la branquia de ejemplares de *Jenynsia lineata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae) cuando el pez ha sido aclimatado (21 días) en agua dulce 'dura' (> 300 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ) o en agua blanda ( $\sim 60$  ppm  $\text{CaCO}_3$ ). Esperamos además que puedan elaborar un análisis profundo de qué forma este organismo (y organismos similares) puede censar el medio y procesar una respuesta fisiológica al desafío ambiental planteado; es decir, qué sistemas y mediadores humorales se disparan para la diferenciación, o las trofias/plasias de células y tejidos efectores.

### **Material**

Material de laboratorio

#### **Parte 1. Experimentos en aguas de diferente osmolaridad**

- 6 acuarios acondicionados (ver [Nota 3](#)) divididos en dos grupos experimentales (ver [Nota 25](#)).
- Redes de seda o tejido sintético de diferentes tamaños.

- Pipetas Pasteur.
- Recipiente plástico graduado de 5 L.
- Agua destilada.
- Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , PM 158,11 g/mol); solución stock 100 g/L (ver [Nota 5](#)).

## Parte 2. Eutanasia y obtención de tejido branquial

- 2 vasos de precipitado de 100-500 mL.
- 2 cajas de Petri de vidrio.
- Material de disección (Bisturíes, cuchillas afiladas; pinzas y tijeras metálicas de disección, etc.).
- Pipetas automáticas (100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Puntas descartables (100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- 6 microtubos Eppendorf de 1,5-2 mL.
- Benzocaína (4-Aminobenzoato de etilo) ( $\text{C}_9\text{H}_2\text{NO}_2$ , PM 165,19 g/mol) – alcohol; solución madre 100 g/L (Ver [Nota 26](#)).
- Paraformaldehído ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}_{(n=8-100)}$ ); PM 30,03 (monómero) g/mol; solución madre al 8% (Ver [Nota 27](#)).
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ; PM 46,07 g/mol); 70% v/v.

## Parte 3. Inclusión, corte y tinción de preparados

- 6-12 frascos de vidrio de aprox. 5 mL.
- 2 vaso de precipitado de 50-100 mL.
- 2 Erlenmeyer graduado de 100 mL.
- Pipetas automáticas (100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Puntas descartables (100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- Pinzas metálicas de disección.
- Cuchillas descartables para microtomía.
- 6-12 soportes estándar de tacos de parafina.
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubreobjetos.
- Papel secante.

- Papel de Filtro tipo Whatman (recomendamos de 125 mm de diámetro, 160  $\mu\text{m}$  de grosor, y  $< 2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro).
- Estufa de Laboratorio.
- Dispensador de resina (Ver [Nota 28](#)).
- Agitador magnético con calentador.
- Mechero y tela metálica con centro cerámico con dispersor de calor.
- Conjunto de tinción histológica estándar (Ver [Nota 29](#)).
- Micrótopo rotatorio.
- Baño termostático.
- Microscopio óptico convencional.
- Serie de soluciones de concentración creciente de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ; PM 46,07 g/mol: 70%, 80%, 96%, 100%).
- Xileno puro ( $\text{C}_8\text{H}_{10}$ ) (ver [Nota 30](#)).
- Parafina (ver [Nota 28](#)).
- Alcian Blue 8GX ( $\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{Cl}_4\text{CuN}_{16}\text{S}_4$ ; PM 1298,86 g/mol).
- Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; PM 60,05 g/mol).
- Amoníaco líquido, solución al 25%.
- Rojo Nuclear Rápido ('Nuclear Fast Red':  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NNaO}_7\text{S}$ ; PM 357,27 g/mol).
- Sulfato de Aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ); PM 342,15 g/mol).
- Eosina 0,5%.
- Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ; PM 94,11 g/mol).
- Medio de montaje para microscopía.
- Agua destilada.

#### **Parte 4. Análisis histológico del tejido branquial**

- Microscopio óptico convencional con cámara incorporada.
- Computadora.
- Software de análisis de micrografías (Image ProPlus Versión 6 o similar, ver [Nota 31](#)).
- Software de análisis estadístico GraphPad Prism 6 o similar, ver [Nota 32](#)).

## Material biológico

- Seis ejemplares de *Jenynsia lineata*.
- Cortes histológicos de branquias del teleósteo *Jenynsia lineata*, luego de 21 días bajo diferentes condiciones ambientales (tratamientos de 'agua dura' vs 'agua 'blanda').

## Metodología

Esta experiencia, a diferencia de las anteriores, consta de cuatro extensas partes cuyas metodologías son muy diferentes y transversales a varias subdisciplinas biológicas (técnica de bioterio y cultivo de organismos acuáticos, diseño experimental, anatomía animal, histología, bioestadística, etc.). Por otra parte, es necesaria una planificación concienzuda ya que las etapas (consecutivas) requieren de varios días de duración. Se recomienda comenzar con la primera etapa al inicio del espacio curricular de Fisiología Animal y finalizarla antes de los últimos exámenes, de forma que los alumnos la utilicen como trampolín para integrar los conocimientos adquiridos durante el transcurso de la materia.

### Parte 1. Experimentos en aguas de diferente osmolaridad

1. *Preparación de agua dulce declorada*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 4 L de agua corriente. Con la pipeta Pasteur, agregar 2 gotas de solución stock de tiosulfato de sodio por litro de agua. Repetir hasta completar el volumen de los acuarios experimentales.
2. *Preparación de agua dulce diluida*: En el recipiente plástico graduado de 5L, agregar 800 mL de agua dulce declorada, y completar con 3,2 L de agua destilada (dilución 1/5).
3. *Acondicionamiento de los acuarios experimentales* (ver [Nota 3](#)): Fijar una línea de aire con una piedra difusora, ventosa y regulador de flujo. Fijar el termocalentador sumergible y el termómetro de alcohol en las paredes del acuario. Cargar cuidadosamente con el agua correspondiente a cada tratamiento (tres acuarios con agua dulce declorada, y tres acuarios con agua dulce diluida; ver [Nota 25](#)). Conectar la línea de aire al compresor de aire y regular la salida de forma de establecer un burbujeo homogéneo y suave. Esperar

a que se establezca la temperatura y los parámetros fisicoquímicos homogéneos en todos los acuarios. Con 20 minutos de los acuarios funcionando en una habitación estable es generalmente suficiente.

4. Desde los acuarios de mantenimiento trasladar a los ejemplares en forma individual en vasos de precipitado de tamaño adecuado, en la misma agua del bioterio de mantenimiento.

5. Colocar un animal por acuario. Mantener, bajo las mismas condiciones de alimentación (ver [Nota 33](#)) y mantenimiento del bioterio, por tres semanas (21 días). Recordar que los cambios parciales de agua deben ser realizados con agua reconstituida de idénticos parámetros salinos.

## **Parte 2. Eutanasia y obtención de tejido branquial**

1. *Preparación del baño anestésico:* en vasos de precipitado, agregar benzocaína/alcohol para realizar una anestesia inicial del animal, agregando 50 µL de solución madre por cada 100 mL de agua de baño anestésico a la misma temperatura que el agua del acuario de origen. Sumergir al pez en el baño anestésico, repitiendo la misma dosis cada diez minutos hasta que el animal esté completamente inmóvil y cese el movimiento opercular.

2. Una vez asegurada la eutanasia programada, tomar el material de disección y obtener tejido branquial (ver [Nota 34](#)); agregar a un microtubo Eppendorf cargado con 500 µL de agua del acuario de origen, agregando además 500 µL de solución madre de paraformaldehído, de forma de alcanzar una concentración final de fijador de 4%. Fijar el tejido por no más de 24 h. Rotular el microtubo con lápiz de grafito o marcador indeleble resistente al alcohol, indicando el número de ejemplar y el tratamiento.

3. Con una pipeta automática, retirar el fijador y descartar apropiadamente (siguiendo los protocolos de descarte de solventes y sustancias nocivas del laboratorio). Agregar 1 mL de etanol 70% y tapar bien el tubo. Renovar la solución por nuevo etanol a las 24 h.

El tejido puede preservarse a mediano plazo (revisando que el alcohol no se evapore) hasta la inclusión en parafina.

### **Parte 3. Inclusión, microtomía y tinción**

La inclusión, obtención de cortes histológicos y tinción siguen los lineamientos generales de histología convencional, y pueden ser adaptados según el material disponible.

1. *Deshidratación del tejido branquial*: con la pipeta automática, tomar el líquido fijador de cada microtubo, descartar y reemplazar con idéntico volumen de etanol a concentración creciente (70%, dos veces x 30 min; 80%, dos veces x 20 min; 96%, dos veces x 20 min; 100%, dos veces x 10 min). Descartar la última solución y reemplazar por xileno puro (2 veces x 10 min).
2. Ajustar la temperatura de la estufa a 57-60 °C y ubicar dentro de ella un vaso de precipitado de 50-100 mL y las pinzas metálicas de disección. Encender el dispensador de parafina. Una vez que la parafina alcance el estado líquido, en un vaso de precipitado de vidrio tomado desde el interior de la estufa, tomar 20 mL de parafina, y 20 mL de xileno y mezclar repetidamente hasta la homogeneización de la solución. Ese volumen es suficiente para unas 12 muestras histológicas en microtubos de 1,5-2 mL.
3. En cada microtubo, descartar la solución de xileno puro y reemplazar por idéntico volumen de solución xileno/parafina 1:1 (2 veces x 30 min dentro de la estufa a 57-60 °C).
4. Reemplazar el contenido de cada microtubo por idéntico volumen de nueva parafina (pura). En paralelo, ubicar el soporte del taco histológico en la placa del dispensador de parafina y llenar el molde de inclusión cuidadosamente con parafina nueva tratando de no generar burbujas de aire. Con las pinzas de metal, ubicar y orientar la pieza histológica en el soporte (preferentemente para obtener cortes sagitales de arcos branquiales individuales). Dejar enfriar en la mesada unos minutos a temperatura ambiente. Etiquetar cuidadosamente el taco y almacenar en lugar fresco hasta la microtomía.

5. Tallar el espécimen en forma romboidal, siguiendo las especificaciones estándar de la microtomía de especímenes en parafina (por ejemplo, véase [47]). Ubicar el soporte de la pieza histológica en el portabloques del micrótopo, sujetar firmemente con los tornillos reguladores. Insertar y fijar la cuchilla con los tornillos fijadores. Comenzar con cortes 'gruesos', hasta aproximar a una zona representativa que, en nuestro caso, abarque idealmente al menos un arco branquial completo ([Figura 36A](#)). Una vez elegida la zona microscópica, ajustar el micrótopo con cortes iguales o inferiores a 8  $\mu\text{m}$  de grosor. Trasladar la serie consecutiva de cortes al baño termostático con agua destilada limpia a 55 °C, evitando pliegues de tejido. Tomar de la superficie del baño con un portaobjeto limpio, dejar brevemente en posición vertical para que el tejido se estire completamente. Rotular apropiadamente y enviar a la estufa de laboratorio (37 °C) hasta deshidratación completa (2-48 h). Almacenar a 4-20 °C en una caja para portaobjetos.

6. Repetir la obtención de cortes parafinados a diferentes profundidades del espécimen histológico, de forma de asegurar portaobjetos y estructuras diferentes (por ejemplo, distintos arcos branquiales). Seleccionar unos pocos vidrios (no más de doce por cada animal) con tejidos que a vista macroscópica no presenten pliegues, artefactos, o desgarres por la cuchilla del micrótopo. Aumentar el número de portaobjetos complejiza el manejo en la etapa de tinción, aunque ciertamente puede ser una buena idea en caso de articular contenidos prácticos con espacios curriculares que involucren técnicas histológicas.

7. *Preparación de Solución de Azul de Alcian (1%, pH 2,5)*: pesar 1 g de Alcian Blue 8GX y agregar a un Erlenmeyer de 100 mL. Añadir cuidadosamente 97 mL de agua destilada y 3 mL de ácido acético glacial. Agitar continuamente hasta disolución. Antes de transvasar al recipiente definitivo, pasar la solución por un papel de filtro. Recubrir el frasco con papel de aluminio para proteger la solución de la luz y almacenar a temperatura ambiente.

8. *Preparación de Solución de Amoniaco/Alcohol (70%, pH 9,2)*: agregar 200  $\mu\text{L}$  de amoniaco (solución 25%) en 100 mL de Etanol 70%. Almacenar a temperatura ambiente.

9. *Preparación de Solución de Rojo Nuclear Rápido (0,1%)*: pesar 0,1 g de Nuclear Fast Red, 5 g de Sulfato de aluminio, y añadir a 100 mL de agua destilada. Bajo fuego de

mechero, calentar lentamente hasta hervir, agitando continuamente el vaso de precipitado o Erlenmeyer sobre la malla metálica. para disolver el sólido precipitado. Enfriar lentamente con agitación intermitente. Antes de transvasar al recipiente definitivo, pasar la solución por un papel de filtro. Recubrir el frasco con papel de aluminio para proteger la solución de la luz y almacenar a temperatura ambiente.

10. *Preparación de Solución de Ácido Acético (pH 4,5):* Agregar 30  $\mu\text{L}$  (2 gotas con propipeta) de ácido acético glacial en 100 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

11. *Preparación de Solución de Carbol Xileno:* En un recipiente de vidrio con agitador magnético, disolver suficientes cristales de fenol para producir 25 mL de líquido en agitación constante a 60 °C; añadir a 75 mL de xileno puro. Almacenar a temperatura ambiente.

12. Finalizado el proceso de preparación de soluciones, armar el set de tinción histológica siguiendo el esquema conceptual de la figura presentada en la [Nota 29](#) y desarrollado al detalle en los puntos 13-23 de esta sección.

13. Tomar los portaobjetos con las secciones obtenidas en el punto 5 y llevar al set de tinción convenientemente preparado de antemano. Desparafinar los cortes sumergiendo los portaobjetos en xileno puro (10 min).

14. Retirar de la jarra de Coplin y limpiar el exceso de xileno con papel secante; sumergir brevemente en etanol 96° (1-3 min) hasta la remoción completa del xileno residual.

15. Retirar de la jarra de Coplin y remover el exceso de etanol con papel secante. Rehidratar las secciones histológicas, sumergiéndolas en agua destilada por 3 minutos.

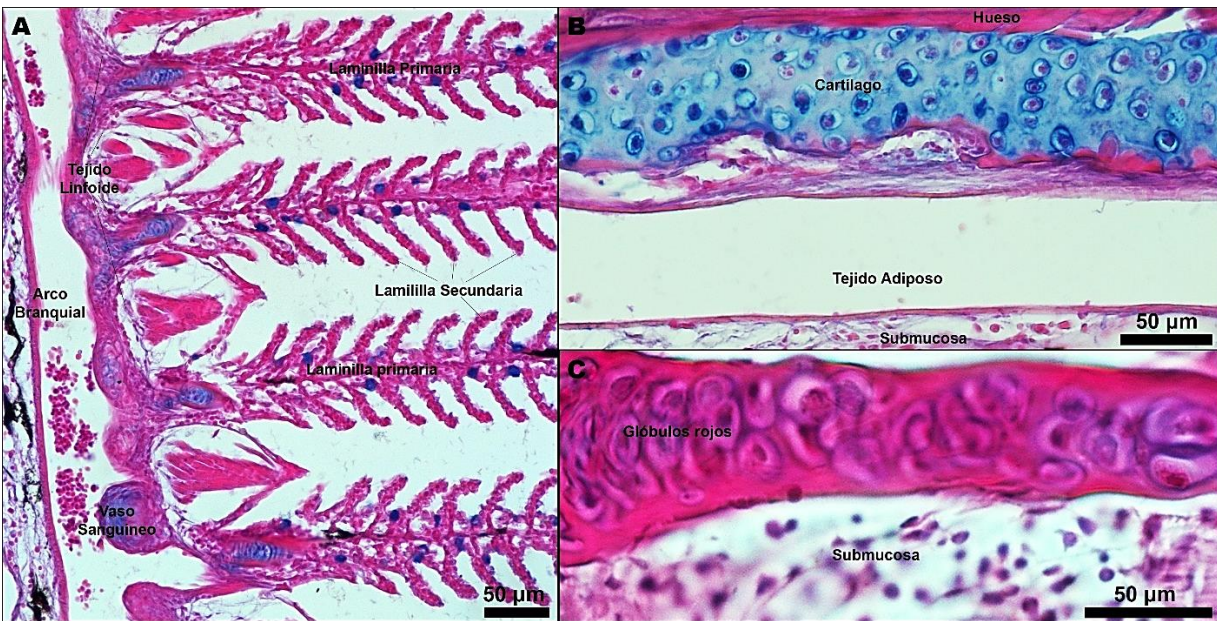
16. Sumergir el portaobjeto en la solución de Azul de Alcían (1 min), de forma de teñir de color azul los glicosaminoglicanos ácidos del tejido [[48-51](#)]. Remover el exceso de colorante con papel secante. Enjuagar con agua destilada.



17. Sumergir el portaobjeto en solución de amoníaco/alcohol (10 min). Enjuagar con agua destilada.
18. Sumergir el portaobjeto en la solución de Rojo Nuclear Rápido (15 min), de forma de teñir los núcleos celulares de rojo brillante [48-51]. Agitar la solución antes de usar de forma de resuspender el posible aluminio precipitado. Remover el exceso de colorante con papel secante. Enjuagar con agua destilada.
19. Sumergir el portaobjeto en la solución de ácido acético (1 min). Limpiar el exceso de solución con papel secante.
20. Sumergir el portaobjeto en solución de Eosina (30 s). Enjuagar con agua destilada.
21. Sumergir el portaobjeto en solución en Etanol 96% (30-60 s) para remover del corte histológico el exceso de eosina.
22. Limpiar el exceso de solución con papel secante y rápidamente trasladar el portaobjeto a una jarra de Coplin con Carbol Xileno. Mantener por 5 minutos. Extraer el portaobjeto y secar los bordes con papel secante. Es importante que el Carbol Xileno de tejido no se evapore.
23. Con una varilla de vidrio, agregar sobre el corte histológico una gota de medio de montaje comercial y cuidando de remover las burbujas de aire, poner encima un cubreobjeto de tamaño apropiado al corte (18x18-22x22 mm<sup>2</sup>). La cantidad debe ser suficiente para abarcar todo el cubreobjeto, pero sin que desborde demasiado. Dejar secar en estufa a 37 °C por al menos 24 h (el tiempo puede ser variable según la naturaleza del medio de montaje).
24. Luego que el medio de montaje solidifique, remover con una cuchilla afilada el exceso de material de montaje de los bordes del cubreobjeto y guardar el portaobjeto, debidamente etiquetado, al abrigo de la luz.

#### **Parte 4. Identificación y cuantificación de los linajes celulares**

1. Antes de obtener las micrografías, recomendamos repasar la anatomía branquial general y la microanatomía de un arco branquial individual y correlacionar con lo observado en el microscopio. Recorrer a diferentes aumentos (10X, 40X, 60X) cada sección (en múltiples vidrios) y elegir los cortes que ostenten una orientación sagital, lo que permite reconocer estructuras histológicas en base a su forma y características tintoriales ([Figura 36](#)).



*Figura 36. Histología normal de los arcos branquiales de la madrecita de agua.*

**A.** Corte sagital de un arco branquial de un ejemplar de *Jenynsia lineata* aclimatado a agua dulce dura (> 300 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ). **B.** Tejido duro (cartilago, hueso, y tejido de soporte) del arco branquial. **C.** Vaso sanguíneo (posiblemente arteria aferente) de la base de la laminilla primaria. El tejido branquial está teñido con tinción tricrómica (Alcian blue 8G-Nuclear Fast Red-eosina; A-B) y el estándar de Hematoxilina-Eosina (C).

2. Luego de identificar los distintos tejidos y unidades funcionales, identificar histológicamente los tipos celulares de las branquias (60X-100X de aumento) con ayuda de atlas histológicos [[43](#), [52](#)]. La [Figura 37](#) puede tomarse como guía histológica para la identificación de los tipos celulares de *J. lineata*:

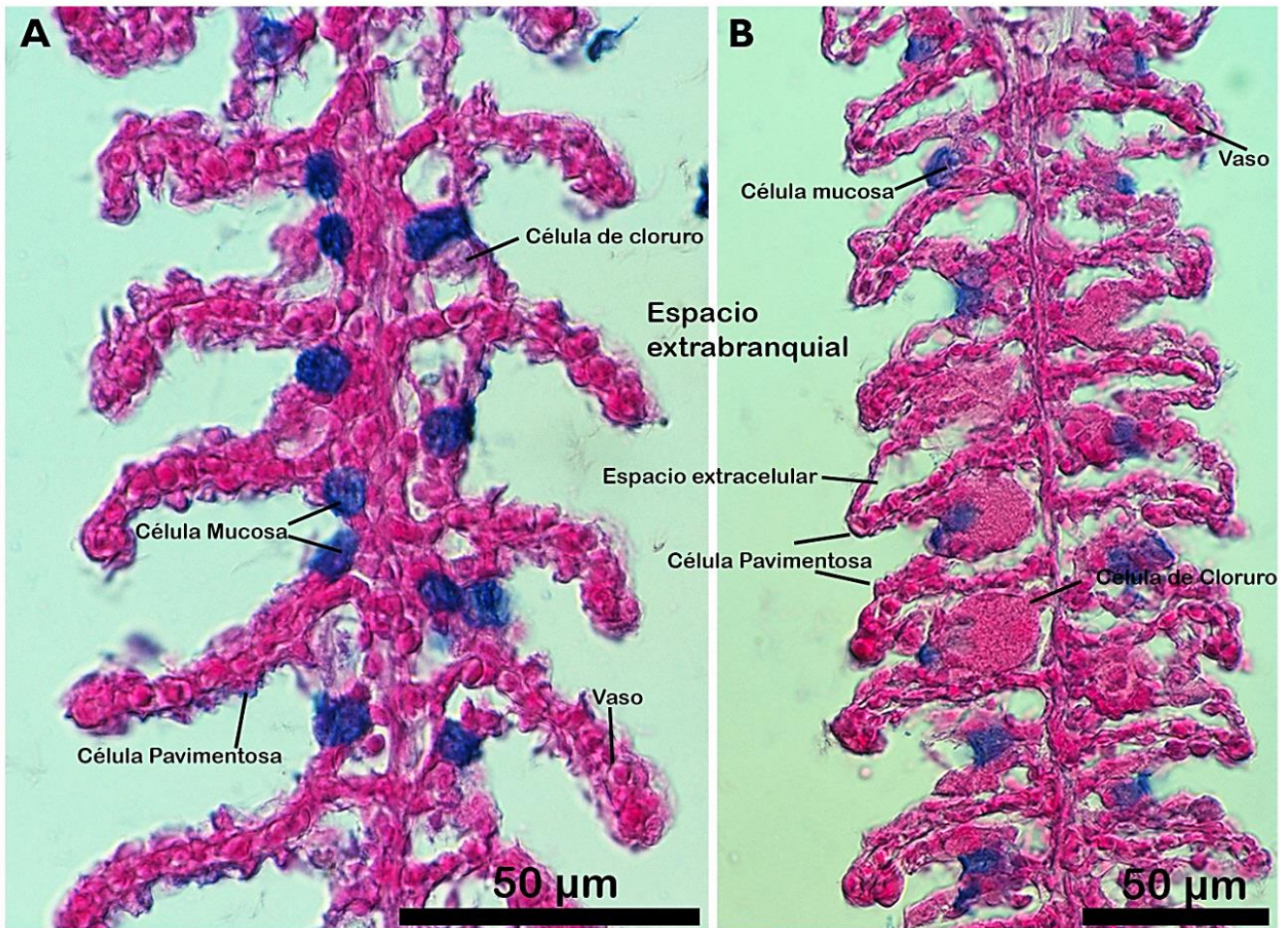


Figura 37. Histología de las laminillas primarias de la madrequita de agua luego de dos tratamientos crónicos a diferente salinidad.

**A.** Laminillas primaria y secundarias de un ejemplar de *Jenynsia lineata* aclimatado a agua dulce dura (> 300 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ). **B.** Laminillas primaria y secundarias de un ejemplar de *J. lineata* aclimatado a agua dulce blanda (~ 60 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ). El tejido branquial está teñido con tinción tricrómica (Alcian blue 8G-Nuclear Fast Red-eosina).

3. Tomar al menos 10 micrografías (60X-100X) de laminillas branquiales de *J. lineata* por cada ejemplar (n=3), desde cortes histológicos de animales sometidos a ambas condiciones experimentales. De esta forma, se trabajará con al menos 30 micrografías por tratamiento. Las micrografías tienen que provenir de láminas branquiales tomados al azar (recordar que la aleatorización de los datos es importante para reducir la variabilidad en el diseño experimental, como se explicó en la [sección introductoria correspondiente](#)) pero que se encuentren en buenas condiciones de conservación (libre de artefactos histológicos). Recordar tomar las micrografías a la misma resolución y con un adecuado ajuste de la barra de escala de referencia en las fotos.

4. Iniciar el programa Image-Pro Plus Versión 6 (Media Cybernetic, 2012; ver [Figura 38](#)) para estimar el área y número ocupado por líquido y estructuras histológicas.
  
5. Una vez abierto el programa, seleccionar la foto a trabajar desde el archivo de fotos ('File' > 'Open' < '(ruta de directorio donde están almacenadas las micrografías)'). Abrir el menú 'Manual Measurements' (el ícono es un compás con una regla amarilla); en 'Features' seleccionar la herramienta 'Drag Line' (el ícono es una línea recta en diagonal). Sobre la barra de escala estampada sobre la micrografía por el software de la cámara del microscopio, trace una línea recta que coincida exactamente con la longitud de la barra de escala. Puede ayudarse haciendo clic con el botón derecho del ratón o touchpad y seleccionando 'Zoom In' de forma de agrandar la micrografía. Seleccionar luego la pestaña Input/Output, seleccionar 'Clipboard' y clicar sobre 'Export Now'. La medición puede entonces exportarse a una hoja de cálculo donde obtendremos, entre otros datos, una medida de longitud ('Length') que corresponde a la longitud estimada, en píxeles, de la barra de escala del microscopio. Repetir la medición en otras micrografías y promediar el valor obtenido. Ya que conocemos el valor de longitud (generalmente expresado en micrómetros por el software de la cámara del microscopio) haciendo una sencilla regla de tres podemos extrapolar el número de píxeles a micrómetros. Ese valor es muy importante hacia adelante ya que nos permitirá estimar medidas de ocupación de área de las estructuras biológicas.
  
6. Abrir el menú 'Measure', luego 'Count/Size' y 'Options'. Asegurarse el siguiente ajuste:
  - a. 'Outline style': Fillet
  - b. 'Label Style': None
  - c. 'Dark Background on Sample': destildada.
  - d. 'Objet options': 4-connect
  - e. 'Smoothing': 0
  - f. Resto de opciones destildadas.
  - g. 'Clean Borders': None
  - h. Clicar 'ok' al final. Cerrar la ventana.

7. Ingresar a 'Manual Measurements'. El ícono es el compás con una regla amarilla. Dentro de la misma ventana, seleccionar entre las figuras geométricas el polígono central. Si se abre la pestaña 'Magic Wand' cambiar la opción a 'Trace'.

8. Apretar y mantener el botón izquierdo del mouse y dibujar manualmente el borde de las áreas de la lámina branquial, de modo de obtener una estimación (en píxeles) del espacio ocupado por la laminilla branquial primaria completa en la micrografía. Completar cuidadosamente hasta casi cerrar el trazo, pero sin llegar al punto de partida. Soltar botón izquierdo y apretar el botón derecho del mouse. Automáticamente se cierra el trazo. Completar todos los tejidos presentes en la micrografía. Una vez terminado, seleccionar 'Measurements' y asegurarse que exista una medición 'PG<sub>x<sub>i</sub></sub> hasta PG<sub>x<sub>n</sub></sub>' con su correspondiente valor de área en píxeles. Seleccionar posteriormente 'Input/Output', tildar 'Features' y 'Clipboard'. Finalmente, seleccionar 'Export Now' y exportar a la hoja de cálculo. El programa devuelve un número que corresponde a la superficie de la estructura, encerrada en el polígono, en número de píxeles.

9. Apretando y manteniendo el botón izquierdo del mouse, dibujar manualmente el borde de las áreas ocupadas por las Células de Cloruro. Repetir hasta dibujar cada una de las células de cloruro de la micrografía. Una vez completado, seleccionar 'Measurements' y asegurarse que exista una medición 'Cx<sub>i</sub> hasta Cx<sub>n</sub>' con su correspondiente valor de área en píxeles. Seleccionar posteriormente 'Input/Output', tildar 'Features' y 'Clipboard'. Al final tildar 'Export Now' y exportar a la hoja de cálculo. De la misma forma, y como mediciones independientes, medir los espacios linfáticos entre las células pavimentosas y capilares branquiales, y la superficie de las células accesorias mucosas.

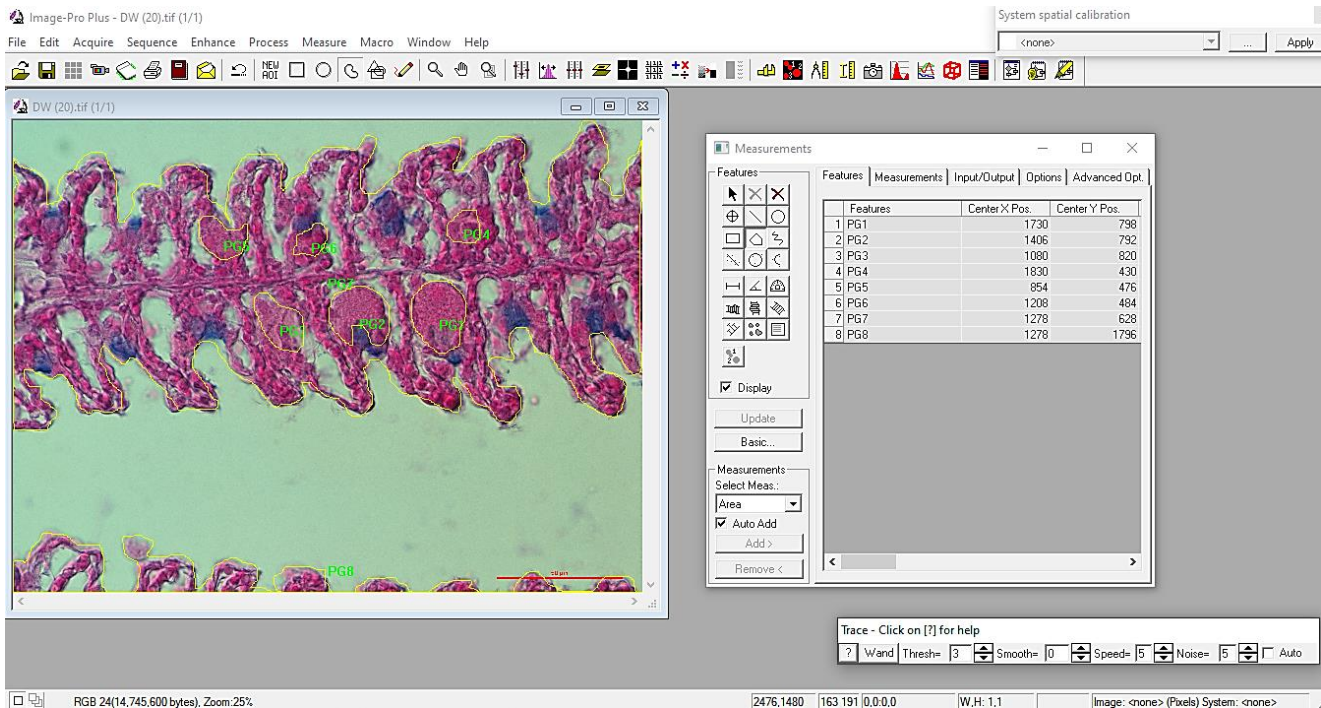


Figura 38. Estimación de la superficie de estructuras histológicas con el programa Image-Pro plus. Laminillas primarias y secundarias de un ejemplar de *J. lineata* aclimatado a agua dulce blanda (~60 ppm de  $\text{CaCO}_3$ ). El tejido branquial está teñido con tinción tricrómica (Alcian blue 8G-Nuclear Fast Red-eosina).

10. Organizar hojas de cálculo con fórmulas apropiadas para el cálculo del área ocupada por las estructuras medidas respecto a la laminilla branquial (por unidad de área y como porcentaje relativo); es imprescindible hacerlo con las células de cloruro y los espacios extracelulares, aunque se puede hacerlo también en el área comprendida por las células accesorias mucosas en ambos tratamientos.

11. Puede estimarse también el número de células de cloruro y mucosas por micrografía en ambos tratamientos, aunque esto puede ser difícil en el caso de las Células de Cloruro poco desarrolladas ya que la Eosina se confunde en el fondo teñido con Nuclear Fast Red y con los glóbulos rojos. Proceder de la misma forma que el punto 10.

## **Análisis de resultados**

1. Obtener la media muestral y las medidas de dispersión de las variables calculadas con Image-Pro Plus.
2. Analizar gráficamente el porcentaje de ocupación tisular de las células de cloruro, células accesorias (mucosas) y espacios extracelulares (que pueden interpretarse como espacios edemáticos debido al ingreso de líquido por la brecha osmótica aumentada entre el agua y la sangre de *Jenynsia*) por micrografía para cada tratamiento, en relación al porcentaje tisular de la laminilla branquial primaria ([Figura 39](#)).
3. Analizar gráfica y/o estadísticamente la media del área ocupada por las células de cloruro, accesorias, y espacios extracelulares entre ambos tipos de aclimataciones fisiológicas ([Figura 40](#)). Indicar, si hay diferencias de la media obtenida, el test estadístico asociado. Expresar los resultados en forma gráfica, identificando claramente las variables. En el mismo gráfico, plotear alguna medida de dispersión de datos (varianza, desvío estándar; ver [Nota 35](#)). Indicar gráficamente si hay diferencias significativas.
4. Analizar gráfica y/o estadísticamente la media del número de las células de cloruro y células accesorias entre ambos tipos de aclimataciones fisiológicas ([Figura 41](#)). Indicar, si hay diferencias de la media obtenida, el test estadístico asociado. Expresar los resultados en forma gráfica, identificando claramente las variables. En el mismo gráfico, plotear alguna medida de dispersión de datos (varianza, desvío estándar; ver [Nota 35](#)). Indicar gráficamente si hay diferencias significativas.

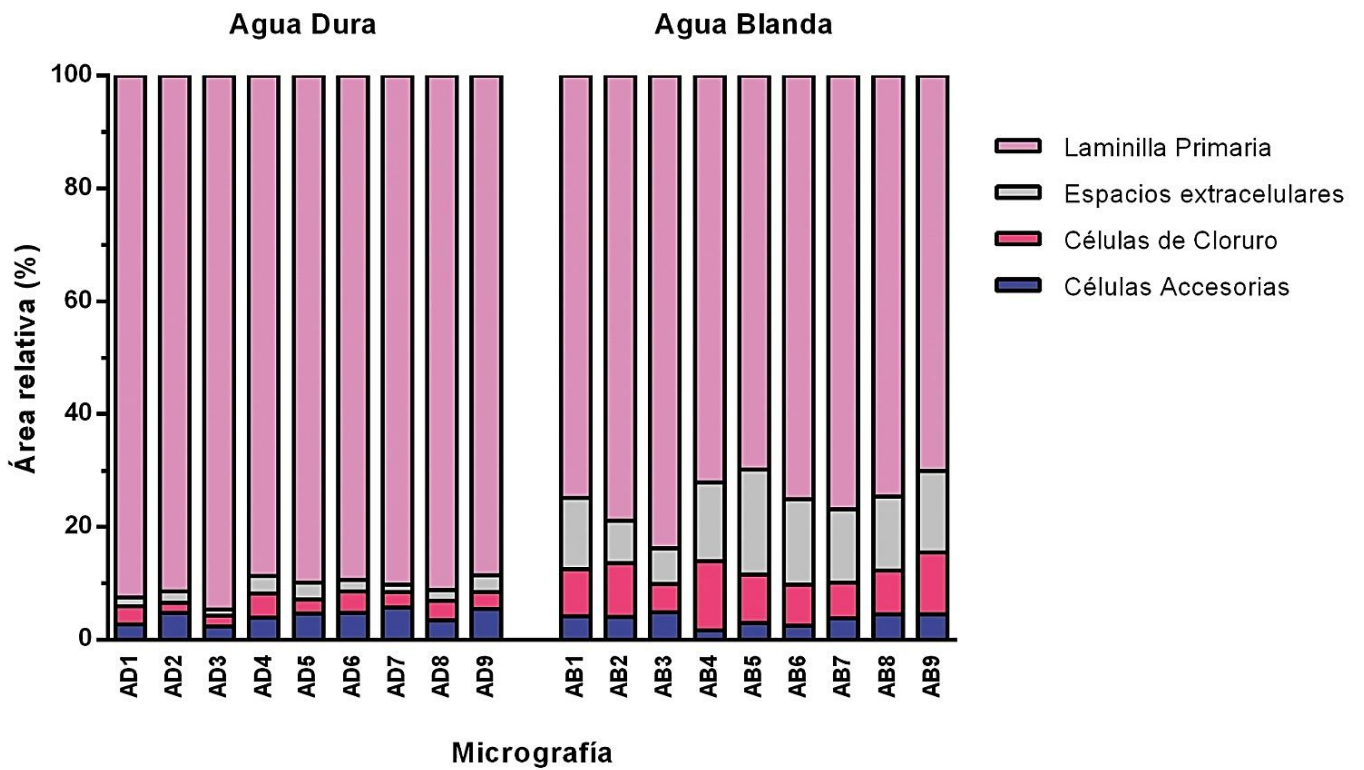


Figura 39. Área relativa porcentual de las células de cloruro, células accesorias, y espacios extracelulares respecto al área total de la laminilla primaria de *J. lineata* en agua dura y agua blanda.

AD1-9: micrografías tomadas al azar de laminillas primarias de tres ejemplares de *J. lineata* aclimatadas a agua dura. AB1-9: micrografías tomadas al azar de laminillas primarias de tres ejemplares de *J. lineata* aclimatadas a agua blanda



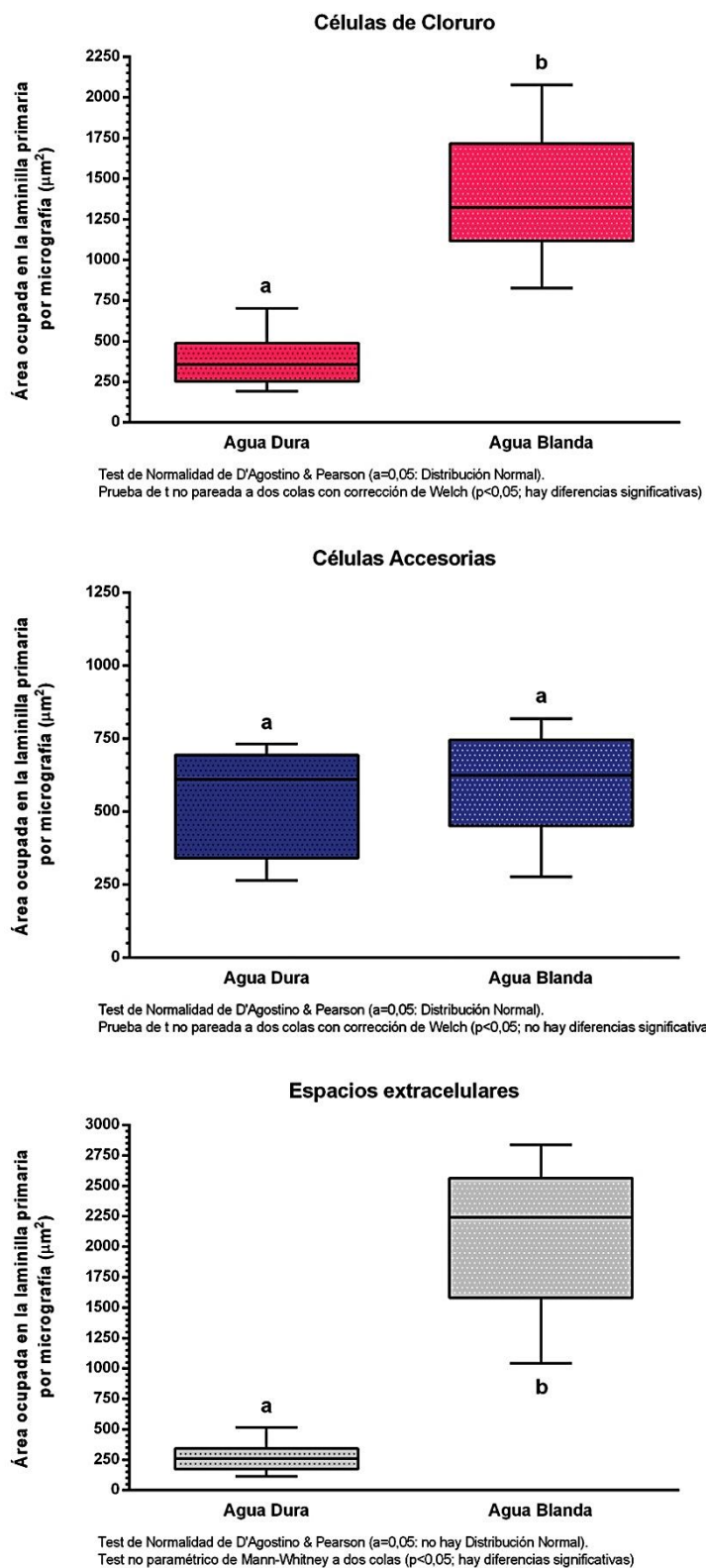


Figura 40. Comparación estadística del área ocupada por las células de cloruro, células accesorias, y espacios extracelulares en la laminilla primaria de *J. lineata* aclimatados a agua dura y blanda. Datos y gráficos generados por el software GraphPad Prism 6 a partir de 9 micrografías tomadas al azar de laminillas primarias de tres ejemplares de *J. lineata*. Letras diferentes entre ambos tratamientos indican diferencias estadísticas significativas.

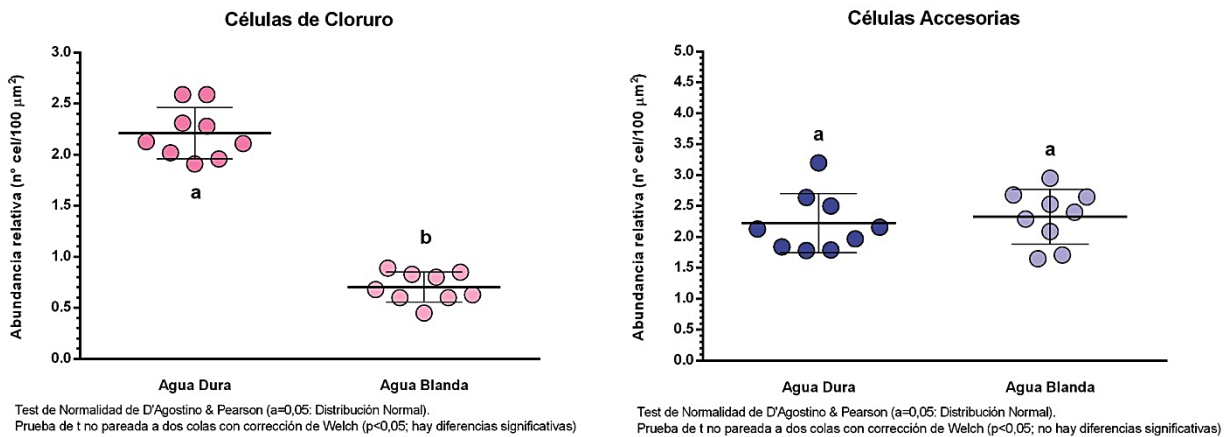


Figura 41. Comparación estadística del número de células de cloruro y células accesorias en la laminilla primaria de *J. lineata* aclimatados a agua dura y blanda.

Datos y gráficos generados por el software GraphPad Prism 6 a partir de 9 micrografías tomadas al azar de laminillas primarias de tres ejemplares de *J. lineata*. Letras diferentes entre ambos tratamientos indican diferencias estadísticas significativas.

5. Elaborar un informe que resuma breve y concisamente los resultados obtenidos. Discuta y concluya sobre los mismos, tomando en cuenta las siguientes preguntas e interrogantes:

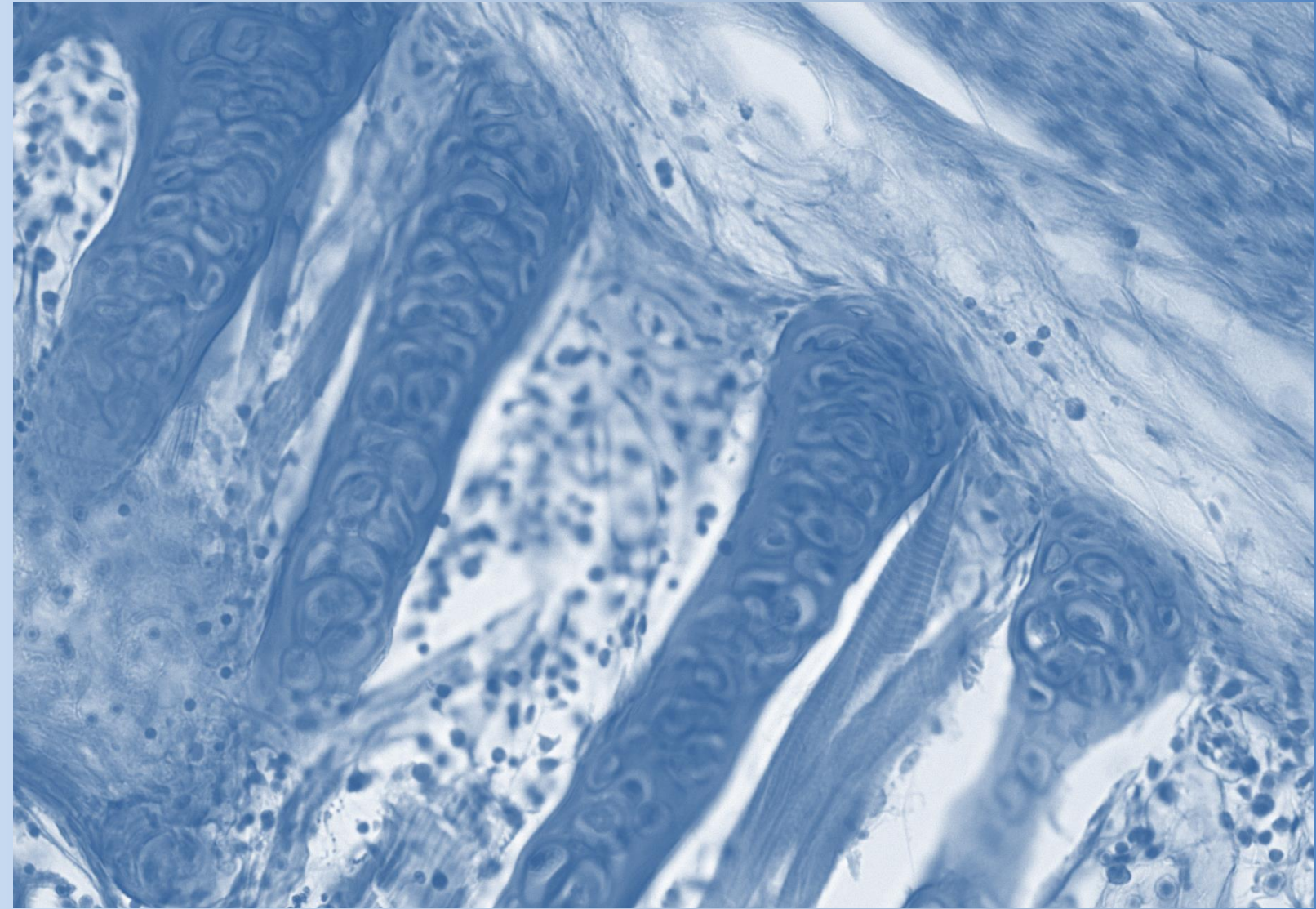
6. ¿Existen diferencias anatómicas en la branquia de *Jenynsia* cuando el animal es sometido experimentalmente a aguas de menor salinidad y osmolaridad? ¿Cuáles son las estructuras identificadas? ¿Todas corresponden a cambios en el tejido, o incluye además a espacios llenos de líquidos extracelulares?

7. En caso de detectar diferencias estadísticas, ¿qué es lo que causa y provoca el cambio en el número y masa de las células de cloruro branquiales? Considere la mayoría de factores hormonales y nerviosos que podrían estar involucrados en el cambio morfológico observado.

8. ¿Qué ventajas ecológicas puede tener para un pez este tipo de mecanismos fisiológicos?

9. ¿Cuál es la diferencia entre este tipo de *aclimatación* fisiológica y *adaptación* de la especie al medio? ¿Considera que esta capacidad puede dirigir la evolución de algunas poblaciones de *Jenynsia*? ¿En qué tipo de ambientes naturales las poblaciones que ostentan esta capacidad fisiológica podrían tener una ventaja adaptativa?

## 8 NOTAS



**1.** La tetrodotoxina es una potente neurotoxina presente en algunos tejidos internos de ciertos peces del orden Tetraodontiformes (peces globo, peces cofre, 'puffers' y otras especies afines). La toxina no es exclusiva de los peces globo, hay otras criaturas (moluscos, platelmintos, bacterias, etc.) que la concentran y/o sintetizan. La TTX se une en forma muy específica a los canales de sodio voltaje-dependiente de los grandes axones periféricos y mata, a dosis muy bajas, a la víctima por parálisis respiratoria.

**2.** El tetraetilamonio bloquea los canales de potasio de los axones periféricos y produce síntomas nerviosos similares a la TTX, aunque también afecta a otras estructuras nerviosas ya que su efecto incluye también a canales de potasio calcio-dependientes.

**3.** El acuario experimental ([Figura 42](#)) debe ser rectangular y pequeño (3-15 litros de capacidad máxima); y contener una línea de aire (LA), un termocalentador automático (TC) y un termómetro. La línea de aire debe estar conectada a un compresor eléctrico (una línea de 1000 centímetros cúbicos/min es suficiente) con manguera siliconada fijada con ventosas (V) y conectada a un difusor (D) que proporcione una salida de burbujas pequeñas y uniformes; la línea debe tener además una llave reguladora para ajustar el flujo de aire. El termómetro (Tm) debe ser sumergible y digital o a base de alcohol (no mercurio), y el termocalentador sumergible conectado a una línea eléctrica (LE). Si el ambiente es térmicamente estable, este último insumo no es imprescindible. Recordar que, al aumentar el volumen, aumentan proporcionalmente también la cantidad de sales y soluciones a utilizar.

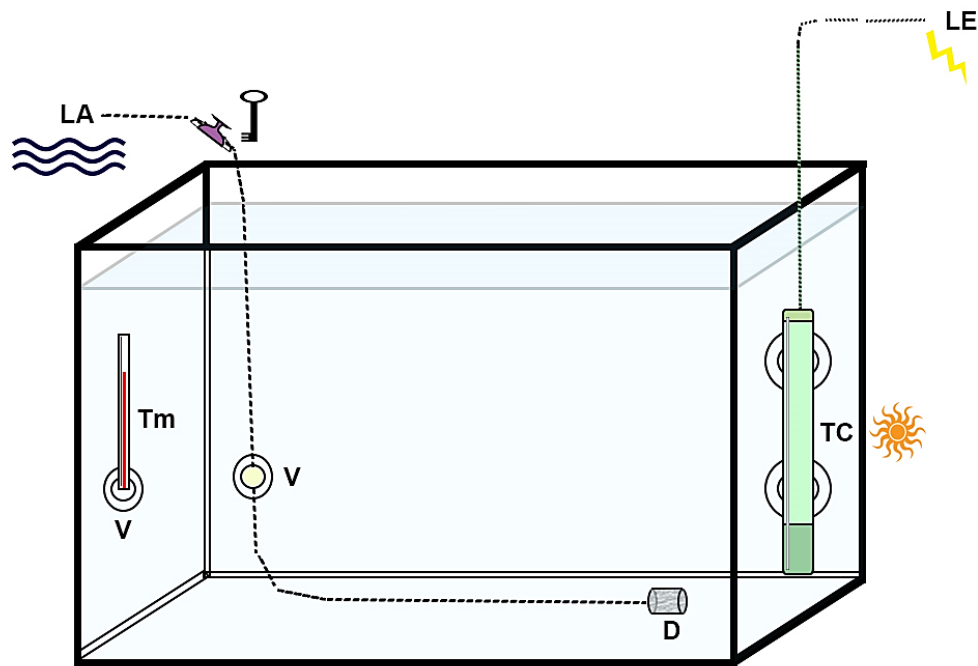


Figura 42. Diagrama del equipamiento y disposición de un acuario experimental genérico.

4. El número de acuarios experimentales dependerá de varios factores; por ejemplo, la cantidad de estudiantes, el número de sujetos animales aprobados por CICUAL, el espacio físico del laboratorio, o el tiempo disponible para llevar adelante la experiencia, entre otros factores. Se recomienda disponer de al menos tres y no más de seis acuarios con agua dulce de clorada y su correspondiente contrapartida para el tratamiento con agua salobre. Aumentar el número de acuarios no necesariamente acorta los tiempos para llevar la experiencia ya que complejiza la logística del armado de termocalentadores, tomas eléctricas, líneas de aire, reguladores, conectores y compresores. Demasiados acuarios y muchos alumnos provocan también un aumento de las redes y tráfico de personas apuradas en pesar el sujeto animal. Una serie de tres acuarios por tratamiento es ideal, ya que pueden compartir un solo compresor de 'doble boca' de al menos 7500 centímetros cúbicos de aire por minuto (Figura 43). Por otra parte, los animales de los taxa elegidos pueden compartir los acuarios experimentales sin problemas de compatibilidad si se respetan los tamaños recomendados. Si es necesario, los alumnos pueden dividirse en comisiones y repetir la experiencia para sumar número muestral.

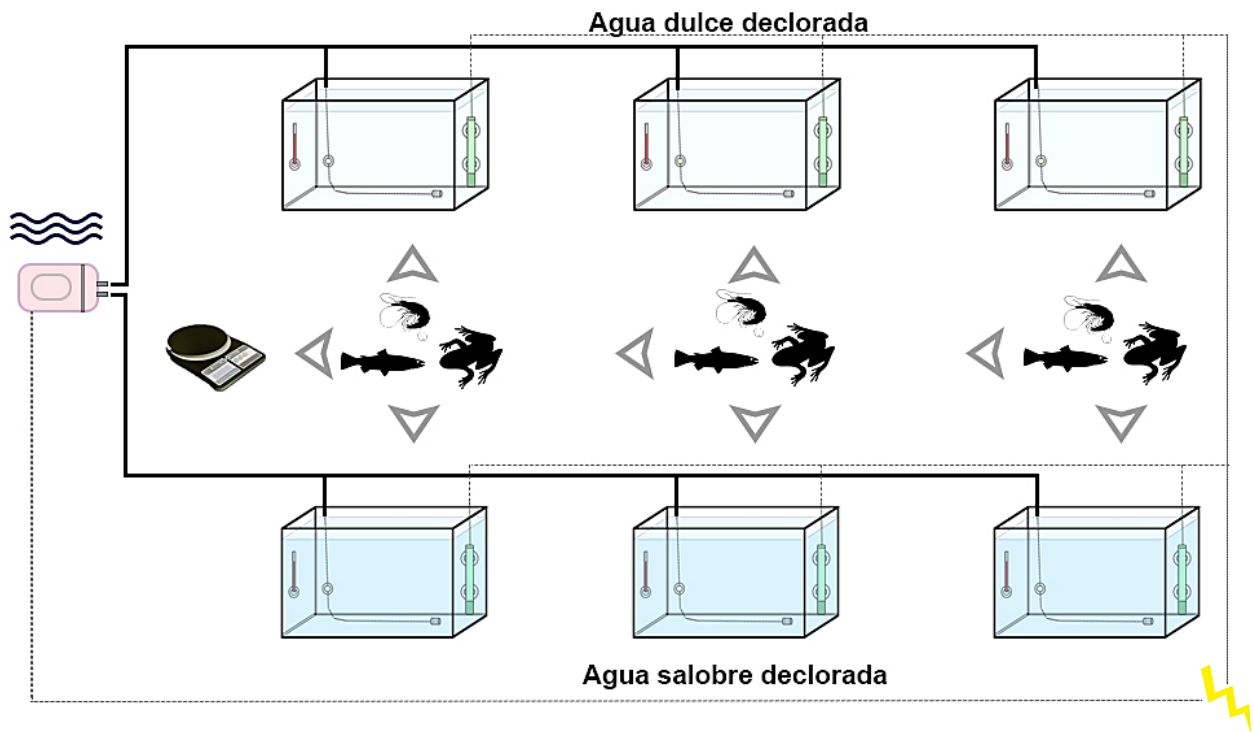


Figura 43. Diseño experimental propuesto para la experiencia 3.

**5.** El tiosulfato de sodio es el principal componente de los productos 'anticloros'; el compuesto reacciona con el cloro activo añadido al agua corriente produciendo una diversidad de sales secundarias. Aunque el producto se descompone en numerosos compuestos de azufre, aproximadamente una gota de solución concentrada (50-100 g/L) por litro de agua (concentración final aproximada de 2-4 mg/L) es suficiente para neutralizar el cloro activo del agua de red.

**6.** La especie ostenta un marcado dimorfismo sexual por tamaño; siendo las hembras mucho más grandes que los machos. Las hembras pueden reconocerse además por una notable 'mancha grávida' de color rojo, y ausencia de gonopodio en los primeros radios de la aleta anal. Los machos, en el acuario, son además más activos que las hembras, por lo que el índice metabólico es posiblemente diferente entre ambos sexos. Siempre que fuese posible, se recomienda trabajar con ejemplares hembra, que son más fáciles de manipular y pesar.

**7.** Los camarones fantasmas tienen un comportamiento natatorio que involucra una vigorosa reacción del telson, impulsando al animal rápidamente hacia atrás en la columna de agua. Esa reacción se desata normalmente cuando el animal es contactado con un

objeto. Si ese comportamiento de huida está notablemente disminuido ante la perturbación del animal con una varilla plástica, adicionalmente a un cambio notable en la transparencia del cuerpo que se vuelve anormalmente 'opaco', se infiere que el animal sufre un estrés o injuria fisiológica importante. Curiosamente, parte de ese reflejo de huida en los camarones palemónidos está conformado por fibras motoras gigantes, similares al reconocido axón gigante de calamar, y con discontinuidades anatómicas nerviosas que presentan continuidad eléctrica [53]; lo que puede ser interesante para que los alumnos integren a la experiencia la fisiología de la transmisión de información nerviosa y la sinapsis celular.

**8.** El número de acuarios experimentales dependerá de varios factores; por ejemplo, la cantidad de estudiantes, el número de sujetos animales aprobados por CICUAL, el espacio físico del laboratorio, o el tiempo disponible para llevar adelante la experiencia, entre otros factores. Se recomienda disponer de al menos tres y no más de seis acuarios con agua dulce de clorada y su correspondiente contrapartida para el tratamiento con tres pH diferentes. Aumentar el número de acuarios no necesariamente acorta los tiempos para llevar la experiencia ya que complejiza la logística del armado de termocalentadores, tomas eléctricas, líneas de aire, reguladores, conectores y compresores. Una serie de tres acuarios por tratamiento es ideal, ya que pueden compartir un solo compresor de 'doble boca' de al menos 7500 centímetros cúbicos de aire por minuto ([Figura 44](#)). Los alumnos deben tomar su tiempo para modificar el pH de los acuarios experimentales y calcular el volumen de NAT a partir de la solución madre de sales de amonio, por lo que es posible que la experiencia no empiece sincronizada en todos los grupos. Los animales de los taxa elegidos pueden compartir los acuarios experimentales sin problemas de compatibilidad si se respetan los tamaños recomendados. En caso que se planifique la experiencia con mayor potencia estadística, los alumnos pueden dividirse en comisiones (no necesariamente con la misma tarea) y repetir luego la experiencia para sumar número muestral. Recordemos que otros factores deberán tenerse en cuenta para afinar el diseño experimental, por ejemplo, no utilizar los mismos animales que en las experiencias previas, unificar los criterios de cada observador, usar las mismas soluciones y cálculos, etc.

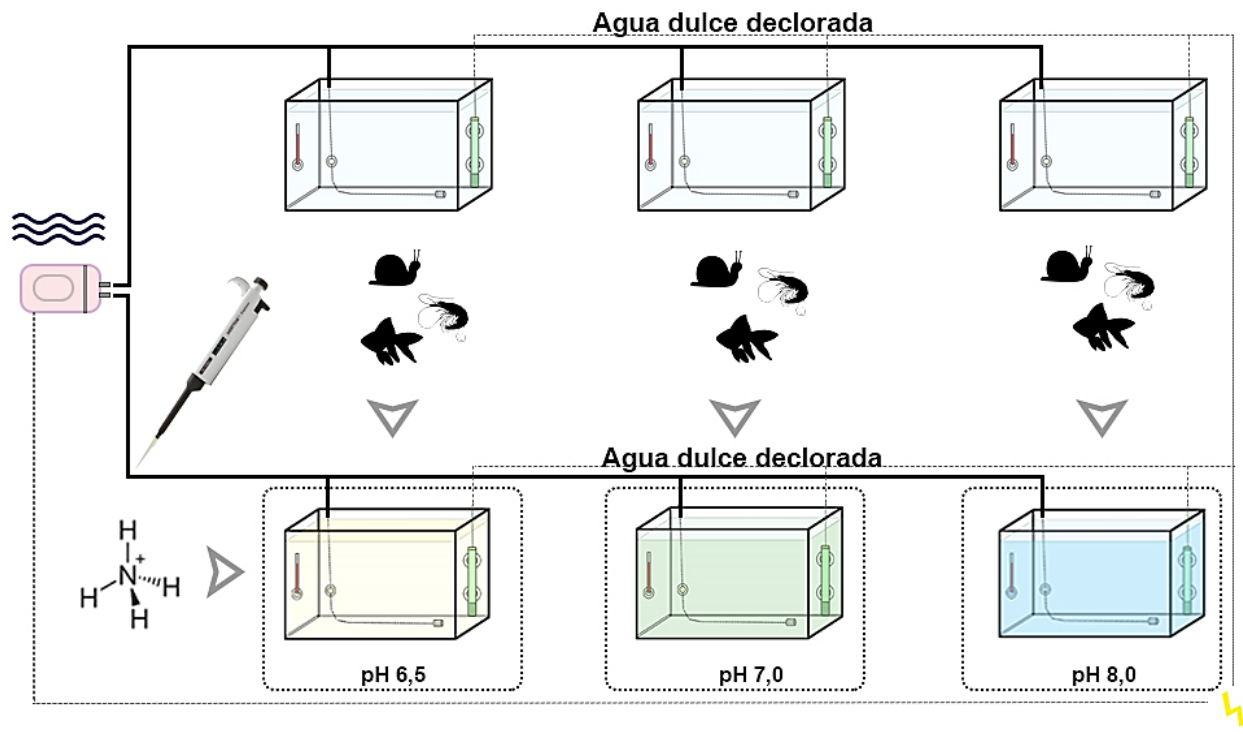


Figura 44. Diseño experimental propuesto para la experiencia 4.

**9.** La longitud estándar de un pez es la distancia lineal comprendida desde el extremo del morro (la boca en el caso de *Carassius*) y el final del pedúnculo caudal, sin incluir en la medición la longitud de la aleta caudal. Esto es especialmente importante en *Carassius* ya que existen numerosas variedades obtenidas por selección artificial con diversidad de formas, colores, y especialmente tamaño y duplicación de las aletas [54]. Además, las formas de cría altamente selectiva, cuyos orígenes pueden remontarse a China hace más de 1000 años, pueden tener diferentes requerimientos de mantenimiento y generalmente no presentan el vigor y la resistencia a condiciones adversas que las formas de cría cercanas al fenotipo salvaje.

**10.** La Longitud (Recta) de la Concha es la distancia lineal que existe entre el ápex y el extremo distal de la abertura en la concha de un gasterópodo [55]. En ejemplares pequeños es necesario utilizar un calibre para mayor precisión de la medición.

**11.** La modificación del pH puede ser más o menos dificultosa según las características químicas del agua corriente disponible. En general, aguas 'duras' (ricas en carbonatos/bicarbonatos de iones divalentes) son alcalinas y presentan además un poder tampón considerable, por lo que la modificación del pH puede llevar cierto tiempo. Por el



contrario, las aguas 'blandas' (pobres en sales) tienen un poder tampón bajo y el pH puede modificarse rápidamente ante la adición de bases o ácidos, por lo que debe procederse con cuidado 'gota a gota'.

**12.** La frecuencia respiratoria en los peces teleósteos puede calcularse contando los movimientos operculares del pez (o alternativamente, los movimientos de la boca) en un periodo de tiempo determinado. Por ejemplo, en *Carassius* pueden contarse los movimientos operculares en 10 s y multiplicarlos por 6 para expresarlos como ciclos respiratorios por minuto. Para una mejor aproximación, pueden hacerse tres series independientes y calcular un simple promedio aritmético. La frecuencia respiratoria aérea en los caracoles ampuláridos es un poco más difícil ya que es un respirador dual que presenta una ventilación aérea intermitente; se recomienda expresarla como número de extensiones del sifón hasta la superficie en un periodo de 10 o 15 minutos. En cuanto a datos cualitativos, los alumnos son capaces (luego de una observación adecuada y guiada y sin un conocimiento exhaustivo de la biología básica de las especies elegidas) de reconocer diferencias en la secreción mucosa de peces y gasterópodos acuáticos y su aumento en relación a una secreción 'basal'. Lo mismo puede decirse para cualificar la reactividad y comportamiento de huida de los camarones al ser perturbados con una varilla plástica; la excitación nerviosa en todos los animales respecto a un estado basal en el acuario de agua dulce de clorada (sin amonio); depresión nerviosa (movimientos natatorios erráticos, pérdida de equilibrio o hiporreactividad en relación a un estado basal en todos los animales, cambios de color y opacidad en los camarones fantasma, muerte. La [Figura 45](#) resume los caracteres cuantitativos y cualitativos a registrarse en la experiencia:

<b>Frecuencia (movimientos operculares/min) <sup>*1</sup></b>	Promedio de tres mediciones independientes, calculada como (número de movimientos operculares*10 s) * 6
<b>Frecuencia (vaciado sifón/ 10 min) <sup>*2</sup></b>	Número de extensiones del sifón en el periodo de 10 minutos del experimento.
<b>Secreción mucosa <sup>*3</sup></b>	Cambios en la secreción epidérmica de moco en peces y gasterópodos.
<b>Reactividad <sup>*4</sup></b>	Reacción relativa del telson de los crustáceos ante la perturbación con una varilla plástica (huida).
<b>Excitación nerviosa <sup>*5</sup></b>	Movimientos natatorios exacerbados en relación a un estado basal (t=0) en todos los animales.
<b>Depresión nerviosa <sup>*6</sup></b>	Movimientos natatorios erráticos y/o hiporreactividad en relación a un estado basal (t=0) en todos los animales, cambios de color (mayor opacidad) en crustáceos.
<b>Muerte <sup>*7</sup></b>	Verificada entre los 30 minutos posteriores al experimento (ausencia de movimiento opercular en peces, inmovilidad y arreactividad en gasterópodos y crustáceos.
<b>N/A</b>	No aplica.
<b>(-)</b>	Negativo.
<b>(+) (++) (+++)</b>	Positivo.

Figura 45. Tabla de ítems a evaluar en la experiencia 4.

**13.** Soluciones de buffer fosfato diseñadas a un pH determinado pueden prepararse a partir de la mezcla proporcional de dos soluciones concentradas de sales de fosfatos. Se recomienda preparar dos soluciones madre de sales de fosfato de potasio, ambas de concentración 1M. La primera, solución, de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , peso molecular 136,086 g/mol), se prepara pesando 6,8 g en 50 mL, esterilizando la solución y guardándola en la heladera. Por otra parte, la segunda solución, de fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , peso molecular 174,2 g/mol), se prepara pesando 8,7 g en 50 mL, esterilizando la solución y guardándola en la heladera. Ambas deben utilizarse en el momento para preparar la solución amortiguadora de fosfato, o en su defecto ser filtradas por ejemplo con un papel de filtro Whatman (160  $\mu\text{m}$  de espesor y  $< 2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro) previo a su uso.

**14.** Si bien el pH estomacal es variable, usualmente puede alcanzar valores de 1-2 unidades de pH. En la experiencia se busca evaluar el comportamiento de la amilasa salival humana, cuya actividad catalítica es máxima a pH neutro. Si no se dispone de un pHmetro digital, puede orientarse utilizando indicadores de papel de pH basados en rojo de metilo o naranja de metilo, que viran a un color rojo o anaranjado fuerte ante valores de pH menores a 4. Sin embargo, las enzimas salivales pueden seguir actuando sobre el almidón y el viraje de color esperado ser menos contundente.

**15.** La solución de Lugol es de un color amarillo-amarronado, coloración proporcionada por fotones emitidos tras los saltos de energía de los electrones de los 'complejos de transferencia de carga' (yodo molecular y los iones negativos de yodo presentes en la mezcla de sales) ante la incidencia de luz. Por otra parte, el almidón es un carbohidrato complejo formado principalmente por dos cadenas de polisacáridos de glucosa unidos de manera diferente, la amilosa (lineal) y la amilopectina (ramificada). Cuando una solución de Lugol se pone en contacto con almidón, los iones ioduros negativamente cargados forman complejos con las cadenas lineales de amilosa, formando nuevos complejos de transferencias de carga que emiten radiación a una longitud de onda diferente; a los ojos del ser humano, la solución resultante se torna azul oscuro. La profundidad y tono de esa coloración depende de la cantidad de amilosa (y, por lo tanto, de almidón) y el pH de la solución que desnaturaliza las cadenas de almidón, oscilando entre un color azul oscuro, púrpura y amarillo-amarronado dependiendo de la concentración y pH. La amilasa salival

tiene un pH óptimo de acción de 6,9 e hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos liberando monómeros de glucosa y disminuyendo por lo tanto la cantidad y tamaño de las hélices de amilosa. Es esperable entonces que el color resultante varíe según el pH de la solución, la cantidad de enzima presente, y la calidad de la fécula utilizada. Por otra parte, la secreción *in vivo* depende de muchos factores, por lo que los volúmenes de solución propuestos para esta experiencia son sólo orientativos y deben ajustarse previamente con el material disponible.

**16.** El espectrofotómetro es básicamente un aparato que, a través de lámparas especiales y filtros monocromadores, emite un haz de luz a una determinada longitud de onda que atraviesa una solución en una cubeta transparente y es analizado por un fotodetector que cuantifica la absorbancia (cantidad de luz absorbida) o la transmitancia (cantidad de luz no absorbida) por la muestra a esa longitud de onda [56]. Para cuantificar proteínas o péptidos en solución se necesita emitir a una longitud de onda de 280 nm (rango ultravioleta) y utilizar cubetas de cuarzo, que aseguran, a diferencia del vidrio, que la luz UV no sea absorbida por las paredes del recipiente. Para fines comparativos, el blanco debe hacerse con el mismo buffer y al mismo tiempo que la solución incógnita; si la absorbancia medida es mayor a 2, debe hacerse una dilución 1/10 para ingresar al rango de linealidad de la curva absorbancia vs concentración [57]. Para cuantificar en forma absoluta, puede hacerse una curva de concentración conocida de albúmina, aunque no consideramos que sea conveniente en esta experiencia ya que distrae y complica la experiencia de fisiología digestiva.

**17.** La gelatina es una mezcla compleja de proteínas animales, principalmente de la matriz celular (colágenos); esto hace que las propiedades de gelificación y disolución sea muy variable según la temperatura, calidad y naturaleza de la proteína purificada. La concentración también es importante, ya que determina el tamaño del poro del gel y la 'accesibilidad' de otras macromoléculas tales como la tripsina. Se han obtenido resultados muy variables según la temperatura, del fabricante, y de la procedencia de la gelatina. Por eso el protocolo de ese libro es orientativo y se recomienda probar diferentes tiempos de incubación, concentraciones y proveedores en condiciones de laboratorio lo más estandarizadas posible para obtener buenos resultados.

**18.** La gelatina, a diferencia de otros gelificantes como el agar, gelifica a temperaturas relativamente bajas (menores a 25 °C). Un buen punto para transvasar la gelatina líquida a los microtubos Eppendorf es cuando al tocar el vaso de vidrio con un guante fino de látex, se experimenta una sensación de calor sin una 'sensación de quemadura' asociada. Esta experiencia sensorial es útil como disparador para el repaso de los receptores sensoriales y en particular para el estudio fisiológico del dolor, ya que el calor 'quemante' es una sensación compleja que involucra la activación de fibras C amielínicas (nociceptores polimodales que, entre otros estímulos, se estimulan por temperaturas superiores a 40 °C).

**19.** El número de acuarios experimentales dependerá de varios factores; por ejemplo, la cantidad de estudiantes, el número de sujetos animales aprobados por CICUAL, el espacio físico del laboratorio, o el tiempo disponible para llevar adelante la experiencia, entre otros factores. Se recomienda disponer de tres acuarios de agua dulce de clorada a temperatura ambiente y no más de seis acuarios para los tres tratamientos térmicos. Si se utilizan separadores, el espacio delimitado entre ellos debe ser suficiente para colocar cómodamente los geles refrigerantes o los termocalefactores para el tratamiento hipotérmico e hipertérmico respectivamente. Los geles refrigerantes deben almacenarse a -20 °C en un compartimento limpio del freezer y ser retirados inmediatamente antes de comenzar la experiencia con los animales dentro del acuario, de forma que la temperatura baje en forma rápida pero uniforme. Asegurar que la bolsa no tenga ningún tipo de rasgadura o pinchadura, y que ningún solvente o producto químico quede adosado en su superficie, limpiando la superficie con alcohol al 70°. Por otra parte, los termocalefactores deben tener suficiente potencia (al menos 10 vatios por litro de agua del acuario), de forma que la temperatura suba en forma rápida pero uniforme. Ya que la potencia del aparato suele ser proporcional a la altura del tubo de vidrio del calefactor, es posible (y conveniente) duplicar la potencia en watts utilizando dos aparatos por acuario experimental, ubicados en ambos extremos, si los acuarios no tienen la altura apropiada para un solo termocalefactor potente. Aumentar el número de acuarios no necesariamente acorta los tiempos para llevar la experiencia ya que complejiza la logística del armado de termocalentadores, tomas eléctricas, bolsas de geles refrigerantes, líneas de aire, reguladores, conectores y compresores. Una serie de tres acuarios pueden compartir un solo compresor de 'doble boca' de al menos 7500 centímetros cúbicos de aire por minuto ([Figura 46](#)). Los animales de diferentes tamaños pueden compartir cada espacio delimitado

por separadores sin problemas de compatibilidad. En caso que se planifique la experiencia para obtener mayor potencia estadística, los alumnos pueden dividirse en comisiones y repetir la experiencia para sumar número muestral. Recordemos que otros factores deberán tenerse en cuenta para afinar ese diseño experimental, por ejemplo, no utilizar los mismos animales que en las experiencias previas, unificar los criterios de cada observador, usar las mismas soluciones y cálculos, etc.

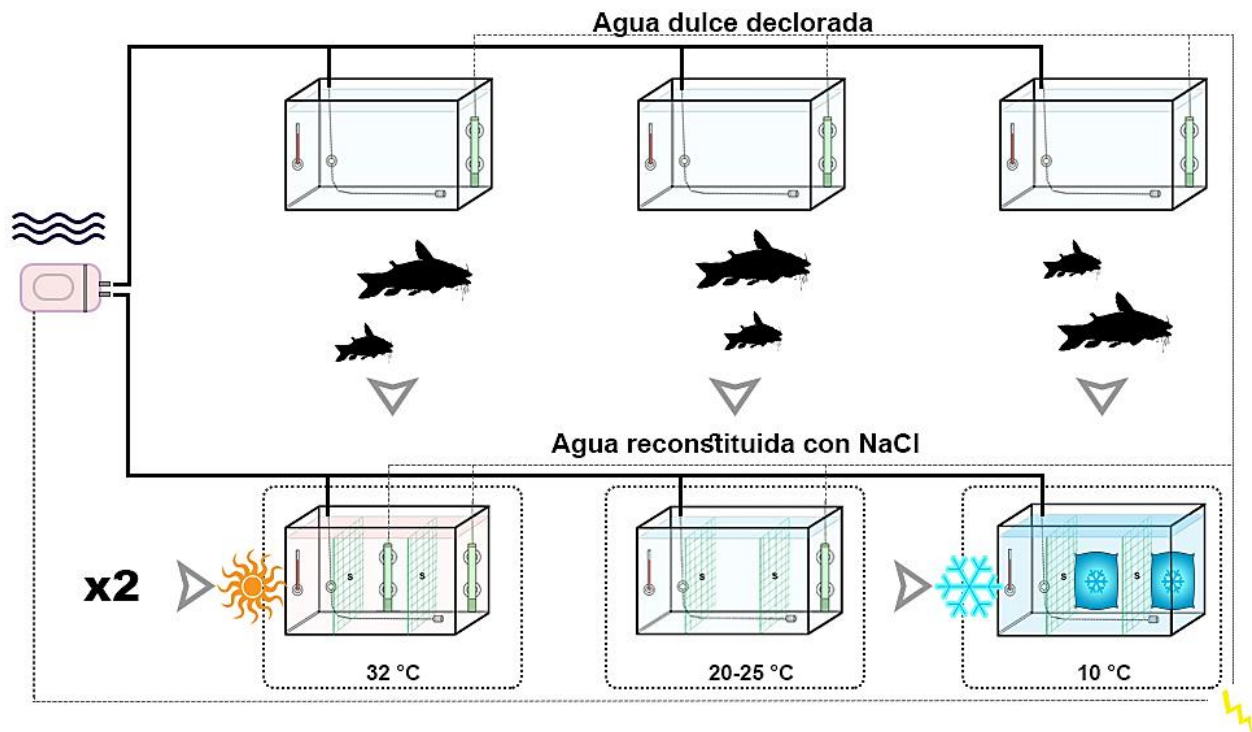


Figura 46. Diseño experimental propuesto de la experiencia 6.

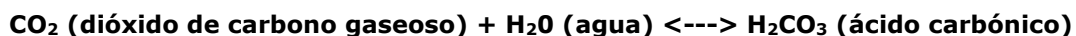
**20.** Cada separador puede construirse con dos varillas idénticas, en entre 1-2 cm de ancho y de un largo igual a la altura del acuario, sosteniendo entre sí una tela rígida de plástico de 1 cm de tamaño de poro entramadas con dos varillas de vidrio transversales (una superior y otra inferior) de idéntico ancho (1-2 cm) pegadas con silicona transparente que no contenga fungicida. El separador puede entonces ubicarse en cualquier posición del acuario, sostenidas con ventosas plásticas. El tamaño de poro permite pasar la línea de aire y además que la temperatura y gases sean homogéneos, sin ningún tipo de estratificación fisicoquímica en los acuarios experimentales.

**21.** Se recomienda invertir en un oxímetro o medidor digital multiparámetro que estime, con un electrodo, el oxígeno disuelto en el agua. Estos aparatos son fáciles de usar,

calibrar, y son razonablemente precisos. Además, poseen generalmente una compensación automática según la salinidad y la temperatura (recordemos que la capacidad de disolución del oxígeno gaseoso en el agua disminuye con el aumento de la salinidad y temperatura, y aumenta con el aumento de la presión atmosférica). Por otra parte, existen además test colorimétricos de oxígeno que dan como resultado, luego de disolver consecutivamente una serie de reactivos, una solución coloreada cuyo color, tono e intensidad debe ser comparada con una escala impresa. En la experiencia personal, los resultados basados en test colorimétricos no son fiables, difícilmente repetibles, y varían mucho en base al observador, el experimentador, la iluminación de la sala, y los reactivos suelen perder sus propiedades rápidamente, incluso dentro de la fecha de vencimiento del producto.

**22.** La proporción 9:1 de agua reconstituida/agua corriente declorada propuesta proporciona una concentración salina cuya conductividad es similar al agua de la cabecera del sistema de distribución de agua del Río Mendoza (900  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) [58]. Esa conductividad garantiza similar osmolaridad, pero una capacidad amortiguadora de pH muy disminuida por la dilución de las sales carbonatadas. De esta forma, es posible estimar el aumento del  $\text{CO}_2$  por actividad respiratoria a través de la disminución del pH del agua ya que el dióxido de carbono tiene reacción ácida en el agua, respondiendo a la ecuación I:

Ecuación (I):



Este ácido carbónico formado pierde rápidamente un hidrógeno formando catión hidrógeno y anión bicarbonato:



Por supuesto, la proporción debe ajustarse según la composición del agua de origen en la que se planifique la experiencia. Otra posibilidad práctica (que no hemos testeado) es hervir el agua corriente. El hervor del agua elimina los gases disueltos (oxígeno molecular y dióxido de carbono) por lo que, según las reglas de equilibrio químico, la ecuación II se desplaza a la derecha. De esta forma el calcio soluble y el anión bicarbonato forman carbonato de calcio insoluble. Este carbonato de calcio precipita formando una 'costra' en el recipiente y deja de formar parte del equilibrio iónico del agua:

Ecuación (II):



El calcio combinado con otros aniones diferentes (por ejemplo, sulfato o cloruro) no participa de ese equilibrio y permanece soluble independientemente de cuánto gas carbónico eliminemos calentando el agua (dureza 'permanente').

**23.** *Hoplisoma paleatum* (ex *Corydoras paleatus*) ostenta una característica relativamente común a otras especies del Orden Siluriformes: presenta un dimorfismo sexual por tamaño, siendo en general las hembras más grandes que los machos [20]. Esto significa que existe un sesgo sexual si se establecen dos categorías arbitrarias de tamaños corporales. Esto debería ser tenido en cuenta en un diseño experimental con potencia estadística elevada, y además debería ser discutido con los alumnos, ya que el índice metabólico puede variar también en función del sexo y la edad reproductiva.

**24.** El género *Hoplisoma* comprende especies tropicales y subtropicales de pequeños peces acorazados que tienen la capacidad de intercambiar gases tanto en el agua como en el aire (respirador dual) [59]. Estas especies intercambian gases respiratorios por las branquias como cualquier otro pez teleosteo, pero poseen además un epitelio intestinal especializado que sirve como órgano respiratorio accesorio de modo de utilizar, bajo ciertas circunstancias, la respiración aérea en forma facultativa [60, 61]. Los opérculos de *Hoplisoma paleatum* son pequeños, relativamente inconspicuos, y la boca es pequeña, por lo que se necesita cierto entrenamiento previo para reconocer cada ciclo respiratorio. Por otra parte, cuando el animal está en reposo y el consumo de oxígeno es bajo, el movimiento opercular es muy pequeño y cuesta mucho cuantificarlo. Una forma relativamente sencilla de proceder es observar de cerca al ejemplar, con el eje de la visión del observador horizontal al acuario de observación, en la zona de los radios branquiostegos, bajo el hueso subopercular (Figura 47). Por otra parte, la toma de aire atmosférico es fácil de reconocer por un observador. El animal, desde una posición generalmente pasiva en el fondo del acuario, nada rápidamente en forma diagonal hacia la superficie del agua, donde toma velozmente una burbuja y la deglute, volviendo

velozmente a la posición original. Aunque la maniobra etológica es fácilmente reconocible, ocurre en pocos segundos y no sigue un patrón temporal regular, por lo que el observador tiene que estar atento en todo momento. Se recomienda que los alumnos tengan un entrenamiento previo al respecto antes de iniciar los experimentos.

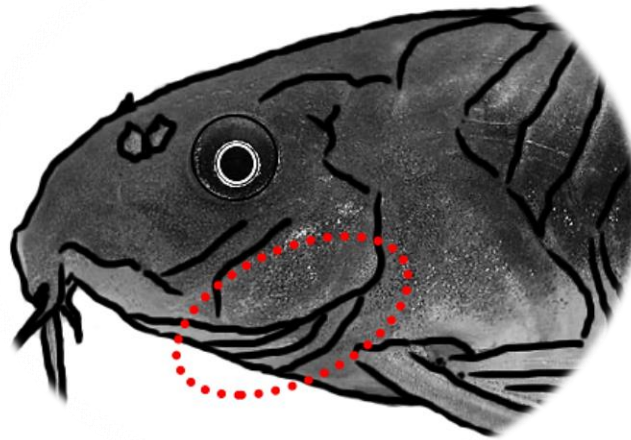


Figura 47. Diagrama de la cabeza de un pez del género Hoplisoma. El círculo rojo muestra la zona opercular discutida en la [Nota 24](#).

**25.** Esta experiencia debe ser planificada, en su etapa con animales vivos, como un experimento extenso en el tiempo (21 días). El número de acuarios experimentales dependerá fundamentalmente del número de sujetos animales aprobados por CICUAL, ya que el punto final del experimento involucra eutanasia programada. En mi opinión, un número de tres ejemplares de *J. lineata* por tratamiento es suficiente para establecer una buena comparación estadística de las variables sugeridas, aún con niveles de significancia y potencia estadística altos, particularmente si se trabaja más adelante con una buena 'selección aleatoria' de micrografías branquiales de forma de disminuir la dispersión de datos. Se recomienda disponer de al menos tres acuarios de agua dulce 'dura' y tres acuarios de agua dulce 'blanda' con un único ejemplar en ellos. Si se trabaja con animales de diferente sexo, es conveniente que los animales no tengan acceso visual al compañero del acuario adyacente, ya que los machos de *Jenynsia* suelen disponer de mucho tiempo y gastar mucha energía en el cortejo de las hembras. La experiencia podría realizarse en dos acuarios (uno por cada tratamiento) y tres ejemplares aislados por separadores similares a los descritos en la [Nota 20](#). Sin embargo, debe decirse que (en este caso particular) la unidad muestral sería el acuario y no el pez individual, ya que es posible que (al menos en parte) los cambios histológicos branquiales puedan ser explicados por la interacción social



o por sustancias moduladoras producidas por los animales y disueltas en el agua. Por otra parte, aumentar el número de acuarios complejiza la logística del armado de termocalentadores, tomas eléctricas, bolsas de geles refrigerantes, líneas de aire, reguladores, conectores y compresores. Una serie de tres acuarios pueden compartir un solo compresor de 'doble boca' de al menos 7500 centímetros cúbicos de aire por minuto (ver [Figura 48](#)).

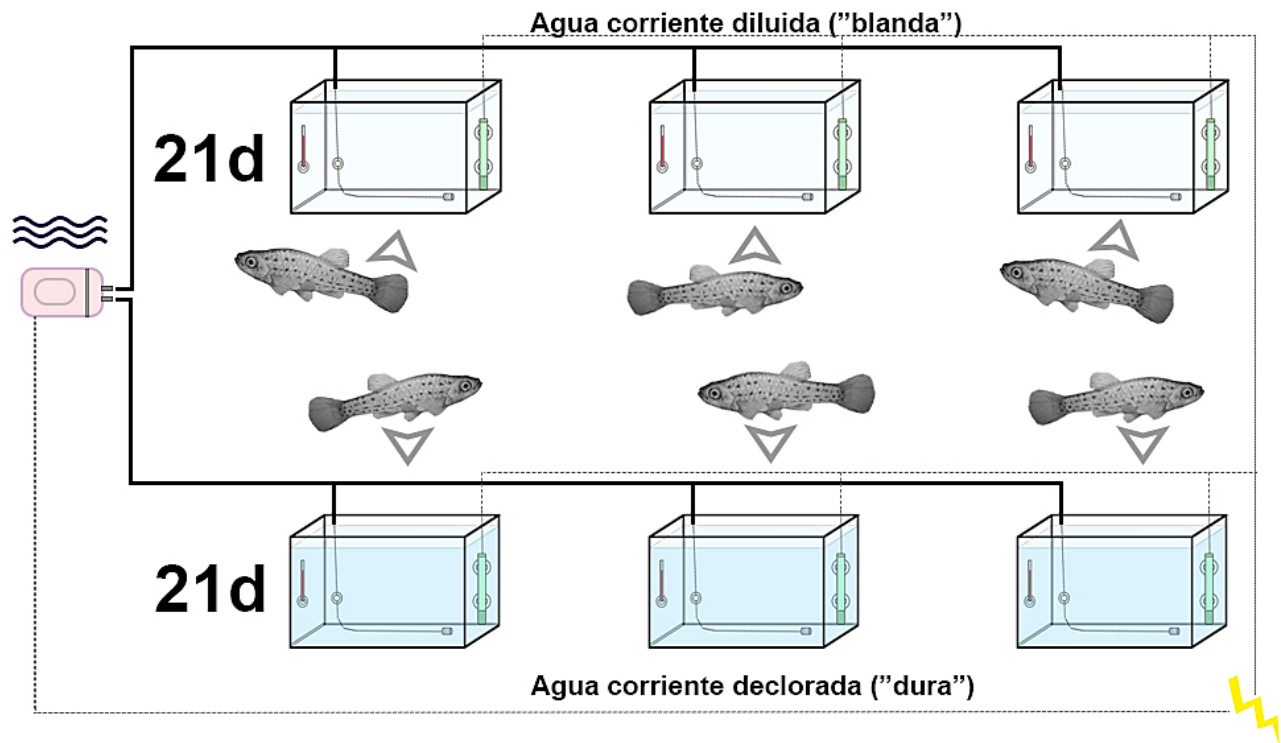


Figura 48. Diseño experimental propuesto para la experiencia 7.

**26.** La benzocaína es un anestésico aprobado para su uso en peces, cuya solución madre puede ser preparada en un tubo plástico tipo Falcon de 50 mL pesando 4,5 g de droga pura, agregando 45 mL de etanol (100%) y almacenado en la heladera al abrigo de la luz [6, 62]. La droga es relativamente barata, no tóxica para el ser humano, pero es relativamente poco soluble en agua; por ello, es que su dosis es difícil de calcular si no es administrada parenteralmente, ya que depende de la solubilidad (contenido mucoso-lipídico) del epitelio branquial, intestinal, y dérmico, y de las condiciones fisicoquímicas del agua del acuario. Existen otras drogas similares derivadas de la benzocaína (por ejemplo, el Mesilato de Tricaína o 'MS 222') que son mucho más solubles en agua, pero comparativamente mucho más caras; todos ellos pueden utilizarse en las dosis recomendadas por la bibliografía. Se recomienda utilizar un recipiente pequeño (baño

anestésico) de tamaño y forma adecuada a la especie, en el que se agregue inicialmente solución madre de benzocaína para llegar a una concentración final de 0,05 g/L bajo agitación constante.

**27.** Las soluciones fijadoras de formaldehído son irritantes por contacto directo, e irritantes del sistema respiratorio, causando en algunas personas cuadros de neumonía y bronquitis luego de su inhalación. El formaldehído es además un xenobiótico con efectos tóxicos para la médula ósea y el cerebro [63, 64]. Si se prepara desde la droga pura, recomendamos hacerlo bajo campana, pesando 4 g en un tubo tipo Falcon de 50 mL y agregando 50 mL de agua destilada o una solución neutra de buffer fosfato, bajo movimiento y calentamiento constante (60 °C) en un agitador magnético hasta la disolución total. La disolución suele acelerarse agregando gotas de NaOH 1N. Es imprescindible el uso de material de protección (barbijo, guantes). Puede usarse como reemplazo soluciones de formalina (formol al 37%) diluidas apropiadamente, pero la fijación de las piezas histológicas suele ser más pobre y los preparados de menor calidad (más artefactos, rotura del tejido, etc.).

**28.** El dispensador de parafina es un insumo común en laboratorios donde se realiza histología de manera rutinaria, pero no es imprescindible en esta experiencia, ya que puede reemplazarse por un espacio cerrado con mechero y estufa de laboratorio que permita trabajar a la parafina en forma líquida. Esta última puede obtenerse desde diversos proveedores de insumos de laboratorio y presenta, según la marca comercial, diferentes puntos de fusión, usualmente entre 55 y 60 °C.

**29.** Un set de tinción es básicamente el conjunto de soluciones a concentración final de uso dispuestas en una serie de jarras de Coplin, ordenadas lógicamente según el protocolo de tinción a utilizar. La [Figura 49](#) muestra la lógica del protocolo de tinción de la experiencia para obtener una tinción tricrómica basada en Alcian Blue/Nuclear Fast Red/Eosina, desarrollada por Dellagnola y colaboradores [51]. Las soluciones deben ser mantenidas en recipientes individuales (120-150 mL) bien tapados hasta su uso.

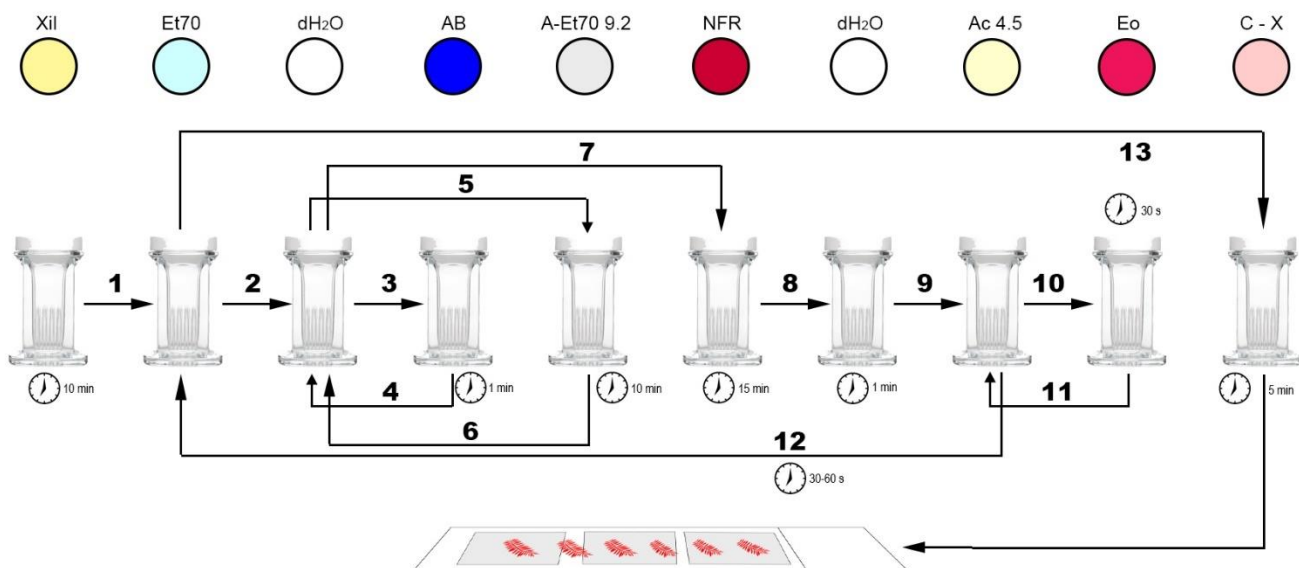


Figura 49. Diagrama del set de tinción y diseño experimental propuesto para los preparados microscópicos de la experiencia 7.

Abreviaturas: Xil, xileno; Et70, solución de etanol al 70%; dH<sub>2</sub>O, agua destilada; AB, Solución de Azul Alcian (1% pH 2.5); A-Et70 9.2, Solución de Amoniaco/Alcohol (70%, pH 9,2); NFR, Solución de Rojo Nuclear Rápido (0,1%); Ac 4.5, Solución de Ácido Acético pH 4,5; Eo, Solución de Eosina (0,5%); C - X, Carbol - xileno.

**30.** El xileno se evapora fácilmente y puede irritar los ojos, las membranas mucosas y la piel. La exposición prolongada a este solvente puede tener efectos nocivos en los sistemas nervioso, musculoesquelético, gastrointestinal, respiratorio, renal, endocrino y cardiovascular [65]. Tener cuidado al trabajar cerca de fuentes de llama porque el xileno es un líquido inflamable. Por estas mismas características, el xileno debe descartarse siguiendo las prácticas adecuadas de gestión de residuos de laboratorio para respetar la bioseguridad ambiental.

**31.** Aunque nosotros mostramos el detalle para uso de Image ProPlus, existen numerosos programas de análisis de micrografías que pueden ser adaptados para la experiencia. Uno de ellos, muy completo y de licencia de uso libre, es ImageJ (<https://imagej.net/ij/>, [66]).

**32.** Existen numerosos programas de soporte estadístico para comparar la media muestral de una variable. Se recomienda, en caso de utilizar análisis estadístico en la experiencia, el uso de los programas que los alumnos hayan usado previamente, o en su defecto, sean capaces de manejar con facilidad.

**33.** *Jenynsia* es un pez que se alimenta principalmente a base de artrópodos en la superficie del agua; sin embargo, acepta cualquier tipo de alimento comercial para peces. Se recomienda proporcionar la comida al menos dos veces por día la cantidad que puedan consumir en pocos minutos, a base de alimento en escamas para peces tropicales (con un contenido de al menos >30% de proteína asimilable). Las escamas pueden complementarse con otro tipo de alimento seco (por ejemplo, en 'sticks' o pastillas de fondo) a base de algas (por ejemplo, enriquecido en la cianobacteria *Spirulina*) y eventualmente alimento fresco o en gel rico en proteínas. El alimento no debe sobrar ni acumularse en los filtros o el fondo del acuario, ya que se corre el riesgo de provocar un aumento de productos nitrogenados poco oxidados (tóxicos) y el sobrecrecimiento de bacterias heterotróficas u otros microorganismos potencialmente patógenos.

**34.** La técnica requiere cierta práctica, pero no es complicada en ejemplares grandes; recomendamos abrir con cuidado el opérculo con pinzas y extraerlo con unas tijeras afiladas pequeñas siguiendo el borde preopercular desde abajo hasta cerrar la incisión con la abertura superior subopercular ([Figura 50A](#)). Extraer con muchísimo cuidado, sin tocar los filamentos branquiales, los arcos branquiales, seccionando los arcos branquiales en la unión con la cavidad bucofaríngea ([Figura 50B](#)). Si el ejemplar es muy pequeño, se puede cortar la cabeza con un bisturí afilado a la altura del opérculo y liberar la base del arco hioideo para exponer los arcos branquiales ([Figura 50C](#)).

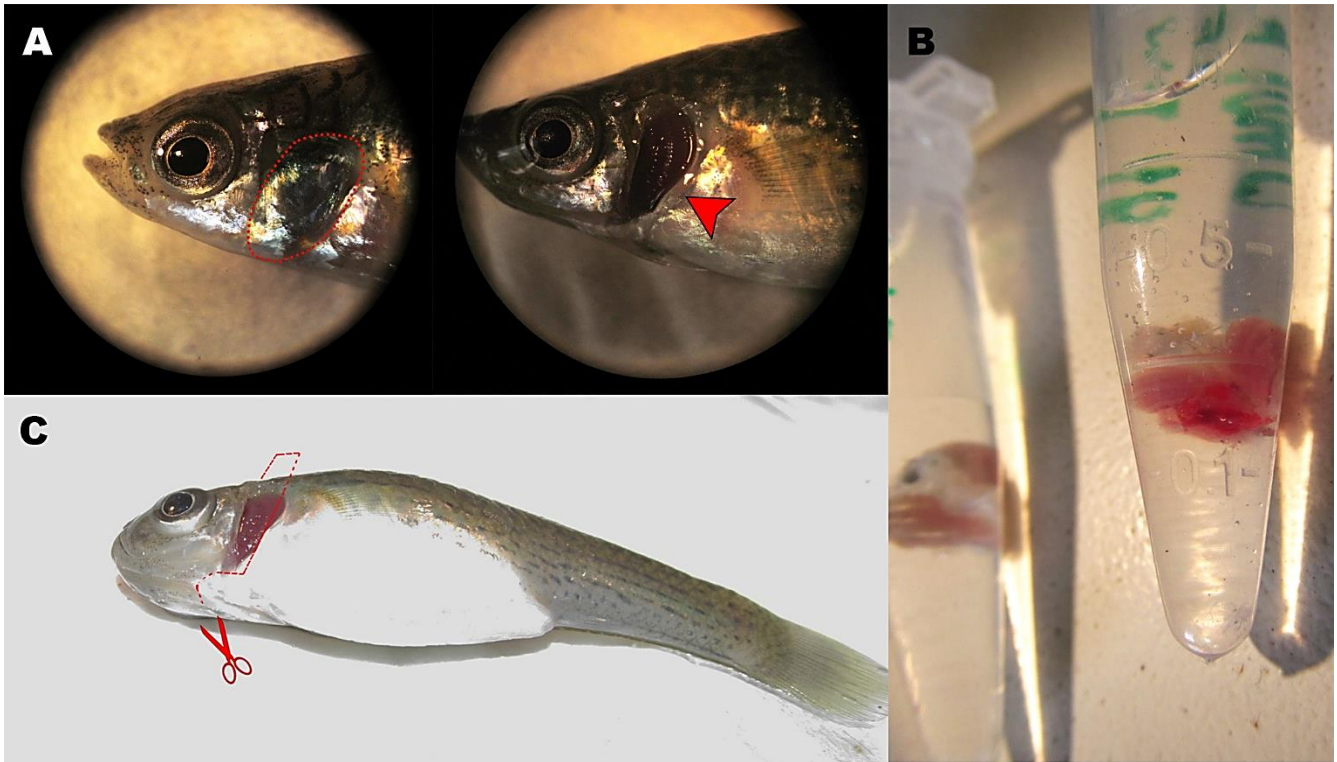


Figura 50. Obtención de tejido branquial en ejemplares eutanasiados de *J. lineata* luego de dos tratamientos osmóticos diferentes.

**A.** Secuencia fotográfica que muestra el área ocupada antes de la remoción del opérculo (línea roja discontinua) y después de su remoción (flecha roja) de la cabeza de un ejemplar de *J. lineata* visto bajo la lupa estereoscópica. **B.** Arcos branquiales con tejido intacto extraído satisfactoriamente del ejemplar mostrado en A. **C.** Zonas extra de disección con bisturí y tijeras (línea roja discontinua) para un mejor acceso a los arcos branquiales en un ejemplar pequeño de *J. lineata*.

**35.** Las medidas de dispersión son muy útiles para conocer la variabilidad de los datos de una variable en una muestra, pero deben ser usadas con cuidado ya que no todas significan conceptualmente lo mismo. Por ejemplo, en las ciencias biomédicas suelen utilizarse indistintamente la Desviación Estándar (SD por sus siglas en inglés) y el error estándar (SE por sus siglas en inglés) como sinónimos, siendo conceptualmente diferentes. La SD es una medida de dispersión válida para una muestra o subconjunto de una población en particular, mientras que el SE estima cómo variarán las medias de la muestra con respecto a la desviación típica de esta distribución de muestreo, disminuyendo a medida que el número de muestras aumenta. Recomendamos articular con los docentes de los espacios curriculares estadísticos para reforzar estos conceptos en los estudiantes.

## 9 BIBLIOGRAFÍA



1. Hill, R.W., G.A. Wyse, and M. Anderson, *Fisiología Animal*. 2006: Ed. Médica Panamericana. 1038.
2. Randall, D., et al., *Eckert - Animal Physiology*. 2002: Macmillan.
3. Schmidt-Nielsen, K., *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. 5th ed. 1997: Cambridge University Press. 607.
4. Hickman, C.P., L.S. Roberts, and A. Larson, *Animal Diversity*. 3rd ed. 2003, Boston: McGraw–Hill. 464.
5. Brusca, R. and G.J. Brusca, *Invertebrates*. 2nd ed. 2003, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 936.
6. Ross, L.G., B. Ross, and B. Ross, *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Third ed. 2008, Oxford: Blackwell Publishing.
7. Ra'anana, A.W., *The evolving role of animal laboratories in physiology instruction*. *Advances in Physiology Education*, 2005. **29**(3): p. 144-150.
8. Weichbrod, R.H., G.A. Thompson, and J.N. Norton, *Management of animal care and use programs in research, education, and testing*. 2018: CRC Press Boca Raton.
9. Zachariah, T.T., *Invertebrate Animal Welfare*, in *Invertebrate Medicine*. 2022, John Wiley & Sons, Inc. p. 669-675.
10. *Canadian Council of Animal Care*. Standards: Guidelines [cited 2024; <https://ccac.ca/>].
11. Heinecke, R.D. and K. Buchmann, *Control of Ichthyophthirius multifiliis using a combination of water filtration and sodium percarbonate: dose-response studies*. *Aquaculture*, 2009. **288**(1-2): p. 32-35.
12. Hovanec, T.A. and E.F. DeLong, *Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(8): p. 2888-2896.
13. Koike, B., *Aquarium Science: Husbandry and Care of Fishes and Aquatic Invertebrates*. *Zookeeping: an Introduction to the Science and Technology*, 2013: p. 347-361.
14. Newman, E.A. and M.H. Newman, *MetaNeuron*. 2013, Regents of the University of Minnesota.
15. Newman, M.H. and E.A. Newman, *MetaNeuron: a free neuron simulation program for teaching cellular neurophysiology*. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 2013. **12**(1): p. A11.
16. Podolefsky, N., et al., *Neurona*, in *PhET Interactive Simulations*. 2018, University of Colorado Boulders.
17. Morrone, J.J. and E.C. Lopretto, *Parsimony analysis of endemicity of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) from southern South America*. *Neotropica*, 1995. **41**: p. 3-8.
18. Collins, P.A. and J.C. Paggi, *Feeding ecology of Macrobrachium borelli (Nobili) (Decapoda: Palaemonidae) in the flood valley of the River Paraná, Argentina*. *Hydrobiologia*, 1997. **362**(1-3): p. 21-30.
19. Anger, K., *Neotropical Macrobrachium (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp*. *Journal of Crustacean Biology*, 2013. **33**(2): p. 151-183.
20. Rosso, J.J., *Peces Pampeanos: Guía y Ecología*. 2006, Buenos Aires: L.O.L.A. 224.
21. Froese, R. and D. Pauly. *FishBase*. 2015; Available from: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
22. Hillman, S.S., *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. 2009, New York: Oxford University Press. 463.
23. Measey, G.J., et al., *Ongoing invasions of the African clawed frog, Xenopus laevis: a global review*. *Biological Invasions*, 2012. **14**(11): p. 2255-2270.
24. Carreño, C.A. and K.C. Nishikawa, *Aquatic feeding in pipid frogs: the use of suction for prey capture*. *The Journal of Experimental Biology*, 2010. **213**(12): p. 2001-2008.
25. Wright, P.A., *Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles*. *The Journal of Experimental Biology*, 1995. **198**(2): p. 273-281.
26. Francis-Floyd, R., et al. *Ammonia in aquatic systems*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2010. **P4**.

27. EPA, *Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia—freshwater 2013*, U.S.E.P. Agency, Editor. 2013, USEPA: Washington, DC.
28. Joshi, R.C. and L.S. Sebastian, *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*. 2006: Philippine Rice Research Institute Nueva Ecija.
29. Rawlings, T.A., et al., *The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States*. BMC Evolutionary Biology, 2007. **7**(1): p. 97.
30. Hayes, K., et al., *Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia*. Diversity and Distributions, 2008. **14**(4): p. 701-712.
31. Lowe, S., et al., *100 of the World's Worst Invasive Alien Species: a selection from the Global Invasive Species Database*, ed. I.S.S. Group. 2000, Auckland, New Zealand: Species Survival Commission; IUCN. 12.
32. Vega, I.A., et al., *Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in Pomacea canaliculata (Caenogastropoda, Ampullariidae)*. Veliger, 2007. **48**(4): p. 276-283.
33. Evans, D.H., P.M. Piermarini, and K.P. Choe, *The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. Physiological Reviews, 2005. **85**(1): p. 97-177.
34. Lang, T., et al., *Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow trout Salmo gairdneri*. Diseases of Aquatic Organisms, 1987(3): p. 159-165.
35. Russo, R.C., *Ammonia, nitrite, and nitrate*, in *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*, G.M. Rand and S.R. Petrocelli, Editors. 1985, FMC Corp., Princeton, NJ. p. 455-471.
36. Camargo, J. and Á. Alonso, *Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment*. Environment International, 2006. **32**(6): p. 831-849.
37. Arillo, A., et al., *Ammonia toxicity mechanism in fish: studies on rainbow trout (Salmo gairdneri Rich.)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1981. **5**(3): p. 316-328.
38. Tomasso, J.R., et al., *Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish*. Transactions of the American Fisheries Society, 1980. **109**(2): p. 229-234.
39. Dellagnola, F., *Estudio comparativo de los corpúsculos pigmentarios de la glándula digestiva de tres especies de ampuláridos*. 2015, Universidad Nacional de Cuyo: Mendoza, Argentina. p. 137.
40. Nelson, J., *Fishes of the World*. 4th ed. 2006, New York: John Wiley & Sons.
41. Koerber, S., T. Litz, and J.M. Mirande, *CLOFFAR - update 1 - supplement to Checklist of the Freshwater Fishes of Argentina*. Ichthyological Contributions of PecesCriollos, 2015. **39**: p. 1-4.
42. Nelson, J., *Breaking wind to survive: fishes that breathe air with their gut*. Journal of Fish Biology, 2014. **84**(3): p. 554-576.
43. Genten, F., E. Terwinghe, and A. Danguy, *Atlas of Fish Histology*. 2009: Science Publishers. 215.
44. Baldisserotto, B., J.M. Mancera Romero, and B.G. Kapoor, *Fish Osmoregulation*. 2007, Enfield, New Hampshire: Science Publishers. 527.
45. Wood, C.M. and T.J. Shuttleworth, *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Fish Physiology. Vol. 14. 1995, San Diego, CA: Academic Press.
46. Calviño, P. and F. Alonso, *First record of the genus Jenynsia from marine water on the coast of Punta del Este, Maldonado, Uruguay (Cyprinodontiformes: Anablepidae)*. Journal of Fish Biology, 2016. **88**(3): p. 1236-1240.
47. Suvarna, K.S., C. Layton, and J.D. Bancroft, *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 2018: Elsevier Health Sciences.
48. Dellagnola, F.A., A.D. Campoy-Diaz, and I.A. Vega, *First morphological and molecular identification of the cercaria of Stomylotrema vicarium from the endemic apple snail Pomacea americanista*. Parasitology, 2021. **149**(1): p. 95-104.



49. Dellagnola, F.A., et al., *Morphological characterization and molecular phylogeny of zoonotic trematodes in the freshwater snail Asolene platae*. *Parasitology*, 2019. **146**(7): p. 839-848.
50. Dellagnola, F.A., et al., *A multiple comparative study of putative endosymbionts in three coexisting apple snail species*. *PeerJ*, 2019. **7**: p. e8125.
51. Dellagnola, F.A., I.A. Vega, and A. Castro-Vazquez, *Evidence for a prokaryotic origin of intracellular corpuscles in the digestive gland of the queen conch Lobatus gigas (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Strombidae)*. *Journal of Molluscan Studies*, 2017. **83**(2): p. 186-193.
52. Mumford, S., et al., *Fish Histology and Histopathology*. 2007: US Fish & Wildlife Service-National Conservation Training Center (USFWS-NCTC).
53. Johnson, G.E., *Giant nerve fibers in crustaceans with special reference to Cambarus and Palaemonetes*. *Journal of Comparative Neurology*, 2004. **36**(4): p. 323-373.
54. Le Verger, K., et al., *Goldfish phenomics reveals commonalities and a lack of universality in the domestication process for ornamentation*. *Evolution Letters*, 2024: p. qrae032.
55. Albrecht, E.A., *Control de la estacionalidad reproductiva en el gastrópodo Pomacea canaliculata (Prosobranchia, Ampullariidae)*, in *ProBiol*. 1998, Universidad Nacional de Cuyo: Mendoza, Argentina.
56. García, R.D., *Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro*. *Avances en Química*, 2018. **13**(3): p. 79-82.
57. Goldring, J.D., *Measuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford Coomassie blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis*. *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, 2019: p. 31-39.
58. Morábito, J., et al. *Calidad del agua de riego de los ríos Mendoza y Tunuyán superior. Tendencias y recomendaciones*. 2014.
59. Plaul, S.E., A.O. Díaz, and C.G. Barbeito, *Gill morphology and morphometry of the facultative air-breathing armoured catfish, Corydoras paleatus, in relation on aquatic respiration*. *Journal of Fish Biology*, 2021. **99**(4): p. 1318-1327.
60. Satora, L., K. Koziół, and J. Zebrowski, *Squamous epithelium formation in the respiratory intestine of the bronze Corydoras Corydoras aeneus (Callichthyidae Teleostei)*. *Acta Histochemica*, 2017. **119**(5): p. 563-568.
61. Persaud, D.I., I.W. Ramnarine, and J.B. Agard, *Trade-off between digestion and respiration in two airbreathing callichthyid catfishes Holposternum littorale (Hancock) and Corydoras aeneus (Gill)*. *Environmental Biology of Fishes*, 2006. **76**(2): p. 159-165.
62. Neiffer, D.L. and M.A. Stamper, *Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs*. *ILAR Journal*, 2009. **50**(4): p. 343-360.
63. Bernardini, L., et al., *Formaldehyde toxicity reports from in vitro and in vivo studies: a review and updated data*. *Drug and Chemical Toxicology*, 2022. **45**(3): p. 972-984.
64. Zhang, L., *Formaldehyde: exposure, toxicity and health effects*. Vol. 37. 2018: Royal Society of Chemistry.
65. Niaz, K., et al., *A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns*. *EXCLI journal*, 2015. **14**: p. 1167-1186.
66. Rasband, W.S., *ImageJ: Image processing and analysis in Java*. *Astrophysics Source Code Library*, 2012: p. ascl:1206.013.

## 10 ANEXO I: EJEMPLO DE DOCUMENTO CICUAL PARA PROTOCOLOS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **INFORME PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES EN INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y SERVICIOS QUE INVOLUCREN LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES**

Mediante este formulario se desea facilitar la revisión de los trabajos que involucren el uso de animales. Los datos aquí volcados serán elevados al Comité Institucional Para el Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL), el que podrá efectuar sugerencias al Investigador o docente.

#### **1. TÍTULO DEL PROYECTO**

**El Mantenimiento de la Homeostasis – Guía de Laboratorio de Fisiología Animal**

#### **2. OBJETIVOS DEL PROYECTO** (describir de forma resumida los objetivos que se persiguen)

El presente proyecto involucra algunas experiencias de laboratorio diseñados para la enseñanza de Fisiología Animal, espacio curricular correspondiente al tercer año de la carrera de Licenciatura en Ciencias Básicas (orientación Biología) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad Nacional de Cuyo). Con estas experiencias de laboratorio se pretende que el alumno de Fisiología Animal comprenda el significado del término "homeostasis" y construya una visión fisiológica integrada abordando aspectos comparativos taxonómicos, ecológicos y evolutivos. Para estos experimentos de laboratorio, se han seleccionado un conjunto de especies animales, filogenéticamente distantes, para evaluar algunas respuestas metabólicas *in vivo* como consecuencia a ciertos desafíos fisiológicos bajo condiciones controladas. Los experimentos descritos han sido diseñados de forma de minimizar el estrés y el número de animales por experiencia. Otras experiencias prácticas de la materia se han planificado *in vitro* y no involucran la utilización de animales, por lo que no serán descritas aquí.

#### **3. DATOS DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE**

**Apellido y Nombres:** DELL AGNOLA, Federico Agustín

**Teléfono:** +54 (0261) 413-5000 interno 2714.

**E-mail:** [dellagnola@gmail.com](mailto:dellagnola@gmail.com)

#### **4. NOMBRE DE LA FACULTAD/INSTITUTO/ O EMPRESA AL QUE PERTENECE EL INVESTIGADOR**

Universidad Nacional de Cuyo.

#### **5. ENTIDAD QUE FINANCIA EL PROYECTO**

Universidad Nacional de Cuyo.

#### **6. DURACIÓN DEL PROYECTO** (el CICUAL otorgará su aval, cuando corresponda, por la duración total del proyecto de investigación)

Los trabajos prácticos de la materia de fisiología animal serán incorporados en el segundo semestre de 2017. De ser aprobado el protocolo, solicitamos que el aval se extienda por 5 años. Asimismo, nos comprometemos a solicitar una nueva evaluación si se incorporan cualquier tipo de modificación en el presente informe.

#### **7. TÍTULO DEL PROCEDIMIENTO O DE LOS PROCEDIMIENTOS** (Se entiende por procedimiento toda utilización de un animal con fines científicos o de docencia que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado, incluida toda actuación que pueda dar lugar al nacimiento de un animal en las condiciones anteriores. No se debe confundir un procedimiento con un proyecto de investigación. Un proyecto puede incluir varios procedimientos. Si su proyecto involucra más de un procedimiento, enumérelas)

**Procedimiento 1:** Cultivo de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) en medios acuáticos de diferente salinidad y osmolaridad.

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Procedimiento 2:** Estudio de la frecuencia respiratoria (branquial e intestinal) en animales con respiración dual expuestos a diferentes temperaturas.

**Procedimiento 3:** Diferencia de agua osmótica (pesado) de organismos acuáticos expuestos a cambios de osmolaridad en el medio.

**Procedimiento 4:** Registro de cambios del comportamiento y de la frecuencia respiratoria branquial, en organismos acuáticos expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado.

**Procedimiento 5:** Eutanasia por sobredosis de anestésico (benzocaína/alcohol, 0,05 g/l).

**7.1. LOS ANIMALES SERÁN** (indicar y completar lo que corresponda)

a) **Sacrificados al llegar al laboratorio para obtención de órganos o tejidos** (describir el método eutásico utilizado)

**Procedimiento 5: Eutanasia por sobredosis de anestésico (benzocaína/alcohol, 0,05 g/l).** Seis ejemplares del pez eurihalino *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) serán aclimatados durante 21 días a 3 medios acuáticos con diferente salinidad y osmolaridad (ver descripción de **Procedimiento 1**). Luego, los animales serán sacrificados, utilizando una solución madre de benzocaína/alcohol de 100 g/l [1] agregada al agua a razón de 0,05 g/l de concentración final, durante 10 minutos o hasta que cesen los movimientos operculares del pez [2]. Posteriormente, las branquias serán disecadas, fijadas en formaldehído e incluidas en resina (Histoplast®) para emplear técnicas histológicas convencionales, donde se evaluará por programas de software el área ocupada por células pavimentosas, mucosas, ionocitos y espacios extracelulares, a partir de micrografías obtenidas desde cortes histológicos teñidos con tinción tricrómica.

b) **Serán sometidos a procedimientos NO quirúrgicos** (describir el procedimiento o los procedimientos del punto 7)

**Procedimiento 1: Cultivo de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) en medios acuáticos de diferente salinidad y osmolaridad.** Seis ejemplares del pez eurihalino *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) serán aclimatados durante 21 días a 3 medios acuáticos con diferente salinidad y osmolaridad. Dos ejemplares serán mantenidos en agua dulce "dura" (aprox. 300 mg/L CaCO<sub>3</sub>), dos ejemplares en agua dulce "blanda" (~60 mg/L CaCO<sub>3</sub>) y 2 ejemplares en agua marina reconstituida artificialmente (salinidad 35‰).

**Procedimiento 2: Estudio de la frecuencia respiratoria (branquial e intestinal) en animales con respiración dual expuestos a diferentes temperaturas.** Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el metabolismo de los respiradores duales se utilizarán en total seis ejemplares pequeños (<30 mm de longitud estándar; LE) y seis ejemplares grandes (> 30 mm LE) del pez *Corydoras paleatus* (Callichthyidae, Siluriformes). Los animales serán ayunados 24 h previo a la experiencia y repartidos en 3 acuarios de 20L de capacidad, con agua corriente decolorada (tiosulfato de sodio: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4 mg/L). Se ubicarán dos ejemplares de cada categoría de tamaño por acuario, equipado con su correspondiente termómetro y conectado a aireación artificial. En el primer acuario la temperatura se mantendrá constante (20°C), en el segundo se subirá progresivamente la temperatura del agua hasta 35°C con un termocalefactor, y en el tercer acuario se bajará la temperatura con geles refrigerantes hasta alcanzar 10°C. Luego de 10 min de alcanzar las temperaturas programadas, se desconectará la aireación y se cuantificará el ritmo respiratorio branquial de cada ejemplar cada 5 min hasta obtener un valor homogéneo. También se registrará el

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

número de veces que cada pez respira aire atmosférico desde la superficie. Al finalizar el experimento, se conectará nuevamente la aireación y la temperatura se regresará gradualmente a 20 °C. Al comienzo y finalización de la experiencia se medirá el pH y la concentración de oxígeno del agua para cada uno de los tratamientos térmicos.

**Procedimiento 3: Diferencia de agua osmótica (pesado) de organismos acuáticos expuestos a cambios de osmolaridad en el medio.** Para evaluar la capacidad de osmorregulación de algunos organismos acuáticos, se utilizarán 3 ejemplares del camarón *Macrobrachium borellii* (Decapoda, Crustacea), 3 ejemplares del pez *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) y 3 ejemplar de la rana *Xenopus laevis* (Amphibia, Anura). Los animales serán sometidos a dos medios acuáticos con diferente salinidad y pesados a intervalos regulares, de modo de obtener por diferencia el agua perdida o ganada por el gradiente osmótico. Los individuos serán repartidos en 3 acuarios específicos de 20L de capacidad, con agua corriente decolorada (tiosulfato de sodio: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4 mg/l) a 20 °C. En acuarios adicionales, se preparará agua salobre (preparada con agua corriente decolorada a 20 °C, a la que se agregará NaCl hasta alcanzar una concentración del 5% p/v). Los animales serán pesados y trasladados al agua salobre por 3 min. Posteriormente, serán pesados a intervalos regulares de 3 min hasta completar 15 minutos de exposición total al agua salobre. Finalmente, se trasladarán otra vez a agua dulce, donde serán pesados a idénticos intervalos temporales (3, 6, 9, 12 y 15 minutos respectivamente).

**Procedimiento 4: Registro de cambios del comportamiento y de la frecuencia respiratoria branquial, en organismos acuáticos expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado.** Para evaluar los efectos tóxicos del amonio no ionizado en la fauna acuática se evaluarán especies animales distandadas filogenéticamente (3 ejemplares del crustáceo *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Crustacea), 3 ejemplares del molusco *Panacea canaliculata* (Ampullariidae, Gastropoda) y 3 ejemplares del pez *Cerassius auratus* (Cyprinidae, Cypriniformes)). Los individuos serán repartidos en 3 acuarios específicos de 20 l de capacidad, con agua corriente decolorada (tiosulfato de sodio: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4 mg/L) a 20 °C. En tres acuarios pequeños (3 l de capacidad con línea de aireación) se llevará el pH del agua original a un valor de 6.5; 7.0, y 8.0 respectivamente. Un ejemplar de cada especie será colocado por acuario. Luego de 10 minutos, se calculará el ritmo respiratorio del pez y se evaluará el comportamiento de todos los ejemplares. Inmediatamente se agregará una solución de sales de amonio, hasta una concentración de Nitrógeno Amonio Total (NAT) de 1 mg/l. A los 15 min, esa concentración será elevada a 5 mg/l NAT, y por último hasta una concentración final de 10 mg/l NAT en idéntico intervalo de tiempo. En cada caso se registrará el ritmo respiratorio del pez y el comportamiento de todos los animales. Pese a que se trabaja con concentraciones menores a las aceptadas como máxima exposición aguda para los fauna acuática [3] si se detectaran signos francos de intoxicación (pérdida de equilibrio, inmovilidad, etc.) el animal será devuelto inmediatamente al acuario original, sin amonio.

-¿El animal será sometido a ~~dolor~~ y/o estrés significativo?

Si.

-¿Se van a utilizar agentes químicos para aliviar el dolor? (especificar droga, dosis y vía)

No.

- Si no se va a aliviar el dolor, justificar:

Los procedimientos descritos en el punto 7.1.b, son fuente de estrés, pero no de dolor.

c) **Serán sometidos a procedimientos quirúrgicos No**

- Describir el procedimiento incluyendo régimen anestésico: droga; vía y dosis. No aplica.

- ¿Se utilizarán bloqueantes neuromusculares? No aplica.



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(En caso afirmativo indicar droga, vía y dosis)

- ¿El animal será sacrificado al final de la cirugía? No aplica.

- En caso de que su respuesta sea negativa, explique en detalle los cuidados postquirúrgicos que seguirá: -

## 7.2 EUTANASIA

a) **Eutanasia programada** (Indique método y/o producto, vía y dosis) **X**

**Procedimiento 5:** Los animales serán sacrificados por sobredosis de anestésico, utilizando una solución madre de benzocaína/alcohol de 100 g/l [1] agregada al agua hasta obtener una concentración final de 0,05 g/l, durante 10 minutos o hasta que cesen los movimientos operculares del pez [2].

b) **Eutanasia no programada:** En caso que durante el procedimiento y/o experimento se detecte dolor o estrés no deseados explique qué criterio/s utilizará para fijar el punto final y qué método eutanásico aplicará. **X**

En caso que en cualquiera de los experimentos anteriores se detecten signos irreversibles de deterioro del estado de salud del animal (pérdida del equilibrio estático-dinámico y/o ritmo respiratorio irregular) por al menos 24 h, se sacrificará al animal siguiendo idéntico procedimiento al desarrollado en el punto **7.2.a (eutanasia programada)**.

Los criterios humanitarios de eutanasia fueron fijados de acuerdo a los criterios publicados por Hendriksen CFM y Morton D [Hendriksen CFM, Morton D., editors. Humane endpoints. In: Animal experiments for biomedical research, Royal Society of Medicine, 1999. (<http://www.lal.org.uk/cont.htm>)].

**7.3. PERSONAS IMPLICADAS EN EL PROCEDIMIENTO** (Indicar la categoría y la capacitación y/o entrenamiento recibido en uso y manejo de animales de laboratorio)

Apellidos y nombre	Categoría (Investigador, técnico, becario, estudiante, etc.)	-
DELL AGNOLA, Federico	Becario Postdoctoral – Jefe de Trabajos Prácticos Fisiología Animal (FCM/FCEN – UNCuyo)	Responsable del mantenimiento de Invertebrados, peces, reptiles, y anfibios del Acuario Municipal de Mendoza (2005-2009).  Investigación en diferentes tópicos de ecofisiología de organismos acuáticos (2009-2017).
VEGA, Israel	Inv. Adjunto CIC CONICET- Profesor Fisiología Animal FCEN – UNCuyo	Investigación con invertebrados de agua dulce y marina (desde 1999 a la fecha).

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### 7.4. DECLARACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Técnicas o estrategias experimentales que cumplen con el principio de las **tres R** (**R**edución del número de animales, **R**efinamiento de la técnica y **R**eemplazo de animales por otras técnicas)

**Indicar el motivo por el cual no se plantea aplicar métodos alternativos al procedimiento propuesto.**

- El procedimiento propuesto es un método alternativo (**Procedimiento 2, 3, 4 y 5**).
- No existe método alternativo al procedimiento (**Procedimiento 1**).
- Existen métodos alternativos, pero no están validados.
- Otros motivos: (Especificar en detalle)

Justificar con bibliografía la respuesta elegida (la bibliografía debe ser breve y concisa pero específica al procedimiento o métodos experimentales).

[Véase al final del formulario la referencia a los trabajos de [1](#), [2](#), [4](#), [5](#)].

#### 8. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

Especie: (nomenclatura binomial según el código ICZN)

**Procedimiento 1:** *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842).

**Procedimiento 2:** *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842).

**Procedimiento 3:** *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896); *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842), *Xenopus laevis* (Daudin, 1802).

**Procedimiento 4:** *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901), *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758).

**Procedimiento 5:** *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842).

#### 9. ORIGEN DE LOS ANIMALES (indicar con una cruz)

a) **Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo** (detallar cuál) . Los ejemplares de *Pomacea canaliculata* (**Procedimiento 4**) serán provistos por el Dr. Sergio Carminatti, responsable del Cocleario del Instituto de Fisiología (IHEM-FCM-UNCuyo). Las condiciones de cultivo, mantenimiento y reproducción de esta especie ya fueron aprobadas previamente por CICUAL (aval N° 55/2015).

b) **Compra fuera de las instituciones antes mencionadas** (especificar proveedor): . Los ejemplares de *Corydoras paleatus*, *Macrobrachium borellii*, *Palaemonetes argentinus*, *Xenopus laevis*, y *Carassius auratus*; correspondientes a los procedimientos 2-4 serán adquiridos en acuarios comerciales habilitados de la ciudad de Mendoza (ej.: Akuarium – Necochea 565, Ciudad, Mendoza; [http://www.akuarium.com.ar/akua\\_home.swf](http://www.akuarium.com.ar/akua_home.swf)).

c) **Otros** (especificar): . Los ejemplares de *Jenynsia multidentata* correspondientes a la experiencia 1 y 3 serán donados, si hubiese disponibilidad, por el Acuario Municipal de Mendoza (<http://www.ciudaddemendoza.gov.ar/acuario-municipal>).

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**10. JUSTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE ANIMALES QUE SE VAN A UTILIZAR POR AÑO** (Indicar el número estimado, de acuerdo al diseño experimental propuesto)

**a) Número de animales a utilizar por experimento**

**Procedimiento 1:** 6 individuos de *Jenynsia multidentata*.

**Procedimiento 2:** 12 individuos de *Corydoras paleatus*.

**Procedimiento 3:** 3 individuos de *Macrobrachium borellii*, 3 individuos de *Jenynsia multidentata*, y 3 individuos de *Xenopus laevis*.

**Procedimiento 4:** 3 individuos de *Palaemonetes argentinus*, 3 individuos de *Pomacea canaliculata*, y 3 individuos de *Carassius auratus*.

**Procedimiento 5:** 6 individuos de *Jenynsia multidentata* (los mismos involucrados en el procedimiento 1).

Número de experimentos totales (calculado para 5 años)

**Procedimiento 1:** 1 (sólo el primer año).

**Procedimiento 2:** 5 (uno por año).

**Procedimiento 3:** 5 (uno por año)

**Procedimiento 4:** 5 (uno por año).

**Procedimiento 5:** 1 (sólo el primer año).

**b) Total de animales a utilizar en el proyecto** (calculado para 5 años)

*Jenynsia multidentata*: 21.

*Corydoras paleatus*: 60.

*Macrobrachium borellii*: 15.

*Xenopus laevis*: 15.

*Palaemonetes argentinus*: 15.

*Carassius auratus*: 15.

**11. JUSTIFICACIÓN DE LA ESPECIE ELEGIDA** (Indicar bibliografía)

**Procedimiento 1.**

***Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842).** Es un pequeño pez vivíparo, eurihalino, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza) gracias a su gran capacidad de resistir tanto bajas temperaturas como aguas de concentración salina elevada. Incluso puede habitar estuarios y desembocaduras de arroyos a escasa distancia del mar, o la misma costa marina en ciertas ocasiones. La especie posee entonces una gran capacidad de amortiguar los cambios de salinidad del medio, ajustando su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h [6]. Desde un punto de vista histológico, tres tipos celulares pueden reconocerse en el tejido branquial típico de *Jenynsia* (y también en otros teleosteos): células pavimentosas (especializadas fundamentalmente en el intercambio gaseoso) células accesorias o mucosas (que producen una mucosidad que actúa como protección mecánica e inmunitaria) e ionocitos, que son las células especializadas en la regulación iónica branquial [7]. Los ionocitos son extremadamente versátiles, y responden al estrés ambiental por medio de mensajeros hormonales y neurotransmisores [8]. En agua marina, estas células branquiales son de disminuir activamente la concentración de cloruro de sodio sérico mientras que en agua dulce son capaces de transportar activamente cloruro de sodio desde el agua, en un transporte acoplado con la excreción de protones y amoníaco [9].



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Procedimiento 2.**

***Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842).** Los peces son el grupo de vertebrados más exitoso, con una riqueza específica estimada en unas 32.500 especies [10]. Esta diversidad se ve reflejada también en las diversas estrategias fisiológicas que han desarrollado a través del camino evolutivo para resolver algunos desafíos ambientales, como ser la antinomia "índice metabólico-oxígeno disuelto". Por otra parte, la riqueza específica de los peces Siluriformes o "bagres" corresponde a casi el 40% de las especies de peces de agua dulce registradas en Argentina [11]. Muchos de éstos bagres son conocidos peces que han desarrollado la capacidad de respirar aire atmosférico (además de respirar por las branquias) de forma independiente en varios clados, y además la respiración dual suele activarse cuando la concentración de oxígeno en el agua es baja [12]. Esta respiración aérea puede cuantificarse por el número de veces que el animal, habitante habitual del bentos, tiene que ir a la superficie a respirar. En particular, *Corydoras paleatus* (Callichthyidae) es una pequeña especie de bagre acorazado que muestra esta capacidad dual de respiración aire-agua; siendo de origen parano-platense y muy conocida en el hobby acuárstico. La especie ha sido trasplantada fuera de su área original, desarrollando poblaciones estables hacia el sur y el oeste de la Argentina (incluyendo algunos cuerpos de agua de Mendoza), lo que da una idea de su rusticidad, resistencia a temperaturas extremas [6] y disponibilidad de individuos; características que hacen a la especie ideal para el presente estudio.

**Procedimiento 3.**

***Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896).** Este camarón es uno de los crustáceos decápodos más conspicuos de la cuenca del Río de la Plata, y tiene una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana de Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil [13]. Allí vive y se alimenta dentro de la comunidad litoral bentónica [14]. El género *Macrobrachium* es el género más diverso de Palaemonidae, una familia de camarones de distribución mundial de áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Muchas de éstas especies son eurihalinas o capaces de soportar aguas salobres en parte de su desarrollo [15].

***Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842).** Es un pequeño pez vivíparo, nativo de la cuenca del Río de La Plata y ampliamente distribuido en gran parte del país (entre los cuales se encuentran varias cuencas de Mendoza) gracias a su gran capacidad de resistir tanto bajas temperaturas invernales como aguas de concentración salina elevada. Esta especie regula su concentración plasmática de sodio en apenas 48-72 h cuando es expuesta a un incremento de la salinidad del medio [6]. *Jenynsia* está incluida en la familia Anablepidae, una pequeña taxa de peces ciprinodontiformes, vivíparos y con un notable dimorfismo sexual; que pueden encontrarse actualmente en aguas dulces, salobres e incluso marinas [16].

***Xenopus laevis* (Daudin, 1802).** La "rana de uñas" es un anuro que se caracteriza por la ausencia de lengua y un cuerpo aplanado en dirección dorsoventral, incluida en la familia Pipidae. Es originaria del África subsahariana, y es un animal modelo ideal para estudios ontogénicos y fisiológicos. Por ejemplo, es capaz de cambiar el metabolismo amoniotélico a ureotélico en respuesta a la deshidratación, es resistente a condiciones anóxicas, y especialmente tiene una alta tolerancia a las soluciones hiperosmóticas [17].

**Procedimiento 4.**

***Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901).** Este pequeño camarón tiene una amplia distribución en aguas dulces de la llanura pampeana de Argentina, Uruguay, Paraguay, y sur de Brasil [13]. Allí vive y se alimenta dentro de la comunidad litoral béntica [14]. La especie ha sido trasplantada a Mendoza, donde ha desarrollado poblaciones estables en la cuenca del Río Tunuyán (Dellagnola, obs. pers.). *Palaemonetes* es un género diverso dentro de Palaemonidae, una familia de camarones de distribución



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

mundial de áreas tropicales y subtropicales; con numerosos representantes de agua dulce y aguas salobres. Como todos los crustáceos decápodos, son animales completamente amoniotéticos.

***Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822)**. Este molusco es nativo de la cuenca del Río de la Plata y es por lejos la especie de ampulárido mejor estudiada y conocida por su enorme capacidad invasora [18-20]. La especie ha expandido en el país su área de distribución original, colonizando otros ambientes del oeste y sur del país. Si bien este animal es un respirador dual, vive en el agua y como tal, es amoniotético. También se ha descrito que acumulan ácido úrico concentrado en cuerpos cristaloides alojados en un tejido pervalcular, con una posible función antioxidante durante el periodo de estivación [21].

***Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)**. Este animal es un pez exótico, de los cuales existen numerosas formas obtenidas por selección artificial. La especie es muy resistente, y suele vivir en el bentos de ambientes lóticos, a veces eutróficos, ricos en vegetación [16]. *Carassius* es un pez teleósteo, taxon que excreta la mayor parte del nitrógeno residual bajo la forma de amoniaco a nivel del epitelio branquial, el cual es el órgano excretor de nitrógeno por excelencia en estos taxa [22].

#### Procedimiento 5.

***Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842)**. Véase Procedimiento 1.

### 12. IDENTIFIQUE LAS INSTALACIONES DESTINADAS A ALOJAR A LOS ANIMALES

Los animales serán alojados en acuarios de vidrio que cuentan con termómetro, termocalefactor y una línea de aireación artificial adosada a piedra difusora, de modo de mantener la temperatura a 25 °C y el oxígeno a niveles de saturación. Los acuarios cuentan además con filtros mecánico-biológicos de material sintético y carbón activado. El agua corriente a utilizar será decolorada con biosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , a 4 mg/l de concentración final). Testeos regulares de calidad de agua (dureza total, dureza de carbonatos, pH,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) serán llevados a cabo semanalmente. Cambios de agua parciales serán hechos cuando (1) la concentración de nitratos supere 25 mg/l, (2) se detecten trazas de nitritos, o (3) el pH descienda por debajo de 7. En condiciones experimentales, los animales serán trasladados a acuarios de 20 l con aireación artificial, control de temperatura y pH. El agua será renovada parcialmente (1/2 del volumen total diariamente) de modo de mantener las condiciones de higiene apropiadas.

### 13. EL ANIMAL SERÁ SACRIFICADO AL FINAL DEL EXPERIMENTO (señale lo que corresponda)

NO

En caso negativo, indicar destino del animal. **Procedimiento 2, 3 y 4:** Los animales serán regresados al bioterio correspondiente o mantenidos en condiciones apropiadas en nuestro laboratorio hasta la experiencia posterior al año siguiente.

SI  Procedimiento 1 y 5.

### 14. RIESGOS PARA EL PERSONAL, PARA LA POBLACION ANIMAL DEL BIOTERIO O PARA EL AMBIENTE (señalar con una cruz lo que corresponda)

a) **Riesgo potencial** (describir el riesgo)

-químico **X**. El formaldehído es un tóxico irritante del sistema respiratorio, piel, y es lacrimógeno en el ser humano. Por otra parte, la sobredosis en los animales acuáticos ( $\text{CL}_{50}$ -96h: 67-166 ppm; véase Chinabut et al 1988) es usualmente mortal, aumentando esa mortalidad con la depleción de



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

oxígeno del agua. Sin embargo, a bajas dosis (15-25 ppm) el formaldehído es utilizado en muchos organismos acuáticos como antiparasitario externo (Francis-Floyd, 1996).

-biológico X. El riesgo biológico al operador implica eventuales heridas corto-punzantes ocasionadas por los radios osificados de las aletas, particularmente en la especie *Corydoras paleatus*. También han sido descritas algunas infecciones cutáneas en el hombre ocasionadas por la bacteria *Mycobacterium marinum* [como ejemplo, véase el trabajo de 23] al manipularse con heridas expuestas organismos acuáticos provenientes de aguas contaminadas con ese microorganismo. El riesgo biológico para los organismos acuáticos involucra infecciones secundarias provocadas en la piel y mucosa debidas a la manipulación, por bacterias, hongos, protozoos, o metazoos parásitos.

~~-radiactivo~~

~~-concerigeno~~

**b) Medidas para disminuir y/o evitar el riesgo (describir)**

La manipulación de todos los organismos acuáticos implicados en los experimentos será a través del empleo de diversas redes de material sintético, de un tamaño adecuado a los animales. A ello se agrega la utilización de guardapolvo y guantes de látex por parte del operador. Adicionalmente, la fijación del tejido branquial con formaldehído se hará además con guantes y bajo campana.

Por otra parte, medidas de profilaxis (azul de metileno al 0,1 %, formalina 0,0025%; ~20 ppm) serán aplicadas al agua del acuario donde se ubican los animales, previa e inmediatamente terminadas las experiencias prácticas de laboratorio, de modo de evitar infecciones bacterianas, protozoarias, o parasitarias en los organismos acuáticos involucrados en los experimentos.

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **15. DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DEL PROYECTO**

El investigador responsable declara:

Que la información que se ha dado en este protocolo es suficiente para dar una imagen exacta del uso y cuidado que se les dará a los animales

Que se han estudiado las alternativas al uso de animales y procedimiento dolorosos o estresantes y que se tomarán las medidas necesarias para aliviar el dolor y/o estrés que se provoque en los animales.

Que tiene los conocimientos que le competen sobre la legislación nacional vigente en el trato de animales (Ley 14346 de protección animal)

Que es consciente que no puede iniciar el proyecto hasta que se cumplan los requisitos que la legislación vigente establece y el aval del CICUAL

Que el aval de este protocolo es por el período que declare el investigador

Que si existe cualquier modificación relevante del procedimiento será necesario comunicarlo al comité. Se consideran modificaciones relevantes:

- a. Aumento del número de animales
- b. Utilización de nuevas especies animales.
- c. Aumento del dolor o sufrimiento del animal
- d. Cambios del lugar donde se realiza el procedimiento

Que el personal implicado en el procedimiento tiene los conocimientos necesarios o están bajo la supervisión directa de quien los tiene

Que entiende cuáles son las funciones del CICUAL y acepta recibir visitas de este comité

**Lugar y Fecha:** Mendoza, 03 de mayo de 2017

**Firma:**



**Aclaración:** Dr. Federico Dellagnola

FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Ross, L.G., B. Ross, and B. Ross, *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Third ed. 2008, Oxford: Blackwell Publishing.
2. Neffler, D.L. and M.A. Stamper, *Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs*. *ILAR Journal*, 2009. **50**(4): p. 343-360.
3. EPA, *Aquatic life ambient water quality criteria for ammonia—freshwater 2013*, U.S.E.P. Agency, Editor. 2013, USEPA: Washington, DC.
4. Lewbart, G.A., *Invertebrate Medicine*. 2nd. ed. 2006: Wiley Online Library.
5. Ra'anani, A.W., *The evolving role of animal laboratories in physiology instruction*. *Advances in Physiology Education*, 2005. **29**(3): p. 144-150.
6. Rosso, J.J., *Peces Pampeanos: Guía y Ecología*. 2006, Buenos Aires: L.O.L.A. 224.
7. Genten, F., E. Terwinghe, and A. Danguy, *Atlas of Fish Histology*. 2009: Science Publishers. 215.
8. Baldisserotto, B., J.M. Mancera Romero, and B.G. Kapoor, *Fish Osmoregulation*. 2007, Enfield, New Hampshire: Science Publishers. 527.
9. Wood, C.M. and T.J. Shuttleworth, *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. *Fish Physiology*. Vol. 14. 1995, San Diego, CA: Academic Press.
10. Nelson, J., *Fishes of the World*. 4th ed. 2006, New York: John Wiley & Sons.
11. Koerber, S., T. Litz, and J.M. Miranda, *CLOFFAR - update 1 - supplement to Checklist of the Freshwater Fishes of Argentina*. *Ichthyological Contributions of PecesCriollos*, 2015. **39**: p. 1-4.
12. Nelson, J., *Breaking wind to survive: fishes that breathe air with their gut*. *Journal of Fish Biology*, 2014. **84**(3): p. 554-576.
13. Morrone, J.J. and E.C. Lopretto, *Parsimony analysis of endemicity of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) from southern South America*. *Neotropica*, 1995. **41**: p. 3-8.
14. Collins, P.A. and J.C. Pagli, *Feeding ecology of *Macrobrachium borellii* (Nobli) (Decapoda: Palaemonidae) in the flood valley of the River Paraná, Argentina*. *Hydrobiologia*, 1997. **362**(1-3): p. 21-30.
15. Anger, K., *Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invasive shrimp*. *Journal of Crustacean Biology*, 2013. **33**(2): p. 151-183.
16. Froese, R. and D. Pauly. *FishBase*. 2015; Available from: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
17. Measey, G.J., et al., *Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review*. *Biological Invasions*, 2012. **14**(11): p. 2255-2270.
18. Rawlings, T.A., et al., *The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States*. *BMC Evolutionary Biology*, 2007. **7**(1): p. 97.
19. Hayes, K.A., et al., *Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia*. *Diversity and Distributions*, 2008. **14**(4): p. 701-712.
20. Joshi, R.C. and L.S. Sebastian, *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*. 2006: Philippine Rice Research Institute Nueva Edja.
21. Vega, I.A., et al., *Uric acid accumulation within intracellular crystalline corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae)*. *Veliger*, 2007. **48**(4): p. 276-283.
22. Evans, D.H., P.M. Pierrarini, and K.P. Choe, *The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. *Physiological Reviews*, 2005. **85**(1): p. 97-177.
23. Lewis, F.M., B.J. Marsh, and C.F. von Reyn, *Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention*. *Clinical Infectious Diseases*, 2003. **37**(3): p. 390-397.



FECHA: --- / --- / ---



Mendoza, 5 de mayo 2017

CICUAL Aval N° 104/2017

Los integrantes del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), han evaluado el protocolo para el uso de animales en docencia: "El Mantenimiento de la Homeostasis – Guía de Laboratorio de Fisiología Animal", presentado por Mesa de Entradas de FCM mediante Nota N°0014125/2017. Este curso corresponde a tercer año de la carrera de Licenciatura en Ciencias Básicas (orientación Biología) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo, siendo responsable el Dr. Federico Agustín DELL AGNOLA

El CICUAL concluye que el mencionado protocolo cumple con las reglamentaciones institucionales y Legislación Nacional vigentes referidas al uso de animales en docencia. Por lo tanto, el CICUAL no tiene objeciones para los siguientes procedimientos que involucran animales descriptos en el mismo:

1. Procedimiento 1: Cultivo de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) en medios acuáticos de diferente salinidad y osmolaridad.
2. Procedimiento 2: Estudio de la frecuencia respiratoria (branquial e intestinal) en animales con respiración dual expuestos a diferentes temperaturas.
3. Procedimiento 3: Diferencia de agua osmótica (pesado) de organismos acuáticos expuestos a cambios de osmolaridad en el medio.
4. Procedimiento 4: Registro de cambios del comportamiento y de la frecuencia respiratoria branquial, en organismos acuáticos expuestos a diferentes concentraciones de amonio no ionizado.
5. Procedimiento 5: Eutanasia por sobredosis de anestésico (benzocaina/alcohol, 0,05 g/l).

Los procedimientos enunciados se encuentran avalados por CICUAL desde mayo 2017 hasta diciembre 2022.

Todo trabajo que resultara de este proyecto debe hacer referencia al presente aval de la siguiente manera:

"All animals were cared in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals of the US National Institute of Health. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medical Science, Universidad Nacional de Cuyo (Protocol approval N° 104/2017)".



FECHA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

De acuerdo a lo declarado por el director del proyecto asegura que el presente protocolo no tendrá cambios sin previa notificación y revisión del CICUAL, como así también acepta recibir inspecciones por miembros del Comité.

El presente certificado tiene validez oficial y podrá ser presentado ante el organismo que lo solicite.

  
Isabel Gonzalez

  
Jorjeh Salta

  
Flaminia Lopez, C.

  
Paula Gimeno

  
Claudia Castro

  
Federico Pellizzer

  
A. Corbin

  
Cristian Acosta

  
Mercedes A. NICHOT