

## HISTOFISIOLOGIA DEL OPERCULO DEL GUAPOTE, *Dormitator latifrons* (Richardson, 1837). ADAPTADO AL AGUA DULCE Y DE MAR.

Por

Omar A. Dupuy L. y César A. Villarreal.

Departamento de Fisiología y Comportamiento Animal

### RESUMEN

La estructura microscópica del epitelio opercular del guapote (*Dormitator latifrons*, R.), es descrita por vez primera en el trabajo presente. Igualmente se reportan las respuestas de las células de cloro (CC) y de moco (CM) de este órgano, al ser sometido el guapote al agua de mar (AM) y dulce (AD). El resultado más importante es el de que las CC son escasas en el epitelio opercular, contrastando en este respecto, con las correspondientes del epitelio branquial, en donde son muy abundantes. Adicionalmente, observamos que las CM, son más activas en AD que en AM, ya que su número, diámetro y tintorialidad es más marcada en el primer medio que en el segundo. Finalmente se discute en forma pormenorizada las respuestas citológicas de las CM al ser expuestas a medios de diferente salinidad.

### PALABRAS CLAVES:

*Dormitator latifrons*, epitelio opercular, opérculo, células de moco, células de cloro, mucocitos, ionocitos, osmorregulación, ionosmorregulación.

### INTRODUCCION

El epitelio opercular de los peces ha sido sometido a un estudio cuidadoso desde la década de los ochenta, cuando se demostró que constituye uno de sus tejidos osmorreguladores y de excreción más importantes (Karnaky, 1980). La primera evidencia en este sentido fue aportada por Burns y Copeland, quienes en 1950, demostraron que el epitelio opercular de

*Fundulus heteroclitus* posee células de cloro (CC) o ionocitos. Más tarde se comprobó que en este epitelio: (a) el número de CC aumenta con la salinidad del medio y que (b) las CC del mismo, son el único elemento electrogénico y conductivo aquí presente (Foskett y Scheffey, 1982; Zadunaisky, 1984a). Los atributos fisiológicos e histológicos de este tejido han sido extendidos a la tilapia (*Oreochromis mossambicus*); el gobio (*Gillichthys mirabilis*) y el killifish (*F. grandis*) (Foskett y Scheffey, 1982; Zadunaisky, 1984a). Las características mencionadas, son enormemente apreciadas por los fisiólogos, toda vez que permiten estudiar segmentos dermales del opérculo en la cámara de Ussing (Ussing y Zerahn, 1951) con el propósito de conocer las propiedades conductivas de las CC, tanto como de otras características de los tejidos secretores (Karnaky, 1980; Zadunaisky, 1984 a y b).

Histológicamente el opérculo consiste de un tejido conectivo vascularizado, fibras de colágeno, células pigmentadas y fibras musculares estriadas que mueven los radios branquiostélicos (Karnaky, 1980). A éstos se suma un epitelio estratificado que incluye células no diferenciadas, pavimentosas, y las secretoras de cloro (CC) y moco (CM) o mucocitos (Karnaky y Kinter, 1977; Karnaky *et al.*, 1977). Por otro lado, trabajos independientes han llevado a concluir que las CM y CC operculares están relacionadas con funciones osmorreguladoras (Marshall, 1976; Wendelaar Bonga, 1978; Avella *et al.*, 1987; Hwang, 1988; Perry y Laurent, 1989).

El *Dormitator latifrons* (R.) es capaz de osmorregular en forma altamente eficiente en medios hiperosmóticos (Chang, 1984; Villarreal *et al.* 1986, 1993). El órgano osmorregulador por excelencia en este pez es la branquia, ya que el *D. latifrons* adaptado al agua de mar (**AM**) presenta en sus branquias **CC** más grandes y más numerosas que los adaptados al agua dulce (**AD**). En tanto que las **CM** disminuyen en tamaño y número una vez que la branquia es adaptada a **AM** (Katsudas, 1994; Dupuy y Villarreal, 1997).

El propósito de este trabajo es presentar una visión panorámica de la histología del opérculo del *D. latifrons* desde la perspectiva de las diferencias encontradas en los guapotes adaptados a **AD** y a **AM**; ampliando de esta forma las propiedades osmorreguladoras de la branquia a este tejido. Tal conocimiento, hará viable el estudio de las propiedades ionorreguladoras y secretoras del opérculo en forma aislada, tanto como de su capacidad para generar potencial transepitelial. Esta última posibilidad, permitirá el uso del epitelio opercular del guapote como modelo de membrana para el estudio de sus propiedades bioeléctricas, mediante el uso de la cámara de Ussing (Ussing y Zerahn, 1951).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Método de Captura:

Se capturaron 32 ejemplares machos y 24 hembras de *D. latifrons* ( $99,4 \pm 4,0$  g. de peso y  $15,8 \pm 0,2$  cm. de longitud estandar), en la localidad Puente de la Reina de Panamá Viejo, Provincia de Panamá ( $9^{\circ} 1' 6,6''N$ ;  $79^{\circ} 28' 37''W$ ). Los peces colectados fueron trasladados al Lab. Dr. Erich Graetz del Departamento de Fisiología y Comportamiento Animal, en donde se realizaron los experimentos.

### Aclimatación:

Para la aclimatación de los peces se siguieron los procedimientos descritos por Dupuy y Villarreal (1997). Una vez aclimatados, los peces fueron transferidos a 4 peceras de

75,7 L., en número de 14 peces en cada una. Se tuvo el cuidado de asegurar que la distribución por sexo fuera lo más homogénea posible. Dos tanques fueron llenados con agua de grifo declorinada, aquí definida como agua dulce **AD** (Control). Los otros dos tanques fueron colmados con agua de mar 32,0 ‰ (**AM**).

Al inicio de la transferencia ( $t=0$ ) a los diferentes tanques se muestrearon 4 peces, de allí en adelante se tomaron 3 peces diario por tanque durante 7 días y muestras similares el día 15 del experimento. Los peces fueron sacrificados mediante sobreenestesia con etil-*m*-aminobenzoato (MS 222) a una concentración de 180 mg/L (Villarreal y Valdés, 1995); finalmente, se extraían los opérculos.

### Tratamiento histológico para microscopia óptica (MO):

Los opérculos fueron fijados en solución de Bouin por un período no mayor de 72 h, al término del cual se obtuvieron trozos del área central del opérculo izquierdo, los cuales fueron posteriormente lavados bajo flujo continuo de agua de grifo por 48 h. Las muestras, seguidamente, fueron descalcificadas con  $HNO_3$  10% por 2 h, deshidratadas con etanol en grado creciente, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. Con el propósito de examinar ambas superficies del opérculo, la capa mucosa interna (pared de la boca) y la capa mucosa externa (epitelio), se realizaron cortes transversales del opérculo a  $3 \mu m$  de espesor. A continuación los cortes fueron teñidos con el **Método de Cain** para mitocondria (Luna, 1968).

### Mediciones morfométricas:

El estado del opérculo de *D. latifrons* fue estimado cualitativa y cuantitativamente. En el último caso, la evaluación se realizó mediante la medición de los índices celulares (**IC**) denominados densidad y diámetro celular. La **densidad celular** comprende el número de células por unidad de área, mientras que el **diámetro celular (DC)** consiste en dividir entre dos la suma de la longitud y el ancho celular, y expresado por la ecuación

**DC** = Longitud máxima+Ancho máximo/2 (Villarreal *et al.* 1996).

La determinación del diámetro celular se realizó con la ayuda de un micrómetro ocular, en 5 células de cloro y 25 de moco nucleadas presentes en un corte transversal del opérculo por cada pez. Para la determinación de la densidad celular se contaron el número de células de cloro y moco presente en un área de  $5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  de epitelio opercular. No obstante, el número de **CC** era tan exiguamente pequeño que la determinación de la densidad celular de ellas se hizo imposible.

La actividad secretora fue evaluada subjetivamente mediante la determinación del grado de tintorialidad de las células de moco del opérculo. Con este fin, a las células de moco, se le asignaron dos categorías de celeste, a saber: (a) **intenso**, (b) **claro**. Seguidamente se determinó el porcentaje correspondiente de cada categoría del total de células de moco.

#### **Análisis estadístico de la data:**

Se emplearon las pruebas **no paramétricas**: Chi cuadrado, Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney (Sokal y Rohlf, 1979). Para tal efecto se hizo uso del programa blando **True Epistat**. Los resultados se expresan como **promedio ± ES**.

## **RESULTADOS**

### **Histoquímica del opérculo**

Las reacciones químicas entre la tinción para mitocondrias de Cain y los diferentes componentes celulares del tejido opercular de *D. latifrons* son similares a las de sus homólogos en branquias. Para una descripción detallada de las mismas ver Dupuy (1995) y Dupuy y Villarreal (1997).

### **Histología del opérculo:**

El opérculo del *D. latifrons*, *in toto* se sienta en un lecho de tejido conectivo vascularizado, fibras de colágeno y fibras musculares

estriadas. La capa mucosa externa está constituida de un epitelio plano estratificado en el que se observan en abundancia las **CM**, mientras que sorprendentemente las **CC** son escasas. En agua dulce las **CM** conforman una capa compacta de células. Entre tanto, en los guapotes adaptados a **AM**, las **CM** están disgregadas a todo lo largo del epitelio. Las **CC** son ovaladas, con núcleo excéntrico y su citoplasma se tiñe diferencialmente de rojo (reacción de Cain). El número de **CC** operculares, a diferencia de la branquia, fue tan exiguo en ambos tratamientos, que no fue posible un análisis estadístico de esta población celular. Circundantes a las **CM** y **CC** se encuentran las células no diferenciadas, las cuales se continúan más hacia el interior del tejido opercular (Figs. 1 y 2A y B).

### **Diámetro del mucocito opercular adaptado a AD y AM:**

Las **CM** de *D. latifrons* adaptado a **AD** incrementan significativamente ( $p < 0,05$ ) su tamaño luego de las primeras 24 h con respecto a la de los peces habituados a **AM**, desde un diámetro de  $8,733 \pm 0,295 \mu\text{m}$  hasta un valor máximo de  $15,013 \pm 0,387 \mu\text{m}$  a las 120 h. Mientras los guapotes adaptados a **AM** mantenían inalterado su tamaño con excepción al correspondiente a las 48 h cuando su diámetro fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que en **AD**. De las 120 h en adelante el diámetro de los mucocitos de los guapotes adaptados a **AD** disminuyó en forma variable alcanzando el valor **AM** a las 360 h (Fig. 3).

### **Densidad del mucocito opercular adaptado a AD y AM:**

La divergencia entre el número de mucocitos en los opérculos de los peces adaptados **AD** fue significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente al de los opérculos de los peces en **AM** después de las primeras 48 h cuando la densidad celular en los peces de **AD** aumentó notablemente hasta alcanzar un valor máximo de  $2,61 \times 10^5 \pm 0,15 \text{ células/cm}^2$  a las

120 h. Seguidamente el número de células de moco en los opérculos de estos peces disminuyó hasta  $0,71 \times 10^5 \pm 0,076$  células/cm<sup>2</sup> a las 168 h para luego aumentar a  $1,49 \times 10^5 \pm 0,17$  células/cm<sup>2</sup> a las 360 h. Mientras que en los peces de **AM** decreció de un valor de  $1,04 \times 10^5 \pm 0,12$  células/cm<sup>2</sup> a las 48 h hasta uno de  $0,05 \times 10^5 \pm 0,02$  células/cm<sup>2</sup> a las 360 h (Fig. 4).

### Tintorialidad de los mucocitos operculares:

El porcentaje de **CM**, intensamente teñidas de celeste, en los peces expuestos a **AD** se incrementó paulatinamente hasta alcanzar un valor de  $92,0 \pm 0,92$  % a las 144 h luego disminuyó en las horas subsiguientes hasta un  $73,33 \pm 2,67$  %. Los peces sometidos a **AM**, mientras tanto, mantuvieron el porcentaje de tintorialidad celular significativamente ( $p < 0,05$ ) por debajo de los correspondientes en **AD**, con excepción de las 168 h cuando lo inverso fue cierto (Fig. 5 y Cuadro 1). Los mucocitos de los opérculos de los guapotes sometidos a **AM** describieron el mismo patrón que los sometidos a **AD**, aunque con un ligero desplazamiento temporal, y como se indicó anteriormente la tintorialidad para cada hora fue significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a la correspondiente a **AD**. El porcentaje más bajo de tintorialidad para estos peces fue de  $7,69 \pm 2,81$  % mucocitos celeste intenso a las 360 h de tratamiento.

### Variación en los IC y tintorialidad en cada tratamiento:

Al analizar el comportamiento de los **IC** y de la densidad celular dentro de cada tratamiento (**AD** y **AM**) para cada hora la variación fue altamente significativa ( $p < 0,005$ ) en cada uno de ellos (Cuadro 2).

## DISCUSION

### Significado funcional de las variaciones citológicas:

El incremento en diámetro y tintorialidad celular es corrientemente interpretado como el resultado de tres eventos celulares: síntesis, almacenamiento y secreción de productos metabólicos (Follénus *et al.*, 1978; Villarreal, 1983). El aumento en diámetro celular (hipertrofia) será el resultado de una alta actividad sintética y de almacenamiento, asociada a una secreción moderada de productos. Tal evento vendrá corroborado por un incremento en tintorialidad (almacenamiento de productos). Por otra parte, un incremento en densidad celular es representativo de un proceso de proliferación celular (hiperplasia) (Villarreal *et al.*, 1996). Los resultados del presente escrito son consistentes con esta interpretación como se hará evidente más adelante. No obstante, la metodología utilizada para demostrar tales respuestas no es inequívoca, toda vez que nosotros observamos que existen diferencias altamente significativas ( $p < 0,005$ ) dentro de los tratamientos (**AD** y **AM**) para cada hora (Cuadro 2). Diferencias éstas, que no pueden ser adscritas a la influencia del medio externo (salinidad), sino a error de muestreo. En un trabajo, no muy bien valorado, Clancy y Herlihy (1979), demostraron que la metodología aquí usada, incrementa significativamente la varianza, cuando se la compara con aquella que cuantifica directamente el diámetro celular. Dicho error, sin embargo, puede aminorarse cuando se miden células que presentan núcleo central (Foucher y Beamish, 1980; Rob, 1982). En el presente trabajo se midió células nucleadas, mientras que Katsudas (1994), midiendo directamente el diámetro celular en la branquia del guapote sometido a **AM** y **AD**, a microscopía electrónica encontró resultados similares y comparables por los reportados aquí, por nosotros. Finalmente las células sometidas a **AM** presentaron consistentemente valores de **IC** significativamente menores ( $p < 0,05$ ), a los correspondientes a **AD**.

### La importancia de los ionocitos operculares:

La inferencia más importante derivada de este trabajo está representada por el hecho de que el tejido opercular del *Dormitator latifrons* (R.), no muestra gran abundancia de ionocitos o **CC**, esta característica le distancia del otro gobioido eurihalino mejor estudiado, el chupaboca (*Gillichthys mirabilis*) (Karnaky, 1980; Zadunaisky, 1984a). Uno de los propósitos de la presente investigación era el de determinar si el tejido opercular del guapote era adecuado para el estudio bioeléctrico mediante el uso de la cámara de Ussing (Ussing y Zerahn, 1951). Tal estudio permitiría conocer indirectamente las capacidades electrogénicas de los ionocitos (Karnaky, 1980, Zadunaisky, 1984a, 1984b; Zadunaisky *et al.*, 1988). La ausencia de **CC** en el opérculo del guapote le descalifica como tejido apropiado para estudios de ionoosmorregulación.

### El comportamiento de los mucocitos operculares:

Los mucocitos, a diferencia de las **CC**, son extremadamente abundantes en el tejido opercular y son capaces de responder a variaciones en la presión osmótica del medio (Figs. 1 y 2A y B). En efecto, la **CM** guardan una relación inversa con la presión osmótica, toda vez que al aumentar esta última, el diámetro, densidad y tintorialidad de las primeras disminuyen en forma significativa ( $p < 0.05$ ) (Figs. 3, 4 y 5). Estos resultados coinciden con aquellos reportados independientemente por Dupuy y Villarreal (1997), para la branquia del guapote. Así tenemos, que estos investigadores comunican que los mucocitos disminuyen en tamaño y número, al adaptarse la branquia del *D. latifrons* a **AM**. Una conducta similar ha sido reportada para la branquia de los peces eurihalinos, espino de tres espinas (*Gasterosteus aculeatus*) y el coto cuernos de alce (*Leptocottus armatus*); tanto como para el pez estenohalino *Carassius auratus* (pececito

dorado) (Araya y Mugita, 1974; Marshall, 1976; Wendelaar Bonga, 1978).

### Papel de los mucocitos en la adaptación hiperosmótica:

La respuesta tintorial de las **CM** del epitelio opercular puede ser interpretada en el sentido de que los mucocitos del opérculo adaptado a **AD** sintetizan y secretan más moco que cuando están adaptados a **AM**. Pues para casi todas las horas estudiadas la tintorialidad de las **CM** fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en **AD** que en **AM** (Fig. 5 y Cuadro 1). Esta respuesta contrasta ligeramente con aquella reportada para la branquia del guapote que presenta mucocitos con mayor grado de tintorialidad en los peces adaptados a **AD** durante las primeras 120 h de adaptación, de allí en adelante la relación se invierte. Esto es, que los mucocitos adaptados a **AM**, después de este instante, presentan mayor tintorialidad que los adaptados a **AD** (Dupuy y Villarreal, 1997). Estos autores explicaron sus resultados sugiriendo que esta respuesta de la branquia reflejaba un compromiso entre las funciones hiperosmorreguladoras adscritas a los mucocitos y sus funciones protectoras a saber, inmunitaria, antifriccional y antitóxicas (Marshall, 1976; Mallatt, 1985). El presente trabajo sugiere una explicación adicional para la respuesta antes reseñada. Así tenemos, que los mucocitos operculares se encuentran más apiñados y poseen diámetros celulares mayores que los correspondientes a los mucocitos branquiales. Estas dos observaciones indican que las mediciones obtenidas en la población celular opercular son más precisas y por ende menos sujetas a error de muestreo que las correspondientes a la branquia. Concluimos entonces, que la función de los mucocitos del opérculo tanto como los de la branquia de *D. latifrons* es la de participar en los procesos de hiperosmorregulación, al producir una cubierta mucosa que actúa como barrera protectora en medios hipoosmóticos (Burden, 1956; Marshall, 1976; Wendelaar Bonga, 1978). Esta interpretación se ve confirmada por el hecho de que en ambos tejidos, tanto el diámetro como el número de

estas células aumenta en **AD** (ver figuras 6b y 7b en Dupuy y Villarreal, 1997). Consistente con esta interpretación, Wendelaar Bonga (1978) ha demostrado, al menos en la tilapia, que el número y tamaño de los mucocitos está inversamente relacionado con la concentración de calcio y como el mucus de los peces contiene proteínas secuestradoras de calcio (Jagoe y Haines, 1990), es muy probable que la cubierta mucosa aumente la concentración de calcio en la superficie del integumento. A su vez, esta situación permitiría una disminución de la tasa de permeabilidad al agua y a los iones, incluso en medios con bajo nivel de calcio. Todos estos resultados son coherentes con la afirmación de Villarreal *et al.* (1993) en el sentido de que el guapote posee mecanismos dermales pasivos, como el arriba descrito, que le permiten resistir variaciones rápidas de osmolaridad, antes de poner en juego dispositivos osmorreguladores más radicales.

## AGRADECIMIENTO

Al Dr. Alfredo Soler, a los Licenciados María Pérez y Edilberto Aguilar, por facilitarnos y asesorarnos en el uso del equipo fotográfico de microscopía óptica.

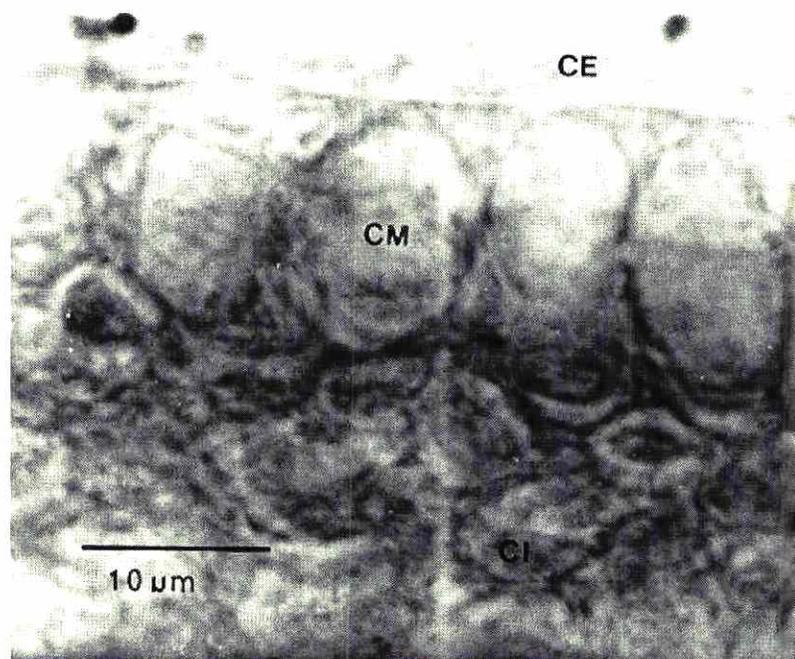
**CUADRO 1. Anova Simple de los Datos de Tintorialidad de las Células de Moco entre Tratamientos.**

T(h)	Valores de F
0	---
24	8,185 *** p < 0,05
48	236,308 *** p < 0,005
72	25,825 *** p < 0,01
96	26,692 *** p < 0,01
120	251,281 *** p < 0,005
144	128,180 *** p < 0,005
168	7,420 ** p < 0,1
360	994,295 *** p < 0,005

**CUADRO 2. Anova Simple de los Datos de Diámetro, Densidad y Tintorialidad para cada Tratamiento.**

Índice Celular	Valores de F	
	AD	AM
Diámetro	106,539 ***	36,821 ***
Densidad	61,275 ***	40,354 ***
Tintorialidad	412,834 ***	130,698 ***

**FIGURA 1.** Sección transversal del epitelio opercular del guapote adaptado por 144 h a AD. CM: Células de moco. CI: Células indiferenciadas. CE: Células epiteliales. Método de Cain (MC). 500X.



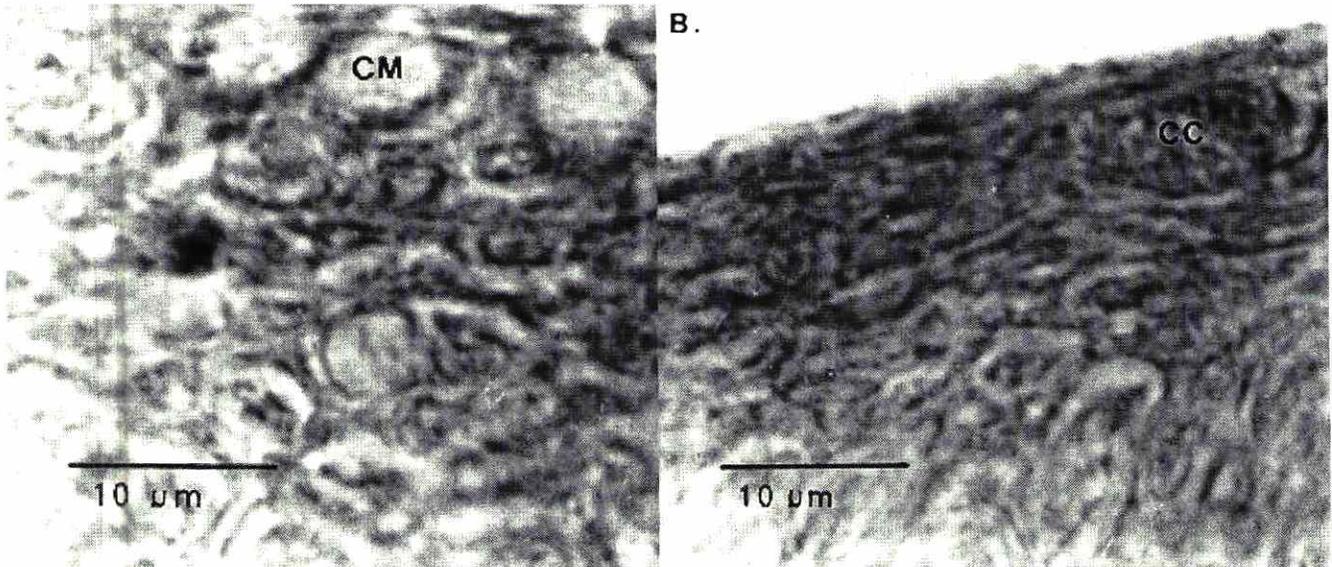


FIGURA 2. Sección transversal del epitelio opercular del guapote adaptado por 144 h a AM. MC. 500X. (A.) CM: Células de moco. (B.) CC: Célula de cloro.

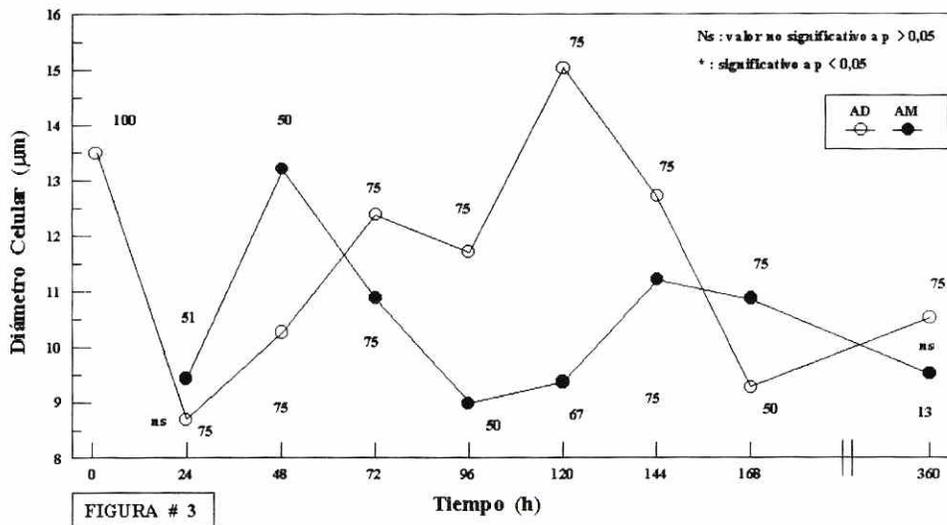


FIGURA 3. Variación en el diámetro celular (µm) de las células de moco o mucocito del epitelio opercular de guapotes sometidos a AM (experimental) y a AD (control). Promedio ± ES. N: número de células. \* p < 0,05. ns: no significativo.

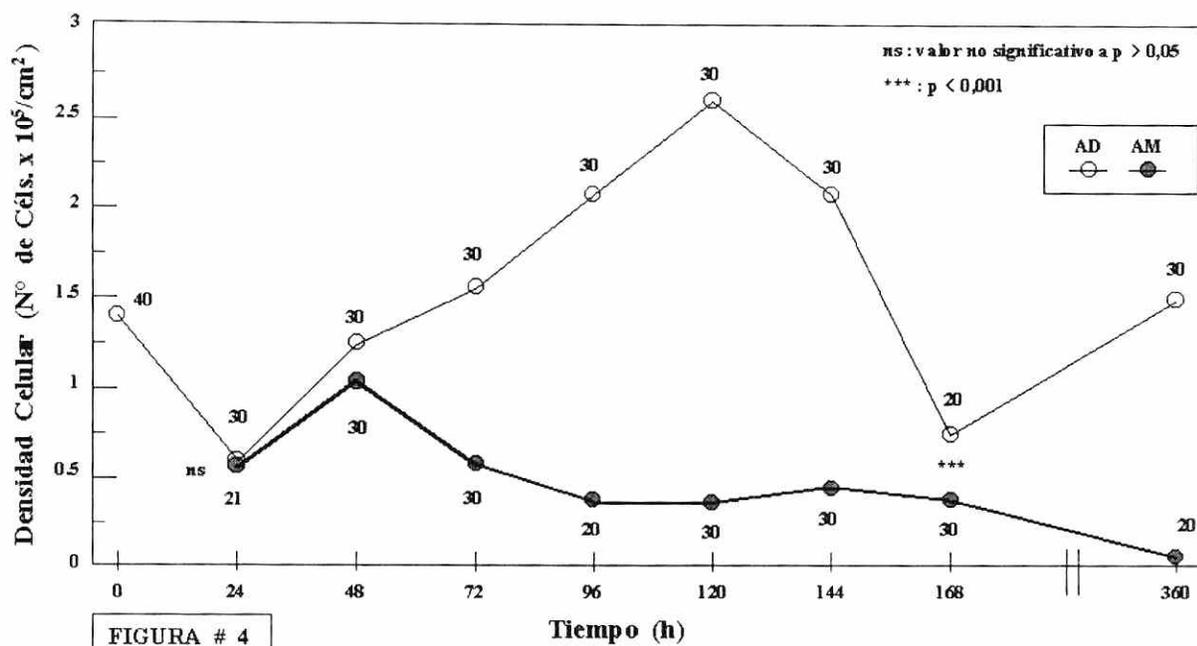


FIGURA 4. Variación en densidad celular (No. de células x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>) de las células de moco o mucocitos del epitelio opercular de guapotes sometidos a AM y a AD. Promedio  $\pm$  ES. N: número de células. \*\*\*  $p < 0,001$ . ns: no significativo.

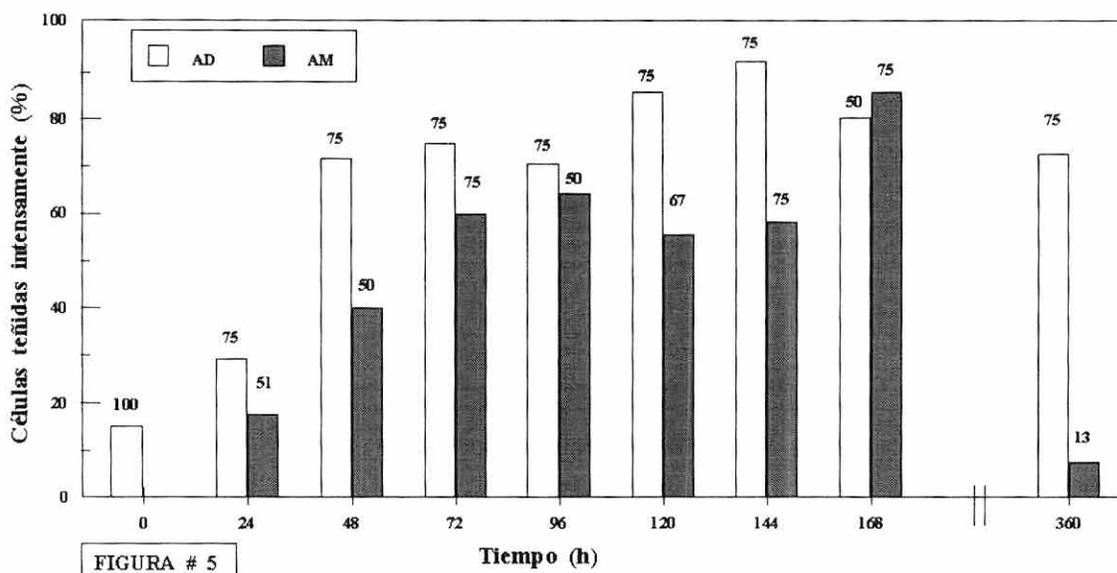


FIGURA 5. Variación en la intensidad de tintorialidad de las células de moco o mucocitos (celeste intenso.) del epitelio opercular de guapotes sometidos a AM y AD. Promedio  $\pm$  ES. Barras en negro AM. y las barras en blanco AD.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. ARAYA, K. y MUGIYA, Y. 1974. Effects of calcium removal from dilute sea water on salinity tolerance and blood constituents levels of goldfish with a note of mucus release from the gills. **Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.** 25, 200-210.
2. AVELLA, M., MASON, A., BORNANCIN, M. y MAYER-GOSTAN, N. 1987. Gill morphology and sodium influx in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimated to artificial freshwater environments. **J. Exp. Zool.** 241, 159-169.
3. BURNS, J. y COPELAND, D.E. 1950. Chloride excretion in the head region of *Fundulus heteroclitus*. **Biol. Bull. Woods Hole Mass.** 99, 381-385.
4. BURDEN, C.E. 1956. The failure of hypophysectomized *Fundulus heteroclitus* to survive in fresh water. **Biol. Bull.** 110, 8-28.
5. CHANG, B.D. 1984. Tolerances to salinity and air exposure of *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae). **Rev. Biol. Trop.** 32, 155-158.
6. CLANCY, M.J. y HERLIHY, P.D. 1979. Muscle fibre size and their frequency distributions. **Manuscrito**. Meeting of the Society for Experimental Biology. The Queen's Univ. Belfast. July 4-6.
7. DUPUY L., O. 1995. **Estructura Histológica y Adaptación Hipoosmótica de la Región Operculo-branquial del guapote *Dormitator latifrons* (Richardson, 1837)**. Tesis de Licenciatura. Dep. de Fisiol. y Comp. Animal. Universidad de Panamá. 100 pp.
8. DUPUY L., O. y VILLARREAL, C.A. 1997. Respuestas del epitelio branquial del guapote, *Dormitator latifrons* (Richardson, 1837) durante adaptación osmótica. **Scientia (Panamá): en prensa.**
9. FOLLÉNIUS, E., DOERR-SCHOTT, J. y DUBOIS, M.P. 1978. Immunocytology of pituitary cells from teleost fishes. **Int. Rev. Cytol.** 54, 193-223.
10. FOSKETT, J.K. y SCHEFFEY, C. 1982. The chloride cell: Definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. **Science** 215, 164-166.
11. FOUCHER, R.P. y BEAMISH, R.J. 1980. Production of nonviable oocytes by Pacific hake (*Merluccius productus*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 37, 41-48.
12. HWANG, P-P. 1988. Multicellular complex of chloride cells in the gills of freshwater teleosts. **J. Morphol.** 196, 15-22.
13. JAGOE, C.H. y HAINES, T.A. 1990. Morphometric effects of low pH and lime water on the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 47, 2451-2460.
14. KARNAKY, K.J. 1980. Ion-secreting epithelia: Chloride cells in the head region of *Fundulus heteroclitus*. **Am. J. Physiol.** 238, R185-R198.
15. KARNAKY, K.J., DEGNAN, K.J. Y ZADUNAISKY, J.A. 1977. Chloride transport across isolated opercular epithelium of killifish: A membrane rich in chloride cells. **Science.** 195, 203-205.
16. KARNAKY, K.J. Y KINTER, W.B. 1977. Killifish opercular skin: a flat epithelium with a high density of chloride cells. **J. Exp. Zool.** 199, 355-364.
17. KATSUDAS, L.M. 1994. **Cambios en la estructura fina de las células de cloro y prolactina en *Dormitator latifrons* R. (Pisces: Eleotridae) durante adaptación osmótica**. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José. 185 pp.
18. LUNA, L.G. 1968. **Manual of histologic staining methods of the Armed Force**

- Institute of Pathology**. 3 Edición. Auklan: McGraw-Hill. 258 pp.
19. MARSHALL, W.S. 1976. Effects of hypophysectomy and ovine prolactin on the epithelial mucus-secreting cells of the Pacific staghorn sculpin, *Leptocottus armatus* (Teleostei: Cottidae). **Can. J. Zool.** 54, 1604-1609.
  20. MALLATT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 42, 630-648.
  21. PERRY, S.F. y LAURENT, P. 1989. Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: Contribution of the branchial chloride cell. **J. exp. Biol.** 147, 147-168.
  22. ROB, A.P. 1982. Histological observation on the reproductive biology of haddock, *Malanogrammus aeglefinus* (L.) **J. Fish Biol.** 20, 397-408.
  23. SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1979. **Biometría**. 1ra. Edición. Madrid: H. Blume Ediciones. 832 pp.
  24. USSING, H.H. y ZERAHN, K. 1951. Active transport of sodium as source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. **Acta Physiol. Scand.** 23, 110-127.
  25. VILLARREAL, C.A. 1983. **The role of light and endocrine factors in the development of bimodality of growth in the juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.)**. Tesis Doctoral. Departamento de Biología. Universidad de Stirling, Escocia.
  26. VILLARREAL, C.A., KATSUDAS, L.M. y HERRERA, M.E.. 1996. Histofisiología de la adenohipofisis del guapote, *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae): Estudio microscópico. **Scientia (Panamá)** 11 (2), 187-226.
  27. VILLARREAL, C.A., LÓPEZ, M.A., DE VINCENTTI, F., FANILLA, E. DE y BERROCAL, D.G. 1986. Adaptación osmótica del góbido eurihalino *Dormitator latifrons* (Richardson). **Scientia (Panamá)** 1, 9-15.
  28. VILLARREAL, C.A., LÓPEZ, M.A. DE, VALDÉS, E.A., BERROCAL, D.G. y HERRERA, M.E. 1993. Respuestas osmoadaptativas de guapote, *Dormitator latifrons* (Richardson, 1837) durante la transferencia directa hacia y desde agua de mar. **Revista Universidad IV Epoca** No.48, 69-78.
  29. VILLARREAL, C.A. y VALDÉS, E. 1995. Efecto estresante del metanosulfonato de tricaina (MS-222) en estudios fisiológicos del *Dormitator latifrons* (Richardson, 1837). **Informe Final VIP**. Universidad de Panamá, Panamá. 42 pp.
  30. WENDELAAR BONGA, S.E. 1978. The effects of change in external, sodium, calcium and magnesium concentrations on prolactin cells, skin, and plasma electrolytes of *Gasterosteus aculeatus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 34, 265-275.
  31. ZADUNAISKY, J.A. 1984a. The chloride cell: The active transport of chloride and the paracellular pathways. **En: Fish Physiology**. Eds: W.S. Hoar y D.J. Randall. Vol. 10B, p. 129-172. New York: Academic Press.
  32. ZADUNAISKY, J.A. 1984b. Chloride secretion by chloride cells of the isolated opercular epithelium of marine fish. **En: Lectures Notes on Coastal and Estuarine Studies**. Eds: R. T. Barber, Ch. N. K. Mooers, M. J. Bowman y B. Zeitzschel. Vol 9. (Osmoregulation in Estuarine and Marine Animals) pp. 51-65.
  33. ZADUNAISKY, J.A., CURCI, S., SCHETTINO, T., Y SCHEIDE, J.I. 1988. Intracellular voltage recordings in the opercular epithelium of *Fundulus heteroclitus*. **J. Exp. Zool.** 247, 126-130.