



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTALES,
FISIOLÓGICOS Y MORFOLÓGICOS DE EXPOSICIÓN AL
CADMIO EN PECES PAMPEANOS**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Área Ciencias Biológicas

Bettina Lorena Eissa

Director: Dr. Alfredo Salibián
Consejera de Estudios: Dra. Graciela Esnal

Lugar de trabajo: Programa de Ecofisiología Aplicada
Departamento de Ciencias Básicas – Universidad Nacional de Luján

Buenos Aires, Octubre de 2008

Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al Cadmio en peces pampeanos

Se analizó la alteración de algunos biomarcadores comportamentales, morfológicos y fisiológicos de exposición en tres teleósteos, uno cosmopolita (*Cyprinus carpio*) y dos nativos (*Australoheros facetum* y *Astyanax fasciatus*) por exposición a Cadmio subletal.

En *Cyprinus carpio* y *Australoheros facetum* se registró una alteración inmediata en la Actividad Natatoria; *Astyanax fasciatus* presentó una respuesta tardía; hubieron cambios en las tres especies en las Preferencias Espaciales y la Velocidad de Natación.

La estructura de las branquias (MEB) resultó alterada, especialmente el epitelio de las lamelas; algunos de los efectos fueron reversibles.

El Cadmio provocó disminución en la Ingesta de Alimento y la Producción de Heces, con aumento en la Asimilación. Las Tasas Metabólicas y la Eficiencia de Extracción de Oxígeno exhibieron respuestas distintas según la concentración; el Campo de Crecimiento disminuyó.

Los parámetros estudiados pueden ser utilizados como Biomarcadores de efecto subletal en peces. Sus alteraciones revisten importancia ecológica por estar involucrados en su *fitness* ambiental.

Se presentan evidencias que indican que las especies nativas son aptas en los *tests* de evaluación de calidad ecotoxicológica acuática; se realizaron estudios complementarios orientados a determinar correlaciones entre la composición química de muestras ambientales (río Luján) y los cambios en los biomarcadores analizados.

Palabras clave: peces - teleósteos dulceacuícolas - *Cyprinus carpio* - *Australoheros facetum* - *Astyanax fasciatus* - Cadmio subletal - biomarcadores comportamentales - actividad natatoria - preferencias espaciales - velocidad de natación - efectos fisiológicos - alteraciones morfológicas - río Luján

Behavioral, physiological and morphological biomarkers of Cadmium exposition in Pampean fish

Alteration of some behavioral, morphological and physiological exposure biomarkers caused by exposure to sublethal cadmium was analyzed in three teleosts, one cosmopolitan (*Cyprinus carpio*) and two natives (*Australoheros facetum* and *Astyanax fasciatus*)

Cyprinus carpio y *Australoheros facetum* showed an immediate alteration in the swimming activity while *Astyanax fasciatus* showed a late response. The three species showed changes in Spatial Preferences and Swimming velocity

The structure of the gills (MEB) was altered, specially in the epithelium of lamellae; some of the effects were reversible.

Cadmium caused a decrease in Food Consumption and Production of Feces and an increase in Assimilation. Metabolic Rates and Efficiency of Oxygen Extraction varied with different concentrations; Growth Field decreased.

The parameters studied can be used as biomarkers of lethal effect to fishes. Changes in these parameters are of ecological importance due to their involvement in environmental *fitness*.

Evidences indicating that native species are adequate for the tests of ecotoxicology and water quality assessment are presented. Complementary studies to determine correlations between chemical composition of environmental samples (Luján river) and changes in the analyzed biomarkers were conducted

Key words.: fishes- freshwater teleosts – *Cyprinus carpio* – *Australoheros facetum* – *Astyanax fasciatus* – sublethal cadmium– behavioral biomarkers – swimming activity–spatial preferences–swimming velocity– physiological effects– morphological alterations– Luján river

Agradecimientos

A la CIC y el CONICET por las becas que me permitieron dedicarme 100% al desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Luján en la cual se desarrolló este trabajo.

A mi Director, el Dr. Alfredo Salibián, por las enseñanzas, la paciencia, las innumerables lecturas de esta tesis, por las críticas y los consejos y por haber sido para mí una auténtica guía y modelo a seguir.

A mi Codirectora de Beca la Dra. Lucrecia Ferrari por la ayuda, la guía y por compartir largas horas de estadística.

A mis compañeros del PRODEA: Adonis, Patricia, Fernando, Martina, Anabella, Natalia, Carolina, Paola y Paula por el apoyo, el compañerismo, el buen humor y el ambiente de trabajo ameno que crearon.

A mis compañeros de química Elena, Oscar, Diana, Sergio, Daniel, Martín, Mauricio y Matías por el aliento y el apoyo que me dieron durante la redacción de esta tesis.

A mi “jefecito” Roberto Díaz que me abrió las puertas de la UNLu, me ayudó, me alentó y fue también una auténtica guía.

A mi familia. Mis papas Noemí y José, por TODO. Mi Hermano Sergio porque siempre me alentó y pasó a ser una gran amigo.

A mi otra familia: Marta, Oscar, Leandro y Luciano, porque los quiero como propios.

A mis cuñaditas Cecilia y Valeria por la buena onda y el cariño que siempre me demostraron.

A mis princesas (por orden de aparición) Mercedes, Iara y Anastasia.

A los amores de mi vida Felipe y Juliana, y a Emiliano por acompañarme largos fines de semana de muestreo, por apoyarme, alentarme y nunca dudar de que lo lograría.

A mis padrinos y tíos Horacio, Estela, Isabel y Tony por acompañarme en todos los pasos de mi vida.

A mi amigo Sergio Hula por el buen humor y la impresión de las fotos.

A mis grandes amigas Anita y Jorgelina, compañeras de la Facu y compañeras de camino.

A Horacio García, los muchachos de ExClé y Sebastián de Jesús quienes son los autores técnicos del aparato de muestreo.

A Mariela, Paula, Juan Pablo y Mauricio por la ayuda que me dieron en la parte experimental y en la compaginación del video de los peces.

Y finalmente y como dijo mi amigo el Dr. de la Torre, a los pobres ejemplares de carpas, chanchitas y mojarras que me prestaron su ayuda involuntaria para hacer posible este trabajo.

Indice

Resumen	2
Agradecimientos	4
Introducción	6
Los organismos y el medio ambiente	7
Los ecosistemas acuáticos	10
Biomarcadores de contaminación	15
Biomarcadores de contaminación acuática	19
El comportamiento de los animales	20
La toxicología comportamental	21
Toxicología comportamental de peces	27
Metales pesados	28
Interacción de los metales con las membranas	30
El Cadmio	34
Características generales	34
Fuentes del Cadmio ambiental	35
Transporte y distribución	35
Cinética y metabolismo	36
Eliminación	37
Bioacumulación	37
El Cadmio en el medio acuático	38
Principales efectos del Cadmio sobre los peces	39
Efectos del Cadmio sobre el comportamiento	39
Efectos del Cadmio sobre la morfología de branquias	41
Efectos del Cadmio sobre el metabolismo	45
Hipótesis	50
Objetivos	51
Objetivos generales	51
Objetivos y finalidades específicos	52
Materiales y métodos	54
Organismos test	55
Morfometría de peces	58
Parámetros fisicoquímicos del agua: métodos analíticos	58
Biomarcadores Comportamentales	59
Descripción del equipo de registros	59
Diseño experimental	62
Condiciones experimentales	58
Parámetros comportamentales evaluados	66
Registros múltiples simultáneos	68
Biomarcadores Morfológicos	70
Factor de condición	70
Microscopía electrónica de branquias	70
Biomarcadores Fisiológicos	71
Diseño experimental	71
Parámetros fisiológicos evaluados	74
Análisis estadísticos	77

Resultados	79
Parámetros fisicoquímicos de los medios	80
Parámetros comportamentales	81
Actividad natatoria total	81
Preferencias espaciales	85
Preferencias altitudinales	85
Preferencias laterales	92
Velocidad de natación y distancia de recorrido	100
Espectros temporales de movimiento	103
Registros múltiples de síndromes de toxicidad	106
Parámetros morfológicos	108
Factor de condición	108
Microscopía electrónica de barrido (MEB) de branquias	108
Parámetros fisiológicos	124
Ingesta de alimento	124
Producción de heces	127
Eficiencia de asimilación	130
Asimilación neta	132
Tasa metabólica	135
Eficiencia de extracción de oxígeno	136
Cociente de amonio	137
Campo de crecimiento	137
Superficies de respuesta	138
Discusión	144
Anexo I: Efectos del agua del Río Luján sobre la natación	165
Introducción y Objetivos	165
Características físicas generales del Río Luján	165
Impacto de la contaminación en la calidad de agua del río	166
Materiales y métodos	167
Organismo test	167
Diseño experimental	167
Parámetros comportamentales evaluados	169
Parámetros morfológicos: microscopía electrónica de branquias	170
Resultados	170
Parámetros fisicoquímicos medidos en el laboratorio	170
Muestreos de Invierno	170
Muestreos de Primavera	171
Muestreos de Verano	172
Parámetros comportamentales	173
Actividad Natatoria	173
Preferencia altitudinal	175
Preferencia lateral	177
Parámetros morfológicos	179
Discusión	185
Anexo II: Métodos Analíticos	188
Anexo III Registros Múltiples de los síndromes de toxicidad	193
Bibliografía	194

Introducción

Los organismos y el ambiente:

Arthur Tansley (en 1935) acuñó el término *ecosistema* para definir a los componentes bióticos y abióticos de un sistema ecológico considerados como un todo interactuando entre si y con su entorno físico-químico y, a su vez, contribuyen a su mantenimiento. En los ecosistemas siempre se cumple que existe:

- un *flujo abierto de energía* que, desde el sol, va de unos organismos a otros,
- un *ciclo cerrado de materia* desde el medio abiótico a los seres vivos, que luego se mineralizan por acción de los descomponedores que actúan sobre sus deyecciones y restos.

Dentro del ecosistema la energía fluye formando una pirámide energética, de forma tal que a los niveles tróficos superiores llega menos energía debido a que en cada uno de los anteriores, una parte de la energía recibida se disipa en forma de trabajo (realizado por los organismos) y calor (por las transformaciones químicas).

El flujo de materia y energía es continuo: los diferentes elementos químicos pasan del suelo, el agua o el aire a los organismos y de unos seres vivos a otros; estos procesos se integran en modelos conocidos como *ciclos biogeoquímicos* (Miller, 1994).

Debido a estas características estructurales y funcionales, el ecosistema mantiene un equilibrio estable mediante mecanismos reguladores que se oponen a su tendencia espontánea al desequilibrio. Un sistema es *estable* si, desviado de su estado estacionario, puede volver a su condición original. Pero si la perturbación persiste un tiempo relativamente prolongado, el sistema se aleja de su estado estable. Los cambios que no están previstos en los operadores internos del sistema (por ejemplo, cambios ambientales irregulares) pueden llevar al ecosistema a situaciones diferentes de las “normales”. Si dichas perturbaciones dejan de operar, el ecosistema es capaz de volver a recuperar una situación de equilibrio, igual a la primitiva o ligeramente diferente (Margalef, 1991). Dicha tendencia se llama equilibrio de la naturaleza u *homeostasis del ecosistema*

(Smith y Smith, 2001). Las condiciones ambientales en las que la homeostasis se mantiene estable, tienen límites precisos.

Dentro de este marco, Ramón Margalef (1977) clasificó a los ecosistemas en dos grupos:

Ecosistemas adaptables: sistemas estables que toman continuamente información de su entorno, la incorporan, la procesan y cambian en consecuencia.

Ecosistemas conservativos: sistemas estables que han recibido y heredado toda la información disponible y necesaria; nada nuevo ocurre para lo que su organización no está preparada.

Todos los seres vivos están en constante interacción con su ambiente ya sea para procurar los recursos que les son esenciales o las condiciones ambientales adecuadas para su supervivencia. Cuando un organismo puede sobrevivir, crecer y reproducirse en determinadas condiciones ambientales, a pesar de que ciertos factores de cambio siguen actuando, se dice que está *adaptado* a ese ambiente.

Además, los seres vivos tienen la capacidad de mantener su medio interno constante, dentro de ciertos límites en un ambiente físico cambiante. Para ello también requieren del intercambio continuo de energía y materia (entre ellos y con su ambiente físico-químico externo).

La capacidad de los organismos para mantener la constancia o estabilidad de sus parámetros internos esenciales, en un rango de cambios que pueden tolerar, sin alterar su funcionalismo, también se llama *homeostasis* (Willmer y col, 2000).

Lo antedicho pone en evidencia similitudes funcionales en dos sistemas (ecosistemas y organismos) cuyas diferencias son grados de complejidad pero ambos poseen mecanismos regulatorios que contribuyen a mantener su homeostasis.

La presencia de sustancias tóxicas es uno de los factores externos, entre otros, que pueden provocar alteraciones en diverso grado de la homeostasis de los organismos (y, a largo plazo, de los ecosistemas).

En la Figura 1 se representa la respuesta hipotética de un organismo expuesto a un tóxico. Se observa que algunas de las variables, (por ejemplo, fisiológicas, bioquímicas o comportamentales) pueden presentar niveles compatibles con los límites de su *homeostasis* o normalidad. Es importante distinguir el punto en el que los valores (respuestas) se alejan del nivel de normalidad: el organismo presentará entonces, según la magnitud del desvío, un daño, reversible o irreversible, dependiendo de factores tales como la concentración del tóxico, tiempo de exposición, de su esencialidad, etc.

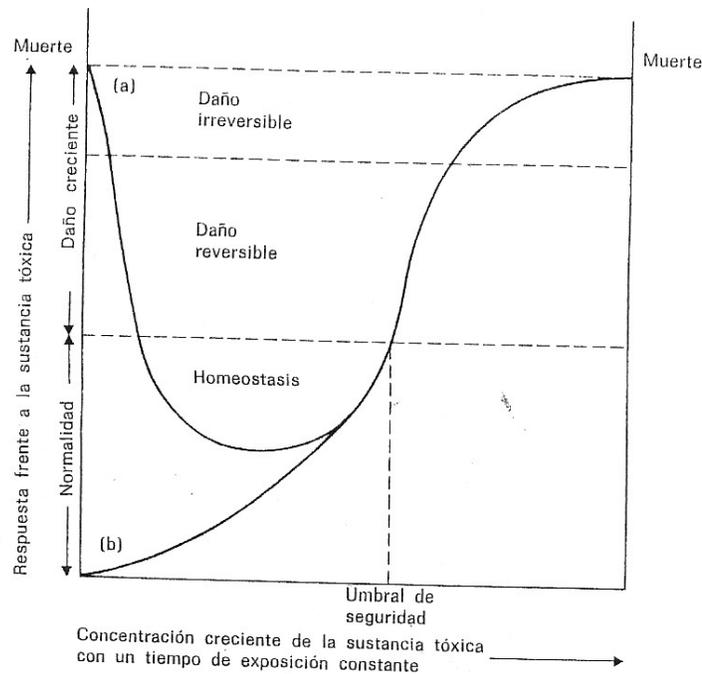


Figura 1: Relación entre los efectos observados y la concentración de un tóxico: (a) efectos observados de una sustancia esencial para la vida a bajas concentraciones; (b) efectos de una sustancia no esencial o tóxica (de Duffus JM, 1983).

Se conocen varios mecanismos de control (o regulación) de las funciones fisiológicas. En cualquiera de ellos, la variable controlada es la propiedad que se mantiene constante o relativamente constante. El punto crítico es el nivel en el que la variable debe mantenerse. Cuando la misma se aleja de ese punto, se ponen en funcionamiento mecanismos que la retornan a su valor basal. Entre dichos mecanismos se encuentra la *Retroalimentación negativa* que genera una acción correctiva en la dirección opuesta al desvío. Este comportamiento es propio de la *aclimatación* que, a su vez, es la expresión de la plasticidad fenotípica de los individuos en respuesta a un cambio subletal en algún factor ambiental (Willmer y col, 2005).

La *Retroalimentación positiva*, en cambio, es un mecanismo que acentúa las desviaciones de una variable controlada a partir del punto crítico. Un ejemplo de este mecanismo es el impulso nervioso, ya que los efectos de la retroalimentación positiva están limitados por la inactivación dependiente del tiempo de los canales de sodio. La rapidez de la elevación del potencial de acción se debe, en gran medida, a las propiedades de retroalimentación positiva del ciclo Hodgkin (Hill y col, 2004).

En los ecosistemas, el equilibrio establecido entre las poblaciones de presa y predador, es la causa de su propia supervivencia. Este es un mecanismo o sistema recurrente estabilizador de *retroalimentación negativa*. Pero si se llegase a superar uno de los límites máximos o mínimos en la abundancia de una de las dos especies, ambas entran en un proceso acelerado de desaparición (*retroalimentación positiva*).

Los ecosistemas acuáticos:

El agua no se distribuye uniformemente en la naturaleza. Más del 97% de toda el agua disponible reside en los océanos. Otros reservorios son las capas de hielo, glaciares, casquetes polares, aguas subterráneas, lagos, ríos, vapor en la atmósfera y el agua presente en los organismos vivos (Ricklefs, 1998; UNESCO, 2006). Existe en distintos compartimentos, vinculados entre si, con volúmenes y tiempos de residencia muy distintos. La interdependencia y relación de los

compartimentos del ciclo hídrico se establece a través de una dinámica de factores tales como lluvia, evaporación, evapotranspiración, humedad de los suelos, agua superficial y subterránea, y aguas costeras y marinas. Aunque una fracción del agua interviene en la fotosíntesis, la mayor parte del movimiento de agua a través del ecosistema ocurre por procesos físicos (evaporación, evapotranspiración y precipitación). La energía lumínica contribuye a la evaporación del agua. La condensación del vapor de agua atmosférico para formar nubes libera la energía potencial como calor.

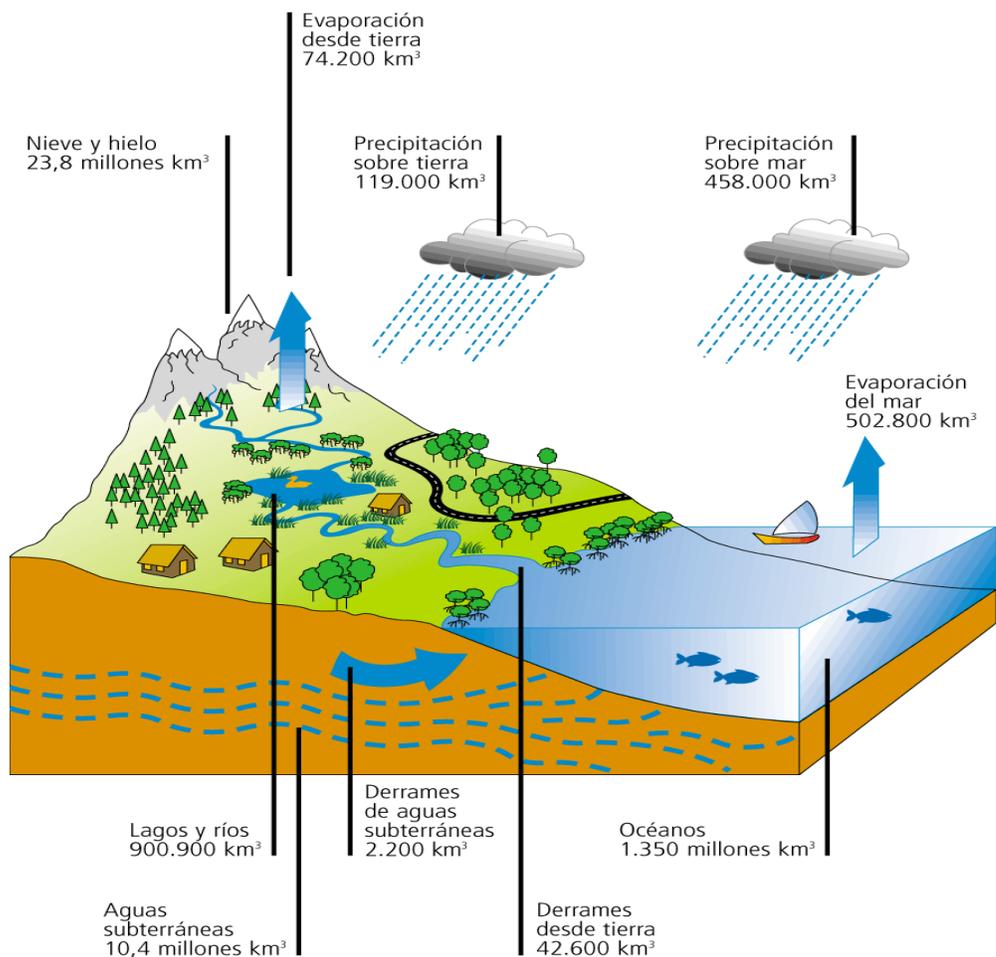


Figura 2: Descripción general del ciclo hidrológico con sus principales componentes. Se indica el volumen de cada compartimento.

Aunque una buena parte del agua dulce está “almacenada”, es muy importante evaluar los flujos renovables anuales de agua teniendo en cuenta dónde y cómo se desplazan a lo largo del Ciclo Hidrológico (Figura 2). *Este esquema del Ciclo es un modelo conceptual nacido de la Ecohidrología, una nueva disciplina que hace hincapié en las relaciones y fases más importantes que comparten los sistemas hidrológicos y ecológicos* (Naciones Unidas, 2007).

En muchos casos una cuenca hidrográfica superficial abarca varias subterráneas, o bien una cuenca subterránea puede tener superpuestas dos o más cuencas hidrográficas (Kruse y col, 2003).

En las cuencas hidrográficas podemos señalar dos localizaciones del agua vinculadas: a) Aguas superficiales: esorrentía, manantiales, arroyos, ríos, canales artificiales, lagos, lagunas y embalses; b) Aguas subterráneas: freáticas, artesianas y lagos subterráneos.

“Las aguas continentales actúan como una cinta transportadora de la que pretendemos extraer agua limpia y a la que añadimos sustancias muy diversas”.

El río planetario. Ramón Margalef (1994)

La dinámica de un ecosistema acuático depende, en primer lugar, de las características físico químicas del agua que, a su vez, se ven influenciadas entre otros factores por la composición química del sustrato geológico y de los diferentes componentes de la cuenca y de la vegetación de los ecosistemas terrestres adyacentes. En esos ecosistemas hay una constante incorporación de materia orgánica procedente del aire y de los ecosistemas terrestres. Una fuente de materia orgánica la constituye la lluvia que “lava” las hojas y disuelve exudados ricos en sustancias orgánicas (Smith y Smith, 2001).

La composición química de las aguas superficiales no se puede dissociar de la de los ecosistemas terrestres linderos drenados. Mientras que las aguas oceánicas tienen una composición relativamente uniforme y estable, las aguas continentales, de volumen relativo pequeño y sometidas a influencias divergentes,

muestran un amplio espectro en su composición química que se refleja también en la distribución de las especies en dichos ambientes (Margalef, 1991).

Se puede afirmar que el ecosistema de aguas continentales es uno de los ambientes más afectados por la actividad antrópica ya que es un verdadero “embudo”, el cual, en último término, recibe los contaminantes, naturales y/o xenobióticos, originados en los otros ambientes, afectando su calidad y también a la biota que alberga.

Las fuentes de contaminación de los cuerpos de agua continentales, pueden ser:

- a) Puntuales: cuando la descarga se produce en un punto del medio receptor, en cuya proximidad la concentración del agente contaminante decrece a medida que aumenta la distancia desde el foco [por ejemplo, Kuczynski (1994) ha estudiado el Arroyo Morón, Prov. de Buenos Aires, observando que su curso está muy influenciado por numerosas descargas puntuales urbanas e industriales originadas en la cuenca del mismo. Alsina y Herrero (2000) relevaron en la cuenca del río Reconquista 4200 establecimientos con potencial contaminador].
- b) Difusas: es el caso en que las descargas se producen en varios puntos del cuerpo considerado. Los efectos son más difíciles de detectar inmediatamente [por ejemplo, Giorgi (2000) encontró en la cuenca alta del Río Luján, entre Mercedes y Luján, un alto deterioro debido al aporte por el escurrimiento de nutrientes desde tierra por actividad agropecuaria].

Los términos poluente, contaminante, xenobiótico y estresor tienen diferentes connotaciones, nosotros adoptamos el criterio de Newman y Clements (2008):

- a) *contaminante*: una sustancia liberada al ambiente por acción antrópica, cuya concentración es mayor que la natural;
- b) *xenobiótico*: una sustancia artificial y por tanto no contribuyente de un sistema biológico específico;

- c) *poluente*: una sustancia que se halla presente en el ambiente en parte como resultado de la actividad humana, que tiene efectos deletéreos para los organismos;
- d) *estresor*: sustancia que produce estrés (respuesta de cualquier nivel de organización ecológico a un factor del impacto reciente).

En la Tabla 1 se presentan algunos contaminantes hallados en el medio acuático continental en nuestro país:

Contaminante	Sitio Contaminado	Referencia
Hidrocarburos alifáticos y aromáticos	Río de la Plata (Buenos Aires)	Colombo y col, 2005
Cadmio	Río de la Plata (Buenos Aires)	Verrengia Guerrero y Kesten, 1993
Nitratos	Arroyo El Pantanoso (Cuenca Matanza) (Buenos Aires)	Costa y col, 2002
As	Río Dulce (Santiago del Estero)	Bhattacharya y col, 2006
As, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	Río Reconquista (Buenos Aires)	Topalián y col, 1989
Materia orgánica	Río Salí (Tucumán)	Villagra de Gamundi y col, 1993
Hg	Río Negro (Neuquén)	Arriberé y col, 2003
Cd, Zn, Pb, Cr	Río Paraná (Santa Fé)	Villar y col, 1998
Descargas cloacales	Río Suquía (Córdoba)	Pesce y Wunderlin, 2000

Tabla 1: Ejemplos de contaminantes hallados en cuerpos de agua continental de la Argentina.

En la Tabla 2 se ordenan algunos contaminantes por clases, en función de su peligrosidad, toxicidad y bioacumulación:

Clase	Características	Ejemplos
I	Contaminantes fácilmente biodegradables o comúnmente dotados de una nocividad potencial.	S^{-2} , SO_3^{-2} , SO_4^{-2} , Cl^- , F^- , NH_3 , grasas, aceites vegetales y animales.
II	Contaminantes de acción tóxica retenidos pero no bioacumulables en los ecosistemas acuáticos.	Al, Ba, B, Cr^{3+} , Fe, Mn, Ni, Cu, Sn, Zn, CN^- , Cl^- , PO_4^{-3} , aceites minerales, aldehídos y solventes orgánicos.
III	Contaminantes de acción tóxica y bioacumulables.	As, Cd, Cr^{4+} , Hg, Pb, Se, fenoles PCBs y pesticidas.

Tabla 2: Clasificación de los contaminantes en el medio acuático (de Vismara, 1992).

Biomarcadores de contaminación:

Los efectos subletales de los contaminantes sobre la biota son muy variados (cancerígenos, disruptores endocrinos, hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, estrés oxidativo, etc.); una forma de estudiar estos efectos es mediante el *biomonitoreo*. Este se refiere al uso de organismos como indicadores de cambios en las condiciones ambientales que afectan aspectos particulares de su desarrollo, funciones vitales, etc.

También se pueden utilizar respuestas biológicas determinadas (biomarcadores) evaluadas en organismos y en distintos niveles de complejidad para proveer índices de exposición y estrés. Se denomina *biomarcador* a un cambio observable y/o mensurable a nivel, molecular, bioquímico, celular, fisiológico o comportamental que revela la exposición presente o pasada de un individuo a un poluyente (Depledge, 1994; Porta, 1996; Walker y col, 2006). Los biomarcadores son parámetros que contribuyen al conocimiento de las condiciones en las que se encuentra el organismo. De esa forma las alteraciones detectadas en dichos parámetros devienen en indicadores indirectos del grado de deterioro de un ambiente y brindan la posibilidad de una interpretación causal de

los efectos adversos de los contaminantes ambientales sobre los diferentes niveles de organización de los sistemas ecológicos (Schlenk y col, 2008).

van Gastel y Van Brummelen (1996) redefinieron los términos “*biomarcador*”, “*bioindicador*” e “*indicador ecológico*”. Ellos consideran *biomarcador* a cualquier respuesta biológica a un xenobiótico estudiada en el nivel subindividual, en el medio interno del organismo, en sus productos de excreción (orina, heces), apéndices (pelo, plumas), etc; que indica alguna desviación del estado normal o basal. El *bioindicador* es definido como el organismo que ofrece información sobre las condiciones ambientales. El *indicador ecológico* es un parámetro del ecosistema que describe alteraciones en su estructura y funcionamiento.

El estudio de los cambios debidos a xenobióticos, ya sea individuales o en mezcla, referidos como biomarcadores, son reconocidos como la información vinculante de la exposición con la dosis interna y presentan gran relevancia en el proceso de evaluación de riesgo (WHO, 1993), siendo además complementarios de los análisis químicos propiamente dichos.

Lagadic y colaboradores (1997) han clasificado los biomarcadores como se detalla a continuación:

Biomarcadores de exposición: señalan la interacción entre la molécula y su receptor biológico, indicando que el poluyente presente en el medio penetró en el organismo.

Biomarcadores de efecto: señalan que un individuo, una población o una comunidad presentan signos de cambios adversos debido a uno o mas contaminantes. Permiten demostrar que el xenobiótico penetró en el organismo y se distribuyó en los diferentes tejidos, produciendo un efecto tóxico.

Biomarcadores de sensibilidad: permiten identificar a los individuos más sensibles a los efectos provocados por la exposición al tóxico; resultan de las variaciones genéticas de una población.

Los *Biomarcadores de exposición* pueden ser aptos para confirmar y evaluar la exposición de los individuos a una sustancia particular, proveyendo un nexo entre la exposición externa y la interna. Los de *efecto* permiten documentar tanto alteraciones precoces o efectos adversos sobre la salud, como la exposición externa y la absorción de la sustancia química. Los *Biomarcadores de sensibilidad* contribuyen a explicar las variaciones en el grado de respuesta a la exposición tóxica observada en diferentes individuos de la misma población (van der Oost y col, 2003). La actividad de la ácido- δ -aminolevulinico dehidratasa (ALAD) es un ejemplo de biomarcador de sensibilidad al plomo; la expresión del genotipo de esta enzima puede influir en la distribución y la toxicidad del metal por variaciones en los sitios de su unión en variantes genéticas (ALAD-1 y ALAD-2) (Smith y col, 1995; Weaver y col, 2005).

En la Figura 3 se resumen los pasos y las metodologías que se pueden aplicar en la evaluación del riesgo toxicológico sanitario y ambiental incorporando la utilización de biomarcadores.

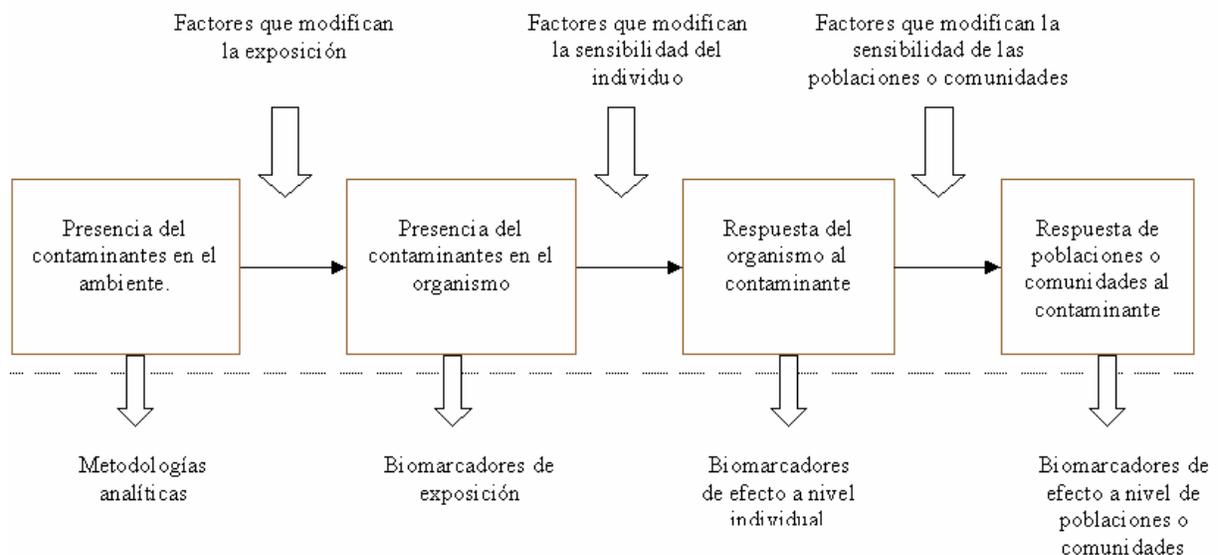


Figura 3: Representación de la utilización de biomarcadores en la evaluación del riesgo toxicológico y ecotoxicológico (de Lagadic y col, 1997).

En la Tabla 3 se presenta una selección de algunos tipos de biomarcadores:

Biomarcador	Respuesta Biológica	Tóxico	Referencia
Alteraciones de DNA			
Fractura de DNA	Fractura de la hélice.	HAPs, Cu,	Sapone y col (2006)
	Formación de micronúcleos.	Trihalometano, Piretroides	Wirz y col (2005) Campana y col (2003)
Formación de aductos		Insecticidas, benzoapireno	Lin y col (2007) Holme y col (2007)
Alteraciones fisiológicas			
Metabolismo	Respiración, alimentación, crecimiento	Al, Ni, Zn, As, Cd, Cu, Pb, Zn	Wilson y col (1994) Alves y col (2006) Schmidt y col (2005)
Alteraciones bioquímicas			
Estrés oxidativo	Aumento en la actividad de acetilcolinesterasa, catalasa, glutatión transferasa, ATPasa	Insecticidas organofosforados	Kavitha y col (2006), Damasio y col (2006) de la Torre y col (2001)
Polimorfismo proteico	Modificación de los sitios de unión de δ -ALAD	Pb	Smith y col (1995) Weaver y col (2005)
Alteraciones comportamentales			
Comportamientos natatorios	Alteración de la velocidad de nado.	Fenol,	Rice y col (1996)
Comportamientos alimentarios		Permetrina,	Strand y col (2007)
Comportamientos reproductivos	Disminución de apetito.	Clorpirifos Microcistina	Gray y col (1999) Cazenave y col (2008)

Tabla 3: Algunos biomarcadores utilizados en el monitoreo ambiental.

Biomarcadores de contaminación acuática:

La presencia de xenobióticos en el agua puede, afectar entre otros organismos, a los peces que se hallan en ese ambiente. En los últimos 35 años se ha acentuado el uso de animales acuáticos, tanto vertebrados como invertebrados, como indicadores precoces de la calidad toxicológica del medio acuático. Los peces fueron uno de los primeros en ser utilizados en los protocolos de monitoreo ecotoxicológico acuático y aún siguen siendo de elección como especies centinela en diversos bioensayos de toxicidad.

Entre los diferentes tipos de biomarcadores, los comportamentales de vertebrados constituyen un grupo de indicadores que concita el interés creciente en estudios de Ecotoxicología Acuática. Los individuos afectados pueden modificar algún aspecto de su comportamiento, el cual puede constituir un *biomarcador de efecto*. Estas respuestas pueden repercutir en niveles superiores de organización como los de población y/o comunidad. Dentro de una población, puede afectarse de manera diferencial la sensibilidad de algunos individuos, lo cual, como se dijo, es debido a variaciones genéticas, las que se pueden evaluar a través de técnicas moleculares específicas.

Ciertamente, la contaminación en ecosistemas acuáticos a menudo se pone de manifiesto con concentraciones de los tóxicos bien por debajo de aquellas que causan mortalidad (Reynders y col, 2006). En este contexto conviene considerar que los *test* de letalidad aguda ignoran lo que se ha denominado “muerte ecológica” (Tortorelli y col., 1990) que puede ocurrir después de exposiciones crónicas a concentraciones subtóxicas de contaminante; aún si los animales son dañados levemente, ellos pueden verse afectados en su adaptación y sobrevivencia en un entorno ecológico modificado por el xenobiótico. De esta manera, un pez al tener dañadas, directa o indirectamente algunas de sus funciones fisiológicas básicas, corre el riesgo de ser fácilmente predado, ser menos eficiente en la provisión de su alimento, reducir su potencial reproductivo, limitar su capacidad de migración y distribución en el ambiente, etc. En otras palabras, los cambios ambientales que producen alteraciones en los patrones de comportamiento normal, causados por diferentes contaminantes, involucran serios

riesgos para el *fitness* de una población.

El comportamiento de los animales

La conducta es un rasgo biológico resultado del proceso de selección natural. La teoría de Darwin postula que el resultado principal de estos procesos es la adaptación biológica. La selección natural favorece rasgos, como los conductuales, que son útiles en la lucha por la supervivencia y la reproducción.

La conducta animal es la resultante de la interacción entre la carga genética, su estructura y fisiología, y también de las características del ambiente. El ambiente es el marco necesario para el desarrollo del comportamiento. Así, la vida de un organismo está estrechamente adaptada a las condiciones físicas y químicas propias de su ambiente y también a las bióticas, es decir a las de su población y de los otros organismos que integran la comunidad de la cual forma parte. En suma, los animales responden ante eventos y variaciones de diverso carácter que pueden ocurrir en su ambiente. En este contexto cada variación guarda un determinado valor respecto a las necesidades del animal y de su supervivencia (Peláez del Hierro y Veà Baró, 1997).

Los tipos de comportamiento pueden clasificarse en dos grandes categorías: individual y social. Los *Comportamientos individuales* incluyen la locomoción, aprendizajes y respuestas condicionadas y conductas alimentarias. Los *Comportamientos sociales* se refieren a las interacciones predador-presa, estrategias de agresión, territorialidad y jerarquías, y reproducción (cortejo, cuidado parental, desove).

La Toxicología comportamental.¹

El comportamiento sirve como un nexo entre los procesos fisiológicos y ecológicos, siendo un parámetro ideal para estudiar los efectos adversos de los contaminantes en ambientes naturales o en condiciones de laboratorio (Dell’Omo, 2002; Gilmour y col, 2005).

Desde la perspectiva toxicológica, el estudio del comportamiento contempla observaciones que pueden ser cuantificadas objetiva y rápidamente. Teóricamente cualquier patrón comportamental de un animal puede servir para un *test* toxicológico, pero en la práctica, los experimentos son más confiables si se focalizan en un aspecto específico. Esto se debe a que algunos de dichos patrones pueden ser restringidos temporalmente (cortejo y reproducción) y/o difíciles de ser monitoreados en un *test* de laboratorio porque se ponen de manifiesto en una etapa definida del ciclo de vida, en alguna estación particular del año o en algún momento del día (por ejemplo comportamientos de cortejo que solo ocurren durante la noche).

Los bioensayos comportamentales con organismos acuáticos se han diseñado considerando indicadores de toxicidad *individuales* e *interespecíficos* (también conocidos como *comportamientos sociales*):

a. Comportamientos individuales:

- Respuestas locomotoras (de tipo preferencia/rechazo) y cambios en la actividad (Drummond y Russom, 1989; Svecevicus, 1999).
- Aprendizaje y retención de comportamientos condicionados.
- Comportamientos de alimentación (Wendelaar Bonga, 1997).
- Selección de ambientes por su perfil fisicoquímico (por ejemplo concentración de oxígeno y temperatura).
- Respuestas ventilatorias (movimientos operculares y bucales).
- Natación: alteración de la velocidad y dirección de nado, pérdida de equilibrio, etc (Vogl y col, 1999).

¹ En un trabajo anterior (Eissa y col, 2000) hemos acuñado para este aspecto de la Toxicología el término *Etotoxicología*.

b. *Comportamientos sociales:*

- Interacciones predador-presa (Beitinger, 1990)
- Relaciones sociales (agresión, territorialidad, jerarquías),
- Comportamientos reproductivos (cortejo, cuidado parental, desove).
- Señales de alarma.

Estos comportamientos también se identifican como *respuestas primarias* a las que siguen las *respuestas secundarias* o fisiológicas.

En la Figura 4 se esquematiza el circuito de eventos que un estímulo ambiental puede desencadenar en un organismo hasta que se generan respuestas comportamentales (o primarias) y fisiológicas (o secundarias).

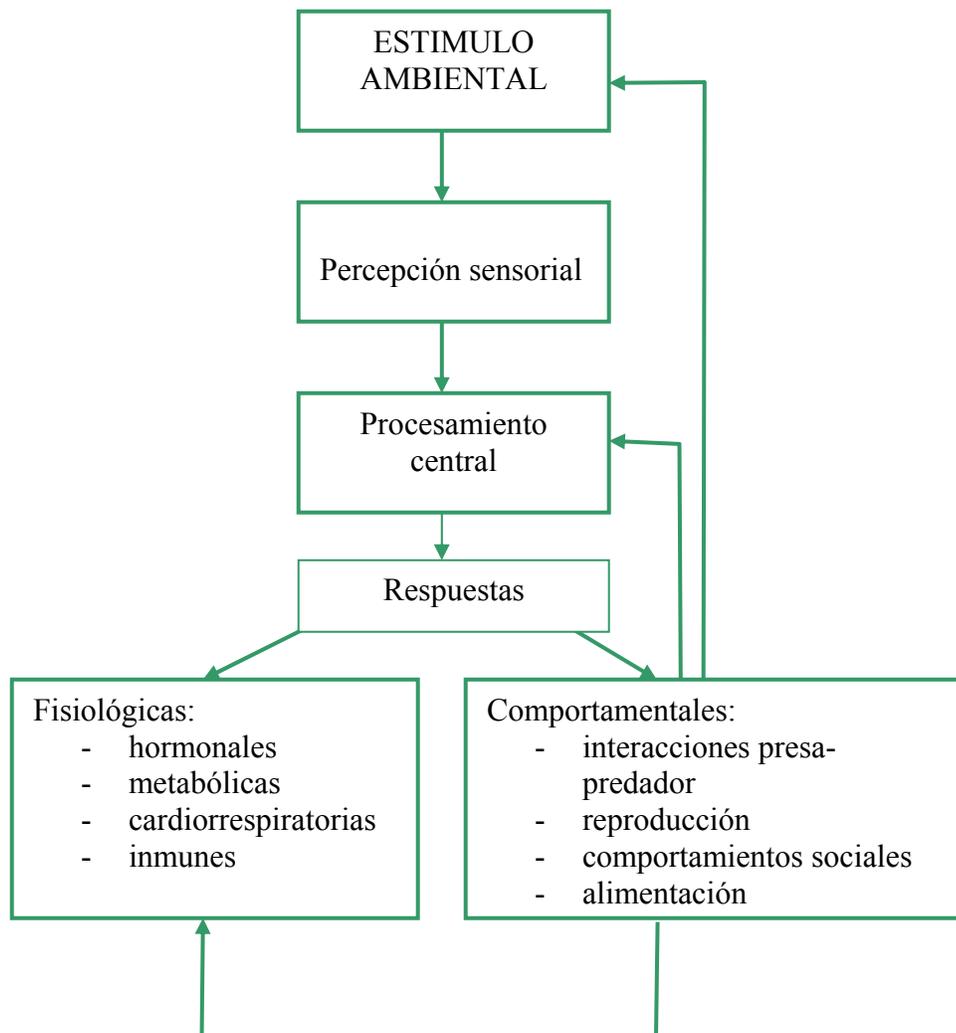


Figura 4. Interrelaciones de factores ambientales y fisiológicos y su influencia en la *performance* del comportamiento normal (de Scott y Sloman, 2004).

Además, el comportamiento juega un importante papel en la selección del hábitat, de manera tal que un organismo en un medio contaminado puede encontrarse restringido a una parte del ambiente cuyos parámetros estén dentro del rango de su tolerancia homeostática.

Siendo que el comportamiento está sujeto a la selección natural, se podrían seleccionar los tipos de conductas que favorecerían la adaptación del animal al estrés ambiental.

En el área que nos interesa, se entiende por *estrés* al estado producido por un factor ambiental que lleva los niveles de las respuestas adaptativas del animal a valores diferentes de los de sus límites homeostáticos de tolerancia, por lo que su probabilidad de sobrevivir se verá reducida (Hugget, 1992).

El comportamiento animal juega un rol dual en la respuesta frente al estrés. Por un lado, puede permitir evitar estímulos peligrosos mientras que por el otro, en nuestro contexto toxicológico, es un atributo bioindicador que pone en evidencia el grado de estrés ambiental en el que se encuentra el animal (Beitinger, 1990).

El término *medio interno* se refiere al conjunto de las condiciones (temperatura, pH, concentración de iones, etc.) de las células del animal. Las condiciones exteriores representan el *medio externo* (Hill y col, 2004). En general, cuando un animal confronta cambios ambientales, puede responder: mediante a) mecanismos conformadores y b) mecanismos de regulación (por retroalimentación), con respuestas adaptativas de diferente carácter (comportamentales, fisiológicos, bioquímicos, etc.) (Randall y col, 2002). Como consecuencia de los primeros el perfil fisicoquímico del medio interno se hace similar al externo; los segundos son propios de los animales que mantienen la constancia interna independientemente de los cambios externos.

Además, cuando los contaminantes alcanzan hábitats acuáticos afectan a la biota de esos ambientes en grado variable (según su sensibilidad, edad, sexo, estado nutricional, etc.), pudiendo desencadenar algunas alteraciones conductuales inmediatas, que se las considera como biomarcadores precoces de exposición. Esos *efectos directos* varían con el grado y duración de la exposición. Por otra parte, los individuos de la comunidad biótica de un ambiente particular, considerados en su conjunto, a menudo exhiben un amplio rango de tolerancia a los contaminantes, debido a que un tóxico a una cierta concentración puede provocar un efecto letal o subletal en una especie en particular, pero no causar efectos observables en otra que comparte el mismo hábitat.

Los contaminantes en el medio acuático pueden también ejercer *efectos indirectos* en las especies tolerantes. Por ejemplo, la influencia directa de

contaminantes en las interacciones predador-presa puede desencadenar una cascada de efectos indirectos en especies de otro nivel trófico.

Por extensión, las poblaciones y las comunidades acuáticas pueden llevar a ser, directa o indirectamente, afectadas por la exposición a contaminantes (Fleeger y col, 2003).

Los ambientes acuáticos contaminados plantean serios riesgos para muchos organismos que pueden verse afectados en forma simultánea o secuencial. Diversos investigadores han procurado entender los efectos de los tóxicos sobre la fisiología y la supervivencia de las especies, implementar guías regulatorias para ambientes polucionados y establecer criterios de prevención sobre la base de niveles máximos permisibles de contaminantes. Para tal fin se ha recurrido tradicionalmente a: a) *tests de toxicidad aguda*, los cuales están diseñados para evaluar la toxicidad de varias concentraciones de una sustancia para organismos acuáticos en un tiempo de exposición corto, y cuyos resultados se cuantifican con diversas expresiones, tales como la CL50 y EC50 y b) *test de toxicidad crónica* que permiten evaluar los posibles efectos adversos de concentraciones subletales de compuestos químicos a una exposición de larga duración; los resultados se expresan como MATC, NOEC y LOEC. El impacto en diferentes aspectos referidos al desarrollo, regulación endocrina, crecimiento y reproducción (entre otros) también han sido considerados como parámetros alternativos aptos como puntos finales (*endpoints*) para determinar la calidad toxicológica del medio acuático mediante bioensayos (Rand, 1995; Díaz Báez y col, 2004).

Al respecto, cabe señalar que recientemente se han criticado las extrapolaciones y comparaciones que se realizan en base a los valores de dichas expresiones, determinadas en condiciones “fijas” o estándar y cuánticas (vivos/muertos), sin tener en cuenta la influencia de otras variables (duración de la exposición, tasa de transporte y bioacumulación, relación área/volumen); estas objeciones han generado propuestas para otras expresiones cuantitativas de la ecotoxicidad basadas en el concepto de residuos corporales críticos (o Teoría del Balance energético dinámico – DEBtox) (Pager y col, 2006), expresando los

resultados como NEC (*no effect concentration*).

Los *tests* de toxicidad son usados para determinar las concentraciones de las sustancias químicas y la duración de la exposición requerida para producir los efectos adversos en los organismos. Estos *test* representan una metodología estandarizada y reproducible para la comprensión de los principios toxicológicos anteriormente mencionados. Los estudios de laboratorio de toxicidad acuática se enfocan hacia los efectos tóxicos directos, los orientados a campo incluyen consideraciones sobre efectos indirectos y cambios en comunidades y poblaciones expresados a menudo en forma de índices biológicos.

Otro enfoque alternativo es el estudio de ecosistemas experimentales mediante el cual se exponen poblaciones de dos o más especies (frecuentemente representando distintos niveles tróficos) en forma conjunta al poluyente o tóxico a evaluar. Estos ecosistemas experimentales varían en escala y complejidad. Los sistemas a escala pequeña (*microcosmos*) ofrecen la ventaja de un control más preciso de las condiciones experimentales, mientras que aquellos realizados a escala mayor (*mesocosmos*) simulan con mayor aproximación a los sistemas naturales pero presentan el inconveniente de que sus resultados son difíciles de reproducir. Otras modificaciones de estos modelos que son frecuentemente utilizadas son los *limnocorrales* en los que se aísla una porción del ambiente y los sistemas en donde el agua de un río abastece continuamente al sistema en estudio (ríos artificiales).

Lo más frecuente es que en los ambientes acuáticos ocurran eventos de contaminación crónicos o subletales, a partir de una fuente no puntual (o difusa) asociada. Por eso se ha sugerido que el diseño y aplicación de técnicas de estudio del comportamiento podrían ser más sensibles y, consecuentemente generar resultados más versátiles y realistas que los alcanzados mediante métodos toxicológicos basados en criterios de letalidad (Birge y col., 1993; Rand, 1995; Scott y Sloman, 2004).

Toxicología Comportamental de peces

El ciclo de vida de los peces está íntimamente relacionado con numerosas interacciones interespecíficas (comunidades) e intraespecíficas (poblaciones), las cuales invariablemente dependen de la *performance* de comportamientos “apropiados”. Como tales, las interacciones comportamentales asociadas con el escape a predadores, la reproducción, los comportamientos sociales, entre otras, juegan un rol importante en el éxito del individuo y en sus estrategias de adaptación.

El comportamiento de los peces es una excelente herramienta para estudios toxicológicos, ya que puede proveer modelos ecológicamente relevantes y fácilmente observables y cuantificables en un *set* experimental controlado. La *performance* del comportamiento natatorio normal de los peces resulta de una secuencia de eventos fisiológicos específicos, los cuales son activados por estímulos externos actuando en un par de neuronas (sólo presentes en peces) ubicadas en el bulbo raquídeo denominadas *Neuronas Gigantes de Mauthner*, que son responsables de la coordinación de los movimientos natatorios y del reflejo de huída (Hill y col, 2004). Es probable que la disrupción de esas secuencias se manifieste primero en alteraciones comportamentales.

Se han hecho numerosos estudios de la *performance* de nado en peces que han demostrado ser útiles como indicadores de *estrés toxicológico* subletal. Aunque diferentes *performances* de nado pueden ser descriptas cuantitativamente, la medida más frecuentemente usada es la *velocidad de nado crítica* (Kolok y col, 1998; Plant, 2001; Nelson y col, 2002) que se calcula según la fórmula:

$$U_{crit} = U_i + (T_i/T_{ii} \times U_{ii}) \quad [1]$$

Donde:

U_{crit} : velocidad de nado crítica (cm/s); U_i : mayor velocidad mantenida por 5 minutos; T_i : tiempo de fatiga en la última velocidad de corriente (min); T_{ii} : intervalo de U_i (5 min); U_{ii} : incremento en la velocidad (5 cm/s)

Los bioensayos de toxicidad realizados con peces cuyos puntos finales son parámetros del comportamiento permiten determinar si un estresor ambiental desencadena un cambio adverso por exceder el rango normal de variabilidad tolerada de dicho parámetro (u homeostasis) y si, por extensión, puede afectar algún aspecto fisiológico crítico (supervivencia, crecimiento, reproducción, etc.) (Beitinger, 1990). Drummond y col (1986) estudiaron el efecto de 139 compuestos químicos sobre una serie de comportamientos relacionados con el equilibrio, la locomoción, comportamientos sociales, movimientos corporales, patrones de ventilación, etc. de *Pimephales promelas* encontrando que los comportamientos sociales y de aprendizaje eran sensibles frente al 96% de los tóxicos ensayados. Estos autores concluyeron que seleccionar respuestas comportamentales anormales es una herramienta útil para predecir la acción de un contaminante aún a bajas concentraciones.

Metales pesados

Los seres vivos habitan un entorno de carácter químico, esencialmente inorgánico y a lo largo de la evolución no sólo se adaptaron a él sino que lo utilizan (Baran, 1995). De acuerdo a su abundancia (en los seres humanos) los elementos químicos se ordenan en tres grandes grupos:

Grupo 1: elementos mayoritarios que representan más del 98% del peso corporal; además del C, H, O, y N se incluyen en este grupo Na, K, Mg, Ca, Cl, S y P.

Grupo 2: elementos traza (Fe, Zn y Cu).

Grupo 3: elementos llamados micro-traza o ultra-micro-traza, Mo, I y Co (de esencialidad conocida), Cr, Ni, As y V (su función no está claramente establecida), B y Br (esenciales para ciertas especies) y Li, Cd y Sn (su esencialidad está en discusión).

Desde la perspectiva biológica más básica, Foulkes (2000) agrupó los metales pesados tóxicos en cuatro clases operacionales:

Clase A: esenciales para los sistemas vivientes a concentraciones elevadas (Fe).

Clase B: sin papel biológico conocido y que a bajas concentraciones exhiben baja-nula toxicidad (por ejemplo: La y Sr).

Clase C: esenciales para algunas especies, en cantidades traza; en concentraciones elevadas pueden ser muy tóxicos (por ejemplo: Zn, Cu, Ni, Cr, Co, Mo).

Clase D: tóxicos aún a muy bajas concentraciones y para los cuales no se ha establecido una función inequívoca (Hg, Pb, Cd, Li).

En la Tabla 4 se indican las concentraciones de algunos metales pesados de interés toxicológico en cuerpos de agua “sin contaminación”, los cuales constituirían los valores ambientales “normales” o basales.

Metal	Aguas Continentales	Aguas Oceánicas
Ag	-----	$4 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$
As	0.1-0.5	1.12-1.87
Cd	$5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$ - $1,2 \cdot 10^{-1}$
Co	<1.0	<0.007
Cr	0.1-0.5	$1,6 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-2}$
Cu	0.2-2.0	0.32-0.57
Fe	-----	$1,4 \cdot 10^{-2}$ - $2,8 \cdot 10^{-2}$
Hg	$<1,2 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-3}$
Ni	0.01-1	0.05-0.65
Pb	0.05-0.5	$1 \cdot 10^{-3}$ - $1,5 \cdot 10^{-2}$
Zn	0.5-5.0	0.59-1

Tabla 4: Concentración de algunos metales pesados ($\mu\text{g/ml}$) en aguas continentales y oceánicas (de De Filippis y Pallaghy, 1994)

Estudios realizados en arroyos de la Provincia de Buenos Aires han mostrado variaciones a lo largo de sus cauces en la distribución de algunos metales pesados como Cd, Mn, Fe, Cr, Ni, Cu y Zn; en ciertos casos se han encontrado en concentraciones superiores a las normales (Momo y col, 2003). En

el bajo Paraná y en la costa del Río de la Plata se observaron elevadas concentraciones de Hg, Cr, Pb, Cr, Zn, Hg y Cd (Colombo y col, 1994). En el Río Reconquista se ha reportado concentraciones que han excedido los límites normales de referencia para protección de la vida acuática, en un 47 % los de Cd, 64 % los de Cr y Cu, 20 % el de Pb y 32 % el de Zn (Topalián y col, 1999).

En el marco mayor de la cuenca del Río de la Plata pueden citarse los detallados relevamientos referidos a los aspectos fisicoquímicos de dicho ambiente (Comisión Administradora del Río de la Plata, 1989; AGOSBA-OSN-SIHN, 1992; AA-AGOSBA-ILPLA-HN, 1997).

Interacciones de los metales con las membranas biológicas.

Debido al aumento de la contaminación por metales como consecuencia de la creciente actividad industrial, la explotación minera o la remoción de los elementos de sus depósitos insolubles (Nriagu y Pacyna, 1988), muchos de ellos alcanzan una concentración elevada y pueden competir con la disponibilidad de los elementos esenciales para los organismos. Se considera a un elemento como *esencial* cuando su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales. Un elemento esencial puede llegar a ser tóxico, cuando se sobrepasan ciertos límites de su concentración en el medio interno, donde normalmente se hallan en concentraciones muy bajas (trazas). Este balance se esquematiza en la Figura 5.

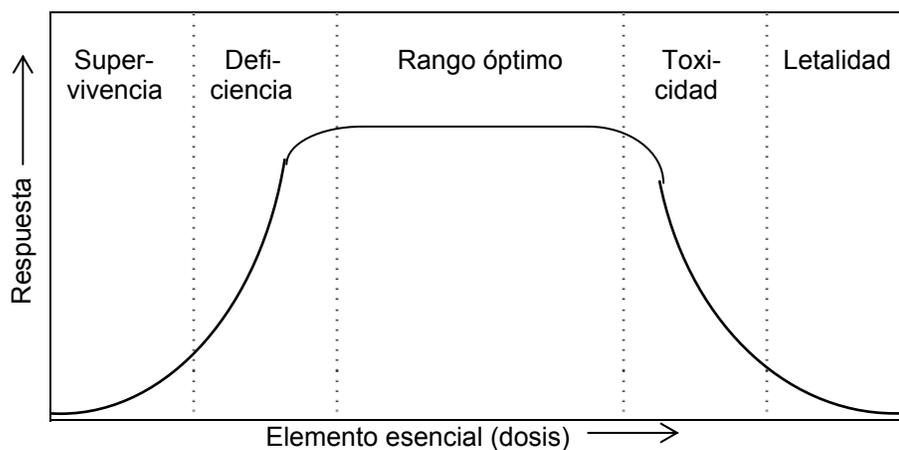


Figura 5: Efecto de un elemento esencial sobre la respuesta fisiológica (de Baran, 1995).

Al considerar la captación y toxicidad de los metales pesados, en particular para los organismos acuáticos, debe destacarse que son influidos no solo por su concentración en el medio; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente (Market, 1998). Todos ellos en conjunto determinan su *biodisponibilidad* (Erickson y col, 2008). Esta es un concepto crítico en Ecotoxicología ya que los agentes tóxicos que no están biodisponibles son, por definición, aquellos improbables de producir cualquier efecto adverso.

La *biodisponibilidad ambiental* es la fracción del material que un organismo puede acumular cuando encuentra o procesa un medio (agua o aire). Es una medida general de la capacidad de captación de un organismo a partir del material disponible en el ambiente.

La *biodisponibilidad toxicológica* es la fracción del tóxico que es adsorbida y/o absorbida por un organismo, distribuida por la acción convectiva del sistema circulatorio y presentada a los receptores o sitios de acción tóxica.

La biodisponibilidad ambiental y la toxicológica son estimadores de la eficiencia de extracción; mientras la primera indica el total que ingresa al organismo, la segunda se refiere a la cantidad que alcanza a los receptores del sitio de acción tóxica.

Es también ineludible considerar las interacciones de los tóxicos con las membranas celulares y sus sitios específicos de transporte en los órganos blanco. (Hahn y Hestermann, 2008). Esta interacción se resume en el *Modelo de actividad del ion libre* (o FIAM; *Free Ion Activity Model*) el mismo postula que: a) la membrana celular es el primer sitio de interacción del metal (M) con los organismos vivos; b) esta interacción puede describirse como una reacción de superficie, formándose el complejo M/superficie; c) el transporte del metal en solución hacia la membrana y su complejación ocurre rápidamente de modo que se establece un pseudoequilibrio entre las especies del metal en solución y aquellos en la superficie biológica; d) la respuesta biológica depende estrictamente de la concentración del complejo M/superficie; e) durante la exposición al metal, la estructura de la superficie permanece inalterada (Baran, 1995; Castañé *et al*, 2003).

Existen varias vías por las cuales el metal (M) puede ser captado (Di Toro, 2000):

a) por absorción superficial del metal:



b) por captura mediante un quelante externo (L):



Ambas vías deben ser seguidas por el pasaje del elemento al interior de la célula donde puede ser retenido por otro ligando L':



Eventualmente antes o después de la transferencia del catión a la célula pueden ocurrir procesos redox. Finalmente el quelato ML' puede constituir la vía de transporte del elemento a otro sitio celular generando un nuevo complejo ML''.



Así si */superficie* representa un *sitio fisiológicamente activo* en la superficie celular, la unión con el metal M puede inducir una respuesta biológica directa (por ej. en las branquias de los peces); si representa un *sitio de transporte* que permite al metal M atravesar la membrana celular y penetrar en el citosol, la unión al sitio de transporte precederá al transporte al interior de la célula.

Otra posibilidad es que M compita por un sitio */superficie* de transporte utilizado por otro elemento diferente de M, (por ejemplo, competencia entre Ca/Cd). Esto fue sugerido en la piel de larvas de anfibio (Ferrari y Salibián, 1999).

En resumen, la interacción de un metal con un organismo acuático es un proceso que involucra los siguientes pasos:

- difusión desde la solución a la superficie biológica de transporte,
- sorción/complejación en la superficie,
- difusión a través de esas barreras externas,
- internalización mediante mecanismos de transporte.

Los efectos subletales de los metales pesados, en una gran variedad de organismos, también conducen a cambios en la morfología o histología de sus órganos críticos, alteraciones fisiológicas (afectando el crecimiento, desarrollo, capacidad de nado, respiración, circulación, etc.), modificaciones bioquímicas (química sanguínea, actividades enzimáticas), cambios endocrinos, conducta y reproducción. Esos efectos tóxicos pueden resultar de uniones no específicas del catión metálico a macromoléculas biológicamente importantes, causando modificaciones en su función.

Además, los metales pueden poner de manifiesto su toxicidad por interacción con proteínas de transducción de señales intracelulares y de esta manera interferir en el contacto entre las células, en el crecimiento y la diferenciación (Goering y col., 1995), como por ejemplo, el complejo Ca^{+2} -Calmodulina que actúa como regulador enzimático de sistemas involucrados en muchos procesos intracelulares (Nelson y Cox, 2000; Randall y col., 2002). La regulación de la distribución de los metales traza entre el *pool* de macromoléculas es central para mantener su homeostasis y la función celular óptima (Rand, 1995).

Las *metalotioneinas* (MT) son proteínas metabólicas que están involucradas en la homeostasis y la desintoxicación de metales pesados. Las MT juegan un rol dual en la mayoría de los organismos: como reguladores de los niveles de algunos metales esenciales y como detoxificantes. Son de bajo peso molecular (entre 6 y 10 kDa), estables al calor, carecen de aminoácidos aromáticos y poseen uniones Cis-X-Cis o Cis-Cis. Se estableció la existencia de varias isoformas de MT que pueden coexistir en el mismo tejido. Se han identificado en la fracción citosólica de hígado, riñón y otros tejidos parenquimatosos de una gran variedad de especies (Fernández y col, 2008). Algunas MTs intervienen en el metabolismo y regulación del Cobre y Zinc, mientras que la síntesis de otras puede ser inducida como resultado de la exposición o administración de diferentes metales (por ej. Cadmio) (Wright y Welbourn, 1994).

La síntesis de metalotioneínas se induce a nivel transcripcional en las células de los órganos blanco las cuales pueden presentar amplificación de los genes para MT (George y col, 1996; Wu y col, 2000).

Las MT son consideradas además como biomarcadoras de contaminación por metales. La especificidad de la inducción está dada por la presencia de elementos reguladores en la secuencia de los genes que codifican para las MTs (Roesijadi, 1996; Wu y col, 2006). de Lafontaine y col (2000) encontraron en *Dreissena polymorpha* una fuerte correlación entre la concentración de MT y la presencia ambiental de Cu. También podemos citar el reciente trabajo de Bouraoui y col (2008) quienes encontraron una respuesta específica de MT en *Sparus aurata* expuesto entre 6 y 48 horas a $200 \mu\text{g Cd.kg}^{-1}$.

El Cadmio

Características generales:

Entre los contaminantes más comunes del medio acuático se halla el Cd^{2+} , que es un metal pesado del Grupo IIb de la Tabla Periódica, que ha adquirido gran importancia toxicológica (USDHHS-ATSDR, 1993; Kasuba y Rozgaj, 2000) y ecotoxicológica (WHO, 1992; USEPA, 2007). Es un metal brillante, maleable de color plata-blanco y blanco-azulado, inodoro, también puede presentarse como un polvo gris-negro y es abundante en la corteza terrestre (Foulkes, 1986).

Es raro encontrarlo en estado puro. Forma numerosas sales que se hallan en rocas, suelos, agua y en carbón y petróleo, etc, cuya naturaleza es fundamental para su movilidad en el ambiente y sus efectos en el ecosistema.

En la siguiente Tabla se muestran algunas propiedades físicas y químicas del Cadmio metálico y del CdCl_2 :

	Cd	CdCl₂
Masa molar (g)	112.41	183.32
δ	8.642 (25 °C)	4.047
Punto de fusión (°C)	320.9	568
Punto de ebullición (°C)	765	960
Solubilidad en agua (g/L)	Insoluble	1400 (20°C)

Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas del Cadmio metálico y del CdCl₂.

Es común encontrar al Cadmio asociado al Zn (en rocas sedimentarias). Marbán y col (1999) hallaron en suelos de una zona deprimida ubicada al norte del conurbano bonaerense una concentración de Cd que oscilaba entre: 1.2 y 2.1 mg.kg⁻¹.

Fuentes ambientales:

- Actividad volcánica: es la mayor fuente del Cd atmosférico.
- Emisión industrial: producción de acero; incineración de residuos urbanos, fabricación de baterías y acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, como estabilizante, cloruro de polivinilo, colorantes, fusibles, laminados a vapor y soldadura, aleaciones, combustión de diesel y petróleo, fertilizantes, pesticidas.
- Terrestre: cenizas de combustibles fósiles, residuos de la manufactura de cemento, deposición de basura municipal, cenizas de incineración de objetos con Cd; aplicación de agroquímicos.

Transporte y distribución:

El Cd puede pasar a la atmósfera en los procesos industriales. Desde allí se distribuye a los distintos compartimientos ambientales. Se deposita sobre la tierra y es arrastrado a los ríos y luego al mar. En éste se encuentra la mayor reserva del metal. El Cadmio depositado en la tierra es absorbido u ocluído por las partículas del suelo; puede incorporarse a estructuras biológicas o llega a disolverse en el agua del suelo. Este Cd es móvil y en algunos casos es absorbido por las plantas y filtrado al subsuelo contaminando por lo tanto aguas profundas y

superficiales (Kruse y col, 2003), por ejemplo, en el Río de la Plata los niveles medidos entre 1993-1996 fue de $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ (Borthagaray y col, 2001). La dinámica de todos estos mecanismos está influenciada por diversos factores tales como el pH, el tipo de suelo, vegetación, etc.

Desde el agua puede ser transferido al suelo: minas de metales no ferrosos (por el agua de dragado, agua residual del procesamiento, por escorrentía) (Nriagu y Pacyna, 1988).

El Cd puede presentarse como diversas especies químicas; en agua dulce suele estar como ion libre; en medio alcalino la forma habitual es como carbonato. En agua de mar, debido a su alta salinidad, se compleja con el Cl. En zonas oceánicas abiertas la concentración varía entre 0.5 a 10 mg.L^{-1} . Los ríos con alta concentración de Cd pueden contaminar las tierras linderas por irrigación o por inundaciones.

Cinética y metabolismo:

La concentración de Cd en los organismos varía con el tejido considerado y con la edad (Repetto, 1995).

Una vez absorbido es transportado por la sangre al hígado y otras partes del cuerpo (riñón, páncreas, músculo, piel). En peces, los niveles más altos de Cadmio se han detectado en tres órganos blanco: riñón, hígado y branquias (Wright y Welbourn, 1994; Kraal y col, 1995; Ollson y col, 1996). En el hígado induce la síntesis de metalotioneinas. El complejo Metalotioneina-Cd se considera menos tóxico que el Cd libre, pudiendo actuar la proteína como agente detoxificante. La liberación del complejo desde el hígado a la sangre es lenta, lo que resulta en una acumulación del complejo MT-Cd en ese órgano.

El complejo MT-Cd transportado por la sangre es filtrado a través del glomérulo. Seguidamente es reabsorbido por las células tubulares proximales. Las lisozimas de esas células degradan rápidamente el complejo y liberan el metal al citoplasma. Cuando la exposición es baja, la reabsorción es casi completa, mientras que a niveles altos se satura la entrada desde el fluido tubular al interior de las células. Estas tienen una capacidad limitada de producción de

metalotioneinas para contrarrestar los efectos tóxicos del Cd libre en ese lugar. Si la capacidad de síntesis de la proteína se sobrepasa puede ocurrir un daño de las células tubulares proximales. El primer signo de este efecto es proteinuria, (excreción urinaria de proteínas séricas de bajo peso molecular, como beta-2-microglobulina, lisozimas, proteínas de unión del retinol y cadenas de inmunoglobulinas).

Eliminación:

Los organismos que acumulan Cd tienden a retenerlo por largos períodos de tiempo. La vida media biológica ($T_{1/2}$) en el cuerpo humano varía con la edad; es mayor en los niños que en los adultos (para estos es de 20 años). En el 95% de los casos la excreción ocurre por las heces y la bilis. En el hígado la excreción se realiza en contra de un gradiente de concentración con la participación de enzimas transportadoras, lográndose una concentración en la bilis entre 20 – 500 veces mayor que la encontrada en plasma. La segunda vía de excreción es el riñón y en aquellos animales que mudan la pérdida se produce por el exoesqueleto (Janssen y col, 1991)

Bioacumulación:

Se refiere a la transferencia del contaminante a la cadena trófica. Esta transferencia está controlada por las propiedades químicas del agua que determinan la especiación del metal y las formas en las que sus especies compiten con ligandos químicos (sitios de unión de las partículas en suspensión o sedimentos) y con sitios de unión de membranas biológicas. El Cd se acumula fácilmente en numerosos organismos, particularmente microorganismos y moluscos e invertebrados terrestres, en los que los factores de bioconcentración son del orden de varios miles (WHO, 1992).

El cadmio en el medio acuático

La toxicidad aguda del Cd para los organismos acuáticos es muy variable aún entre especies filogenéticamente cercanas y está relacionada con su especiación, en particular con la concentración del metal libre (WHO, 1992). La toxicidad y los factores de bioconcentración de las diferentes formas del Cd son muy variables (Köck y Hofer, 1998).

Un parámetro que afecta la captación de Cd desde el medio ambiente es la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} que lo acompañan (Bentley, 1991). Ambos iones disminuyen la captación de Cadmio en las branquias de peces y por ende su acumulación y toxicidad. El calcio es efectivo a concentraciones mucho mas bajas que el Mg^{2+} .

Además, como ya fue anticipado (Pág. 29) el Cd^{2+} puede reemplazar al Ca^{2+} en la calmodulina (esto se debe a que ambos iones tienen radios atómicos similares y forman complejos con los mismo ligandos) (Flik y col., 1987).

Hay otros factores que afectan en la captación y posterior toxicidad del metal: la elevación de la temperatura la aumenta, mientras que el aumento de la salinidad y la dureza la disminuyen (Davies, 1993; Hall y Anderson, 1995). La especiación del metal en agua es pH dependiente. El carbono orgánico disuelto (COD) tiene la capacidad de disminuir la disponibilidad del metal (Stephenson y Mackie, 1989). Puede formar quelatos con la materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos), arcillas y/o óxidos de hierro, aluminio o manganeso; complejos con compuestos solubles de bajo peso molecular; o precipitados con compuestos inorgánicos (tales como óxidos, sulfatos o fosfatos) (USEPA, 2007).

Un efecto común de la exposición al Cd en los vertebrados, es la hipocalcemia, la cual es acompañada algunas veces por hipermagnesemia. En los peces ese efecto se atribuye a la inhibición de la captación de Ca^{+2} (WHO, 1992; Wright y Welbourn, 1994; Sloman y col. 2003).

La afinidad de la Ca-ATPasa por el Cd^{+2} parece ser unas 100 veces mayor que para el Ca^{+2} . Esto explicaría la acumulación de este metal en los peces, aún desde medios que lo contienen en bajas concentraciones (Ueng y col., 1996). En relación con esa competencia Ca/Cd y sus consecuencias, Ferrari y Salibián

(1999) mostraron que bajas concentraciones del metal, provocaban severos efectos en la estructura de la piel de larvas de *Bufo arenarum* alterando las uniones celulares, principalmente en ausencia de iones en solución. La desorganización de las uniones intercelulares ha sido atribuida por dichos autores a la competencia del Cd^{+2} por el Ca^{+2} , a la alteración estructural de los filamentos de actina y miosina del citoesqueleto, así como al patrón de distribución de la E-caderina Ca^{+2} -dependiente, esencial en las uniones celulares.

También se ha observado la deformidad del esqueleto en peces expuestos a bajos niveles de Cadmio (Larsson y col, 1981; WHO, 1992).

Además afecta diversos sistemas enzimáticos incluidos aquellos relacionados con la neurotransmisión, transporte transepitelial, metabolismo intermedio y la actividad de las oxidasas de función mixta (Wright y Welbourn, 1994; Almeida y col, 2001).

Principales efectos del Cd en los peces

a) Efectos sobre el Comportamiento. Importancia de los sistemas sensitivos.

Los sistemas sensitivos no visuales son importantes para el comportamiento de los peces, particularmente involucrados en la migración, selección del hábitat, reclutamiento, competencia, etc (Sloman y Wilson, 2006; Sloman, 2007). Según Kjel Doving (1991) el estudio de estos sistemas es relevante por las siguientes razones:

- a) están directamente expuestos al ambiente,
- b) median una gran parte de los repertorios comportamentales,
- c) se desarrollan tempranamente,
- d) las células receptoras muestran una respuesta rápida e inespecífica de tóxicos y estimulantes.

El *órgano olfatorio* de los peces (Hara, 2000) es uno de los primeros blancos de su interacción con contaminantes, pudiendo provocar alteraciones en los procesos de quimiocomunicación (Saglio y col., 2003).

Por otra parte, el sistema olfativo, juega un rol importante en muchos comportamientos (alimentación, escape de predadores, capacidad de respuesta a feromonas naturales, formación del cardumen, migración, desove y cuidado parental, forrajeo e interacciones sociales) que son inhibidos por el Cd. Un posible mecanismo de estos efectos del metal es la disrupción que provoca en ese sistema. Recientemente se ha demostrado la acumulación del Cd en la roseta olfativa, su transporte a lo largo del nervio olfativo y acumulación en el bulbo (Sloman y col., 2003).

En este contexto, es interesante que Saglio y col. (2003) mostraron que la exposición de la carpa *Carassius auratus* a concentraciones subletales de pesticidas altera su respuesta comportamental a ciertos aminoácidos (conocidos como potentes estímulos olfativos y gustativos en los peces), que pueden actuar como señales químicas en diversos aspectos de relaciones intra e interespecíficas.

Todos los peces poseen además el sistema mecanosensorial de la *línea lateral* (Webb, 2000) y, al igual que con los sistemas gustativos y olfatorios, sus células en contacto con el agua, detectan las corrientes del medio; en la oscuridad también juegan un rol importante para evitar predadores. Estas células pueden también ser inhibidas por la exposición al metal. Baker y Montgomery (2001) encontraron en juveniles de *Galaxias fasciatus* que el deterioro del sistema de la línea lateral por el Cadmio podría hacerlos más vulnerables a la predación.

Otros trabajos, como el de Faucher y col (2006) estudiaron el efecto del ión Cd^{2+} sobre el comportamiento de escape de *Dicentrarchus labrax* usando un análisis de video realizando además observaciones de la microanatomía de los neuromastos de la línea lateral. Cuando los peces fueron expuestos a $5 \mu g Cd.L^{-1}$, se observó un daño importante en dichas estructuras lo que derivó en la alteración de su comportamiento de escape.

Es interesante que Schmidt y colaboradores (2005) estudiando el efecto de una mezcla de PCBs y TBT sobre la natación observaron en la velocidad de nado una disminución durante el día y un aumento durante la noche debido a un efecto

sinérgico de ambos contaminantes y a la disponibilidad de recursos para alimentarse.

En estudios de exposición crónica al Cd se encontró que los peces presentaban nado anormal y distorsiones corporales (Wright y Welbourn, 1994). Se demostró también que pueden exhibir una conducta menos agresiva y menor destreza para competir con individuos no expuestos (Sprague, 1987).

Por extensión, las alteraciones de los comportamientos por tóxicos como el Cd en solución y la consecuente disrupción de las jerarquías sociales podría tener serias implicancias en la estructura y estabilidad de las poblaciones.

Por último citaremos el trabajo de Yilmaz y col (2003) que observaron alteraciones en la natación, respiración y nado en *Poecilia reticulata* expuestos a concentraciones de CdCl₂ entre 22.5 y 36.0 mg.L⁻¹.

b) Efectos sobre la morfología de las branquias

Las branquias de los teleósteos se componen de cinco hendiduras branquiales protegidas del medio externo por un opérculo, que es un pliegue del arco hioideo armado con una serie de placas óseas de revestimiento (operculares) y de radios braquiostegos. Cada arco tiene dos hileras de *filamentos* y cada filamento aplanado dorsoventralmente, presenta una hilera superior y otra inferior de *laminillas* (Figura 6). Las laminillas de las branquias de los teleósteos se insertan de forma alternada en los *arcos branquiales*. Son sustentadas por una varilla ósea o cartilaginosa, el radio branquial (Kardong, 1998). Estas laminillas están cubiertas por una fina capa de células epiteliales cuyas paredes internas están sostenidas por *células en pilar*, las cuales ocupan aproximadamente el 20% del volumen interno de las laminillas. El área total de las laminillas es elevada, variando entre 1,5 a 15 cm²/g de peso corporal, dependiendo de la talla, de su grado de actividad y de su adaptación a medios con diferente disponibilidad de oxígeno. El agua y la sangre fluyen en las laminillas con flujo contracorriente (Maina, 1998; Randall y col., 2002).

El epitelio branquial presenta tres tipos celulares básicos: a) células epiteliales o pavimentosas, b) células de Keys-Willmer (también llamadas ionocitos

o células de cloruro) y c) células mucosas. Las *células epiteliales* son las más abundantes tanto en los filamentos como en las laminillas y tienen un gran número de células mucosas y de cloruro entre ellas. Son delgadas, adaptadas para facilitar el intercambio gaseoso con el medio; también intervienen en la excreción de residuos nitrogenados y en el equilibrio ácido-base. Las *células de cloruro* están involucradas en el intercambio iónico Na/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Kirschner, 2004; Evans y col., 2005) así como de la captación de Ca^{2+} . Estas células se localizan en el epitelio de los filamentos branquiales, en la base de las lamelas. Se caracterizan por su gran tamaño, abundantes mitocondrias, profundas invaginaciones de las membranas laterales y por la posesión de una caveola apical (Vigliano y col., 2006). Basalmente contactan con vasos sanguíneos y apicalmente con el agua. Las *células mucosas* están siempre cubiertas por las células pavimentosas adyacentes las cuales presentan gránulos que muestran diferentes electrodensidades (Fernández y Perna Martins, 2000).

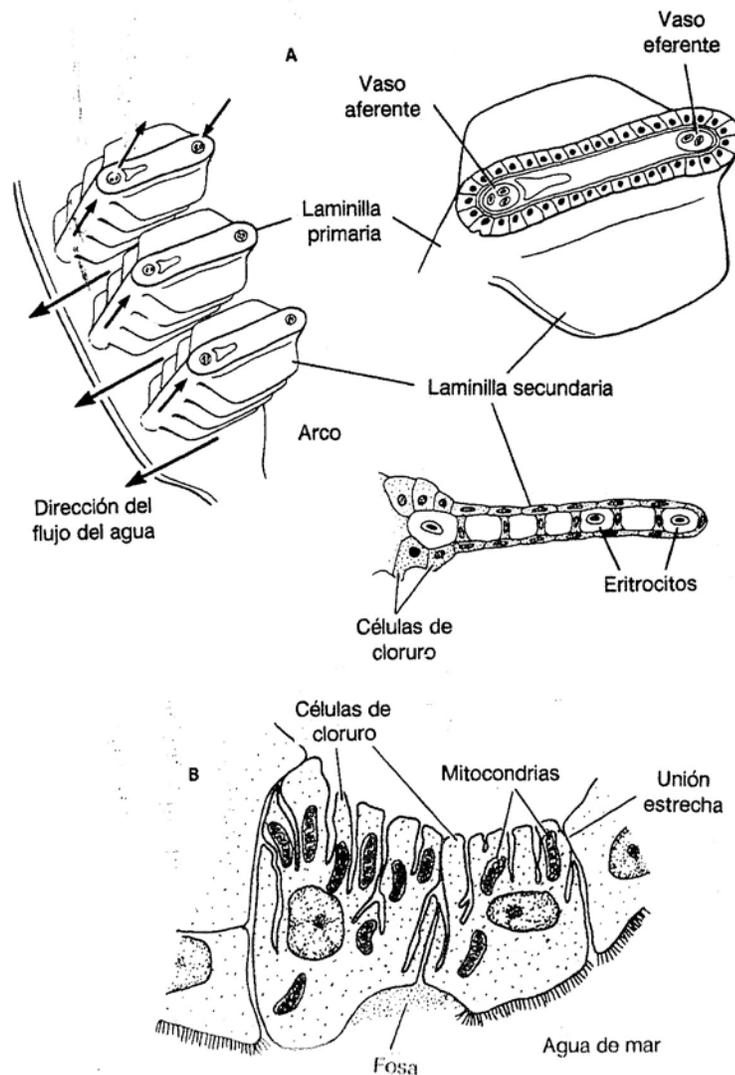


Figura 6: Esquema de las branquias de teleosteos. (A) Los filamentos branquiales (o laminillas primarias) se proyectan a partir del arco branquial. Las laminillas (o laminillas secundarias) se extienden a partir del filamento branquial y contienen anchos espacios por los que circula la sangre. (B) Dibujo de la célula de cloruro rodeada por células epiteliales respiratorias. Las células de cloruro se caracterizan por su elevado número de invaginaciones a nivel lateral y basal, así como por un alto número de mitocondrias (de Randall y col, 2002).

Las branquias son órganos blanco críticos frente a la exposición a tóxicos debido a su extensa área en contacto con el medio externo y al reducido espesor de las membranas que se interponen entre el medio interno y el externo.

El Cadmio penetra en las branquias por difusión facilitada a través de canales de calcio en la membrana apical; hay cuatro evidencias que apoyan lo antedicho:

- a) Un aumento en la concentración de Ca^{2+} disminuye la captación de Cd^{2+} .
- b) El Cd^{2+} presente en el medio inhibe la captación de Ca^{2+} .
- c) El La^{3+} , que es un bloqueador de canales de Ca^{2+} en las membranas celulares, en las branquias inhibe tanto la captación de Ca^{2+} como la de Cd^{2+} (Verbost y col, 1989).
- d) La hormona proteica hipocalcémica estaniocalcina (o hipocalcina) (producida por los corpúsculos de Stannius) disminuye la captación tanto de Ca^{2+} como de Cd^{2+} en las branquias (Verbost y col, 1993).

Cuando las concentraciones de Cadmio aumentan en el medio externo y sus concentraciones internas superan la capacidad de detoxificación, se observan varios efectos adversos; los mismos están asociados con interferencias en procesos respiratorios y posteriormente con daños en el epitelio branquial.

Además, el metal altera la estructura y causa cambios morfológicos de diversa severidad en varios órganos. Thophon y col. (2003) observaron las siguientes anomalías histológicas en las branquias de *Lates calcarifer* expuestos a Cadmio en ensayos agudos (10 mg.L^{-1}) y crónicos (0.8 mg.L^{-1}): edema de células epiteliales; aneurisma en lamela secundaria; ruptura de células mucosas; hipertrofia e hiperplasia de células epiteliales y de cloruro.

Estas mismas histopatologías fueron observadas por Hirt y Domitrovic (2002) en *Cichlasoma dimerus* expuestos a este mismo metal. Por otra parte Bataglini y col (1993) observaron en *Carassius auratus* expuestos a 10 mg Cd.L^{-1} en agua dura ($520 \text{ mg CaCO}_3. \text{L}^{-1}$): una secreción mucosa en las primeras horas de exposición al metal y luego de 7 días observaron hipertrofia e hiperplasia de células epiteliales.

c) Efectos sobre el metabolismo

El término *metabolismo* abarca la totalidad de las reacciones químicas que ocurren en un organismo. Las vías metabólicas pueden agruparse en dos categorías principales: el *anabolismo*, en el que sustancias simples se transforman en moléculas más complejas, y el *catabolismo*, en el que las moléculas complejas se degradan en otras más simples (Randall y col., 2002). Las reacciones anabólicas son endergónicas y se asocian con procesos de reparación, regeneración o crecimiento estimulando la síntesis de proteínas; las catabólicas son exergónicas en las que una parte de la energía se almacena en forma de fosfatos de alta energía ATP. Estas reacciones se producen espontáneamente, exhiben una disminución de energía libre y por lo tanto tienen un ΔG° negativo, en consecuencia.

La *Tasa Metabólica* constituye un parámetro muy relevante del animal porque es la expresión cuantitativa integrada de las interconversiones energéticas en los procesos anabólicos y catabólicos.

Para utilizar la energía provista por un alimento es necesario que el animal degrade las moléculas, lo que ocurre mediante un proceso en varias etapas. Se comienza a partir de la *energía química ingerida*, que es la presente en las uniones químicas de los alimentos. Una parte de ésta no se aprovecha y permanece en formas químicas que no pueden ser absorbidas y se eliminan en las heces (*energía química fecal*). La energía de los compuestos orgánicos que se asimila se designa *energía química absorbida o metabolizable* (Hill y col., 2004). Esta es la *energía disponible* para la realización de trabajo (crecimiento; reparación de tejidos; trabajo interno: químico, osmótico, eléctrico y mecánico) y trabajo externo: locomoción, comunicación, etc. (Figura 7).

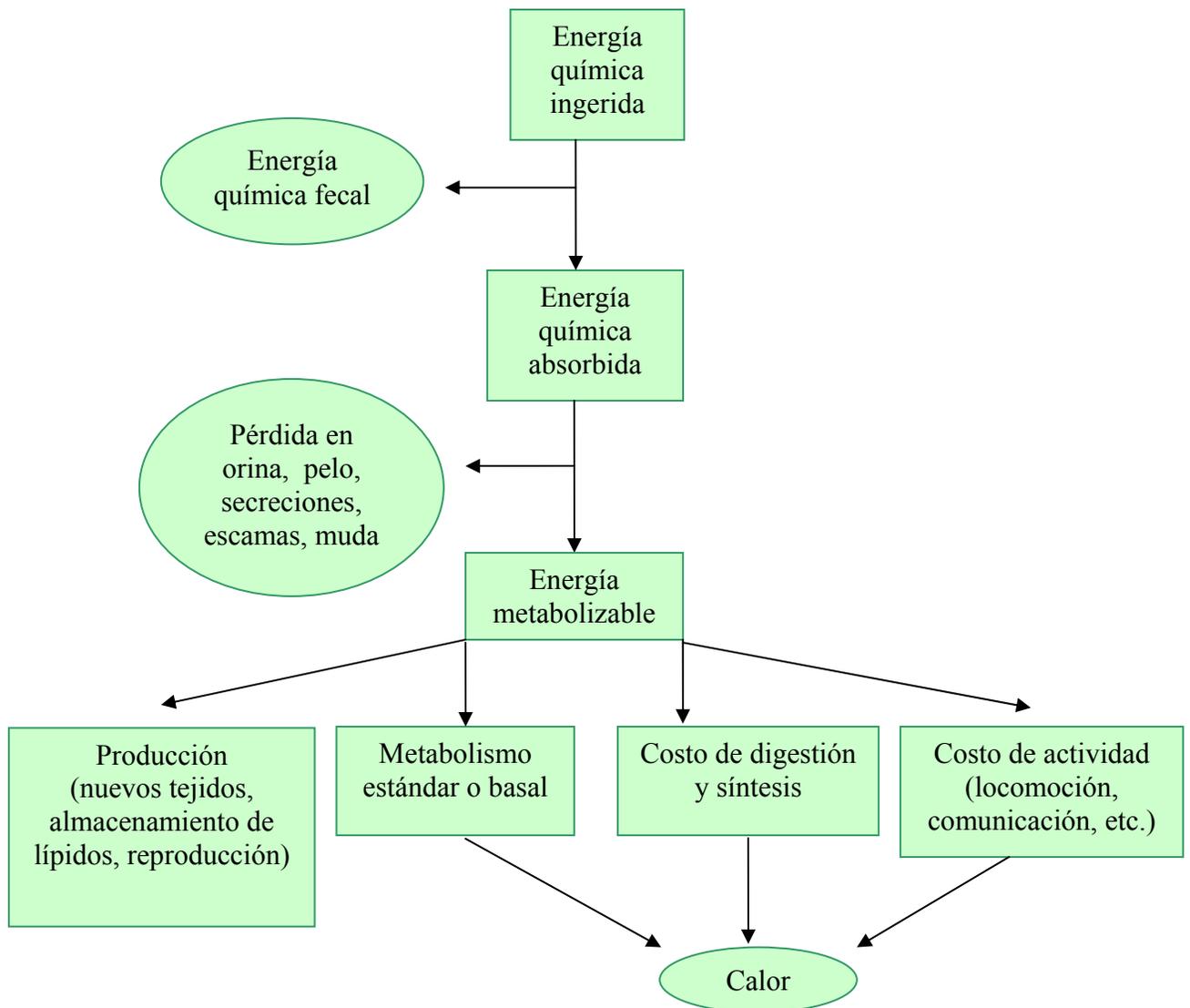


Figura 7: Flujo de energía en un animal (de Randall y col, 2002).

El balance energético tiene en cuenta el ingreso de energía bajo la forma de alimento (energía química ingerida) y el costo de mantenimiento y crecimiento; se lo puede expresar mediante ecuaciones que tienen la forma (Beyers y col., 1999):

$$C = TM + A + ADE + F + U + \Delta B \quad [2]$$

Donde:

C= Alimento consumido

R= Tasa Metabólica

A= Actividad

ADE= Acción dinámica específica

F= Heces producidas

U= Orina excretada

ΔB = Crecimiento somático y reproducción

La *eficiencia de asimilación* del alimento permite conocer la capacidad de los organismos para convertir el alimento ingerido en energía útil.

En los peces, la tasa de crecimiento puede estar disminuida por factores ambientales y fisiológicos y es un indicador confiable de los efectos de los tóxicos sobre la bioenergética de organismos acuáticos (Alcaraz y Espina, 1997). Algunos de ellos actúan en los niveles de digestión limitando el aporte energético requerido (Blier, 1997). Estos incluyen la eficiencia de absorción y conversión de alimento el cual está relacionado con el tamaño y la calidad del alimento. Además es importante considerar los cambios en la actividad de las enzimas digestivas y la capacidad del transporte transepitelial de nutrientes en el tracto digestivo (Jobling, 1995).

Los peces tienen la capacidad de compensar alteraciones asociadas al estrés ambiental a través de procesos de detoxificación, regulación y adaptación de sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Estos procesos demandan energía, lo cual se puede manifestar como disminución en la tasa de crecimiento, eficiencia de reproducción o resistencia a factores del medio.

Los contaminantes desencadenan reacciones de estrés en los organismos que puede conducirlos a la muerte o causar modificaciones en su estado fisiológico. Las alteraciones causadas por los contaminantes producen no solo cambios en la morfología y fisiología de los organismos, las cuales se manifiestan a través de alteraciones bioquímicas, citológicas, tisulares, de órganos e incluso fisiológicas y conductuales. Los cambios relacionados con el estrés en las funciones bioquímicas y fisiológicas de los individuos preceden, generalmente, efectos de mayor impacto en los niveles de población y comunidad (Adams, 1990).

En relación a este aspecto, Selye (1956) desarrolló un concepto que describe cómo las influencias externas afectan las condiciones fisiológicas de los organismos. Según dicho autor, cuando los organismos son expuestos a estresores, su respuesta fisiológica sigue un patrón denominado *Síndrome de Adaptación General* (Figura 8), caracterizado por tres fases:

a) Alarma: los sistemas fisiológicos se ajustan para compensar los efectos y reestablecer el equilibrio; en los peces esta fase está caracterizada entre otros síntomas por pérdida de apetito, pérdida de equilibrio y cambios comportamentales.

b) Resistencia: esta etapa está asociada a un aumento en la tasa metabólica para compensar los efectos del estresor químico. En este caso el efecto acumulativo de una exposición prolongada a un estresor subletal resulta en la muerte prematura del animal.

c) Agotamiento: los sistemas son forzados a funcionar a tasas más elevadas que las normales que conducen a la muerte del animal.

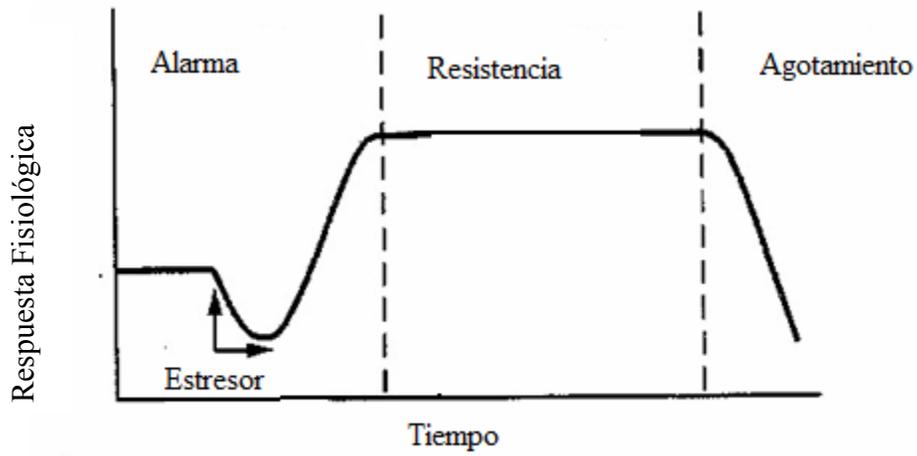


Figura 8: Representación conceptual del Síndrome de Adaptación General [modificación del propuesto por Selye (1956)].

HIPÓTESIS- OBJETIVOS

Hipótesis.

La Hipótesis básica de este Trabajo es la siguiente: los peces dulceacuícolas sometidos a condiciones de estrés ambiental por exposición a xenobióticos o a una mezcla de ellos, pueden responder mediante un conjunto de cambios tendientes a compensar, contrarrestar o adaptarse a esas condiciones. Entre ellos pueden anticiparse cambios en: a) el comportamiento, b) la morfología de las branquias y c) un conjunto de los parámetros fisiológicos. Estas respuestas pueden ser monitoreadas mediante biomarcadores sensibles y tempranos de exposición y/o efecto, de los tóxicos.

En particular, en los peces dulceacuícolas que se hallan en ambientes conteniendo metales pesados en concentraciones subletales pueden ponerse de manifiesto alteraciones, en grado diverso, de:

- a) los patrones de comportamiento natatorio,
- b) la estructura microscópica de los epitelios branquiales,
- c) algunos de sus parámetros fisiológicos, relacionados con el metabolismo.

Objetivos Generales.

El Objetivo General es estudiar en forma comparativa e integrada los cambios que ocurren en algunos biomarcadores etológicos, morfológicos y fisiológicos en juveniles de tres teleósteos dulceacuícolas (*Cyprinus carpio*, *Astyanax fasciatus* y *Australoheros facetum* [sin *Cichlasoma facetum*]) por efecto del Cadmio:

En *Cyprinus carpio*:

1. Alteraciones en la actividad natatoria total.
2. Alteraciones en las preferencias espaciales
3. Alteraciones en la morfología microscópica de branquias
4. Factor de condición
5. Alteraciones en el metabolismo

En *Astyanax fasciatus* y *Australoheros facetum*:

1. Alteraciones en la actividad natatoria total
2. Alteraciones en las preferencias espaciales

3. Alteraciones en la morfología microscópica de las branquias

Objetivos y Finalidades Específicas.

Todos los ensayos serán de tipo agudo y se llevarán a cabo en condiciones de laboratorio de acuerdo al siguiente detalle:

A- Estudios básicos: Impactos de soluciones subletales de Cadmio sobre:

A.1) la magnitud de los siguientes biomarcadores conductuales: actividad natatoria, series temporales de actividad, velocidad de nado, distancia de recorrido, preferencias espaciales.

A.1.1) el grado y la cinética de recuperación de los parámetros alterados luego de la transferencia de los animales a medios "limpios".

A.2) la morfología microscópica de las branquias y el factor de condición.

A.2.1) la reversibilidad de las alteraciones morfológicas.

A.3) algunas alteraciones en el metabolismo.

B- Estudios aplicados: Impactos de un medio natural contaminado (agua del Río Luján) sobre:

B.1) la magnitud de algunos biomarcadores conductuales.

B.2) la estructura microscópica de las branquias.

Nota: Los Objetivos y Finalidades Específicas indicados en A) se llevarán a cabo en las tres especies antes mencionadas; los de B) se limitarán a ensayos con *C. carpio*.

Los Objetivos indicados permitirán en las especies estudiadas:

- 1) definir los niveles basales de los parámetros que describen aspectos de su: a) actividad natatoria y b) metabolismo;
- 2) estudiar las imágenes microscópicas de las branquias en ejemplares control;

- 3) determinar alteraciones en los parámetros señalados en 1 y 2 debidas a la exposición a concentraciones subletales de Cadmio.
- 4) evaluar el grado y los tiempos de reversibilidad de los cambios registrados;
- 5) proponer un método de análisis de impacto ecotóxicológico apto para ser incluido en las baterías de bioensayos de los protocolos para determinación de la calidad toxicológica del agua dulce y del riesgo ambiental.

Materiales y Métodos

I- Organismos test: Generalidades bio-ecológicas

La información registrada en este acápite se basa en los trabajos de Almirón y col (1992), Ringuelet y col (1967), Ziswiler (1978), Rican y Kullander (2006). Además López y col han publicado varias listas bibliográficas con los trabajos de numerosos autores referidos a diferentes aspectos de la biología de las especies utilizadas en este trabajo. Entre las más recientes destacamos las siguientes: López y col (2003 a, b) y López y col (2005).

***Cyprinus carpio* (carpa común) (Linnaeus, 1758) (Figura 9)**

Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Cypriniformes
Suborden:	Cyprinoidei
Familia:	Cyprinidae

Carece de dientes en la mandíbula y de aleta adiposa. La cabeza está cubierta de piel desnuda y el cuerpo de escamas cicloideas. La aleta caudal es escotada. Tiene el cuerpo más bien alto, la aleta dorsal larga. Boca protáctil a menudo con dos barbillas a cada lado de la mandíbula superior.

Reproducción: alcanza su madurez sexual entre 18 – 24 meses (dependiendo de la temperatura), es un desovador parcial, teniendo 2 o 3 desoves en intervalos de 14 días. Tiene una fecundidad relativa de 100.000 a 300.000 huevos/kg de peso corporal.

Ambiente: bentopelágicos, de agua dulce o salobre. Se lo halla en aguas de corriente débil o nula; su alimentación está compuesta de algas, plantas acuáticas mayores, plancton, pequeños animales o partículas filtradas del barro.

Distribución: introducida como pez ornamental y como fuente de alimento; actualmente tiene una distribución global. En Argentina se la encuentra en los Ríos de la Plata, Paraná, Uruguay y en la cuenca del Río Salado, lagunas San Ramón de Bragado, Bajo Vidaña (al noroeste de Trenque Lauquen), El Hinojo (Trenque Lauquen).



Figura 9: *Cyprinus carpio*.

***Astyanax fasciatus* (mojarra)** (Cuvier, 1819) (Figura 10)

Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Cypriniformes
Suborden:	Characoidei
Familia:	Characidae

Boca no protáctil, sin barbillas, con dientes poderosos. Presenta aleta adiposa. Vejiga natatoria dividida en dos cámaras por un septo. Es una especie planctívora, gran consumidora y constituye el principal alimento para las especies ictiófagas.

Reproducción: se lleva a cabo durante todo el año acentuándose durante la primavera. La fecundación es externa. La hembra deposita los oocitos entre la flora acuática. Aproximadamente 72 horas después de la fecundación ocurre la eclosión, naciendo alevinos que durante la primera etapa de desarrollo se alimentan de fito y zooplancton y luego pasan a una dieta omnívora.

Ambiente: prefiere vivir entre los madrejones y en arroyos y zanjas de aguas tranquilas; no obstante, frecuentemente gana el río abierto. Es extremadamente gregaria conformando grandes cardúmenes.

Distribución: se distribuye en la vertiente Atlántica desde el río Grande (Texas, USA) hasta el Río de la Plata. Es un “forrajero” presente en casi todos los ámbitos de agua dulce de nuestro país, estableciéndose un claro límite en su distribución en la Provincia de Río Negro.



Figura 10: *Astyanax fasciatus*.

***Australoheros facetum* (sin *Cichlasoma facetum*) (chanchita) (Jenyns, 1842)**

(Figura 11)

Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Perciformes
Suborden:	Percoidei
Familia:	Cichlidae

Aleta caudal redondeada. Aletas ventrales en posición pectoral. Escamas ctenoides que cubren una parte de la cabeza. El color es muy variable, de fondo pardo oliváceo, con 6 franjas negras transversas; el fondo puede tomar tonos verdes, azulados o rojos. Cuerpo comprimido lateralmente. Son peces pequeños o medianos, pueden llegar a medir hasta 18 cm. Los adultos presentan dimorfismo sexual: macho con aletas más puntiagudas y mucho más colorido en la época de celo; las hembras son pequeñas. Presentan un comportamiento territorial y agresivo, típico de los cíclidos.

Reproducción: Deposita hasta 600 huevos, presenta cuidado de cría muy desarrollado, en ocasiones absorben a los alevinos o larvas con un poco de agua y de ese modo, manteniéndolos en la boca, se los sustrae al peligro inmediato.

Ambiente: Son dulceacuícolas, se adaptan fácilmente a las condiciones de cautiverio.

Distribución: Ríos Iguazú, Paraná, Yuquerí, Uruguay medio, de la Plata, Quequén Grande. Isla Martín García. Arroyos y lagunas del nordeste de la provincia de Buenos Aires; lagunas de la cuenca del Salado; arroyos de Tandil.



Figura 11: *Australoheros facetum*.

II- Morfometría de peces

En las Tablas 6 y 7 se muestran los datos correspondientes a masa y largo de los animales utilizados en este trabajo. Cabe señalar que para todos los ensayos se utilizaron juveniles.

Especie	N	Masa (gr)
<i>Cyprinus carpio</i> *	37	3,29 ± 0,17
<i>Cyprinus carpio</i> **	18	2,92 ± 0,14
<i>Astyanax fasciatus</i>	29	1,02 ± 0,06
<i>Australoheros facetum</i>	38	1,49 ± 0,15

Tabla 6. Masa de los peces utilizados en los ensayos de Comportamiento:*para Estudio de Actividad Natatoria (Pág. 76);**para Registros Múltiples Simultáneos (Pág. 97) y Microscopía de branquias (Pág. 103). Datos como $X \pm \text{ESM}$.

Grupo experimental	N	Masa (gr)	Largo total (cm)
0,20 mg Cd.L ⁻¹	11	6,75 ± 0,41	8,09 ± 0,19
Control	11	5,89 ± 0,31	7,65 ± 0,14
0,30 mg Cd.L ⁻¹	14	4,59 ± 0,34	6,74 ± 0,17
Control	14	4,23 ± 0,53	6,70 ± 0,18
0,60 mg Cd.L ⁻¹	14	3,36 ± 0,17	6,18 ± 0,18
Control	14	3,54 ± 0,19	6,47 ± 0,14
2,20 mg Cd.L ⁻¹	14	5,03 ± 0,19	7,37 ± 0,12
Control	14	5,47 ± 0,25	7,35 ± 0,12
Total	106	4,86 ± 0,30	7,07 ± 0,15

Tabla 7. Masa y largo total de los peces (*Cyprinus carpio*) utilizados para los estudios de Metabolismo (Pág. 116) discriminados por Grupo Experimental y en conjunto. Datos como $X \pm \text{ESM}$

III- Parámetros fisicoquímicos de los medios: Métodos e Instrumentos utilizados para su determinación

Temperatura y pH: Termómetro y pehachímetro Mettler MP 220.

Conductividad: Sensor Luftman C400.

Oxígeno disuelto: método iodométrico de Winkler (Anexo I)

Concentración de amonio: método colorimétrico de azul 2,2-isopropil-5,5-metil-indofenol o reacción de Berthelot, utilizando el *kit* de reactivos Merck Spectroquant 1.14752 (APHA, 1995) (Anexo I).

Dureza: volumetría con EDTA (Anexo I)

Concentración de Cadmio: Las muestras fueron acidificadas con HNO₃ hasta pH≤2 y almacenadas en heladera, hasta su análisis. La concentración del metal se determinó por espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire acetileno (Instrumentation Laboratory, Modelo 457) a 228 nm.

Calidad de los reactivos utilizados: grado analítico.

IV- Biomarcadores Comportamentales:

1- Estudio de la actividad:

1.a) Descripción del equipo de registros:

Se utilizó un equipo basado en el descrito por Shirer y col (1968) (Figura 12); el mismo estuvo constituido por un conjunto de ocho acuarios de vidrio de 20 (ancho) x 40 (largo) x 30 (alto) cm, en cuyo exterior se fijaron 40 sensores infrarrojos, que emiten señales con una frecuencia de 1 seg⁻¹ que permiten el registro de la ubicación espacial de los peces mediante coordenadas. Los sensores se alimentan con una fuente de 12 V 1 A. La información es almacenada en una computadora dotada de un sistema de adquisición de datos y recolectada en un *software* desarrollado especialmente (Jonas 10.1).



Figura 12: Fotografía de los acuarios experimentales (vista parcial)

En la Figura 13.a se presenta el esquema del Sistema de Detección Posicional Jonas 10.1. El mismo consta de un sistema electrónico en paralelo con una *Terminal de control* en cada pecera. Los datos recolectados en cada acuario son transferidos mediante un *Enlace de serie de datos* hacia el *Controlador bus*. Este controlador tiene la función de convertir los datos paralelos en seriales. Finalmente los datos son adquiridos por una placa instalada en la PC que los almacena en una base de datos Access.

En la Figura 13.b se muestra la sectorización (arbitraria) de los acuarios en franjas horizontales y verticales para una mejor interpretación de los datos. Las franjas horizontales delimitan cuatro zonas: A (franja superficial), B y C (franjas intermedias) y D (franja profunda). Las verticales delimitan cinco zonas, de 1 a 5; en la zona 1 se produce el goteo de las soluciones.

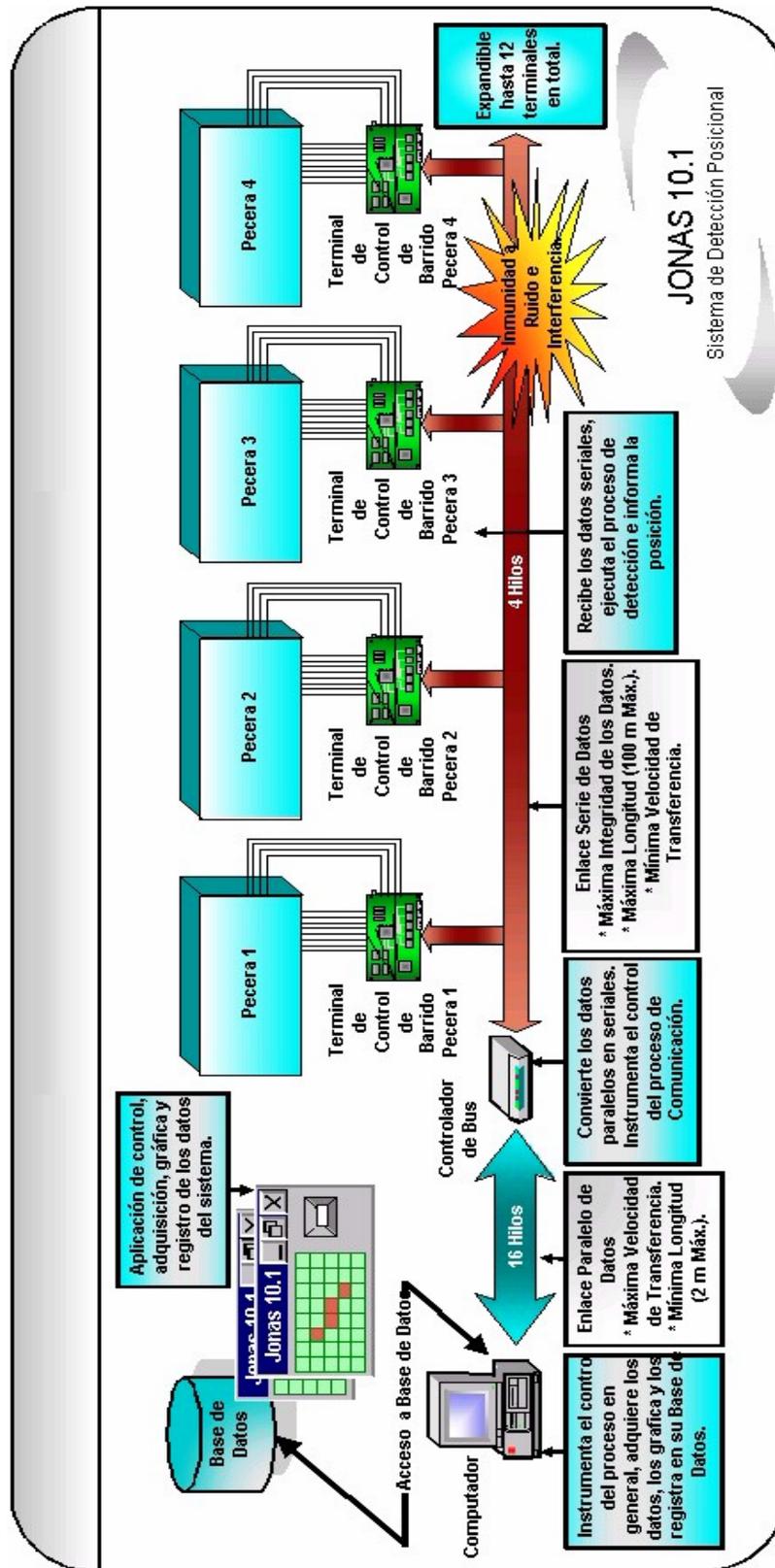


Figura 13.a. Esquema del Sistema de Detección Posicional Jonas 10.1

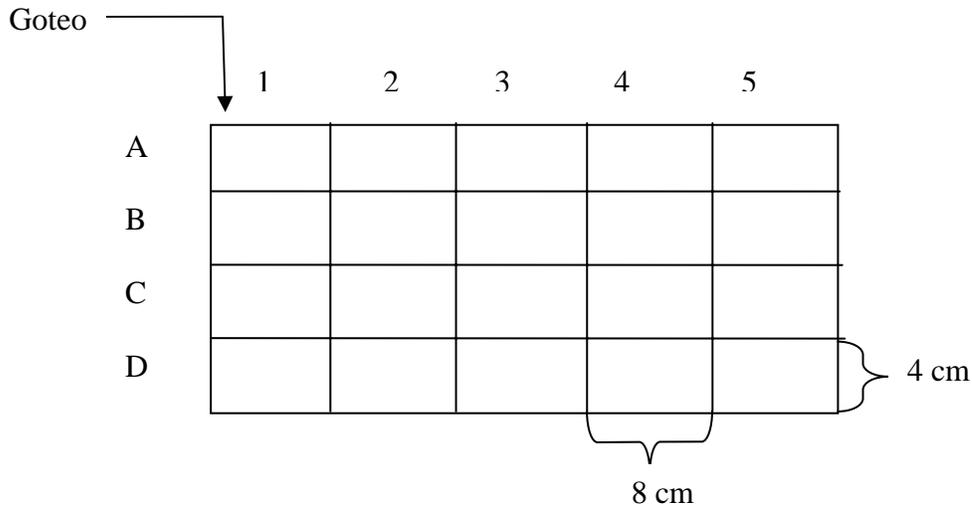


Figura 13.b: Representación esquemática de la sectorización de los acuarios.

1.b) Diseño experimental:

Condiciones experimentales:

Las condiciones ambientales fueron constantes en todos los ensayos. El fotoperíodo se fijó en 12D:12N, la temperatura en los acuarios a $21 \pm 2^\circ \text{C}$ y la aireación fue permanente. El volumen de los medios contenidos en los acuarios fue de 20-24 L. El flujo fue continuo (*flow through*) a una velocidad de 20-25 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, regulado mediante una bomba peristáltica multicanal Cole Palmer y controlado diariamente; la renovación completa del contenido de cada acuario ocurrió aproximadamente cada 24 h.

Los peces se seleccionaron al azar del *stock* del laboratorio, se pesaron y luego se los colocó individualmente en cada acuario; fueron alimentados con alimento para peces “Tetra Animin”, de la siguiente composición (g/100g):

Hidratos de carbono: 30,0; Proteínas: 42,7; Grasa: 10,5; Cenizas: 10,5; Humedad: 6,3

Cada experimento se desarrolló a lo largo de los siguientes períodos sucesivos (Figura 14):

- a) *Aclimatación* [A] en agua potable (AP),
- b) *Control* [C] en AP;
- c) *Exposición* [E], en la que el AP fue reemplazada por una solución de Cl_2Cd en AP y
- d) *Recuperación* [R] en AP.

a) *Aclimatación* [A]

Este período tuvo una duración de 7 días. Durante el mismo los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum*. Los restos de alimento y desechos fueron eliminados por sifón.

b) *Control* [C]

Los animales se mantuvieron en AP por 4 días. A partir de este período y en los subsiguientes la alimentación fue diaria, con una cantidad de alimento equivalente al 2% de su peso corporal inicial.

c) *Exposición* [E]

El AP fue reemplazada por una solución de Cl_2Cd en AP ($\text{AP} + \text{Cd}^{+2}$) durante 4-5 días. Las concentraciones teóricas de Cd^{+2} total oscilaron entre 0.3 y 0.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

d) *Recuperación* [R]

Se reemplazó la solución anterior por AP permaneciendo los peces en la misma durante 7 días; en algunos experimentos este período fue más breve (5 días).

Cabe señalar que en todos los ensayos se corrió en paralelo un *Control Permanente* [CoP] “externo” en el cual un pez permaneció en forma continua durante 14-15 días en AP circulante (Período equivalente a C + E + R).

En los períodos C, E y R se realizaron muestreos focales diarios en cada acuario de 4 horas continuas, entre las 10 y las 14, registrándose la actividad natatoria total y la posición lateral y altitudinal; en el CoP se hicieron los mismos registros en paralelo a cada uno de los tres periodos antes mencionados.

Este diseño permitió disponer de dos controles: a) el permanente (externo o CoP) y b) el interno de cada individuo (C) que fue control de si mismo para comparar sus registros de E y R.

Algunos de los peces de cada grupo fueron seleccionados para el estudio de la estructura de sus branquias mediante MEB (página 105).

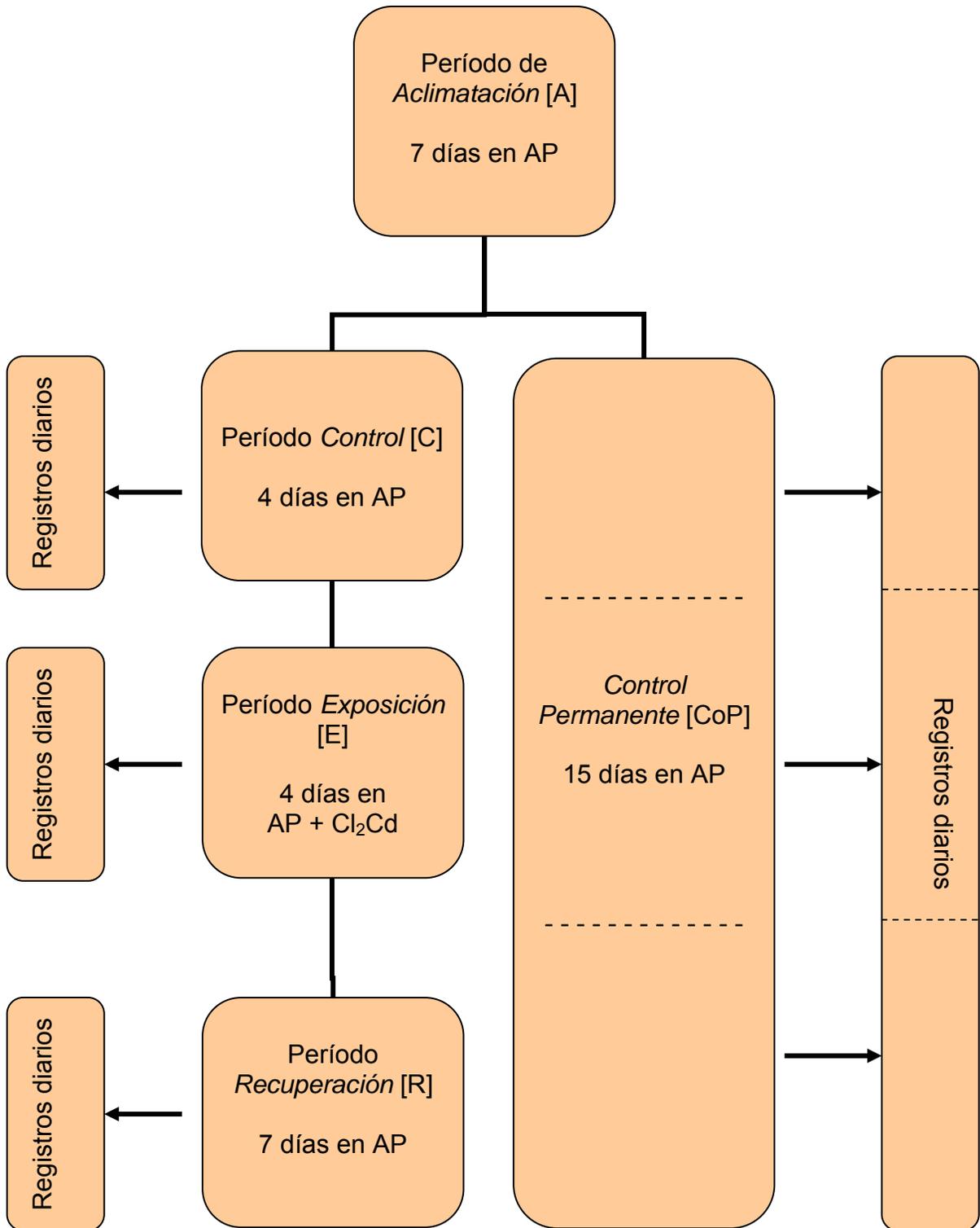


Figura 14. Esquema del diseño experimental.

1.c) Parámetros comportamentales evaluados:

Los muestreos focales, permitieron determinar los siguientes parámetros:

a) *Actividad natatoria total* expresada como el *Índice de Actividad Relativa* (I_a). El mismo se calculó de la siguiente forma:

$$I_a = \frac{\text{promedio de los movimientos totales del período experimental}}{\text{movimientos totales del día } i} \quad [3]$$

donde i = día de la experimentación

Cuando $I_a = 1$ no se produjeron cambios en la actividad natatoria total, mientras que un $I_a > 1$ indica que ocurrió una disminución en la actividad natatoria; lo contrario corresponde cuando $I_a < 1$.

En el Cuadro 1 se presenta un ejemplo hipotético de cálculo del I_a .

CUADRO 1

Dado un individuo que registró un promedio de 3500 movimientos totales durante el período completo (4 o 7 días) y 3500 movimientos durante un muestreo focal (4 horas), su Índice será: $I_a = 3500/3500 = 1$.

Si en el muestreo focal de un día particular del período el número de movimientos es de 3000, el $I_a = 3500/3000 = 1,16$.

Por el contrario, si el número de movimientos de un registro es de 4000, el $I_a = 3500/4000 = 0,88$.

b) *Preferencias espaciales:*

b.1) *Preferencia Altitudinal* como frecuencia de veces (en %) que el animal fue registrado en cada una de las franjas horizontales en los acuarios (identificadas, desde la superficie al fondo, con las letras A, B, C y D respectivamente) (ver Figura 13 b).

b.2) *Preferencia Lateral* como frecuencia de las veces (en %) en que el pez fue registrado en cada una de las franjas verticales en los acuarios (identificadas mediante números, 1 a 5) (ver Figura 13 b).

Los resultados se expresaron como promedios de I_a (para actividad natatoria total) y de porcentajes (para preferencias) \pm ESM.

c) *Distancias de recorrido y Velocidad media de natación*: el cálculo de la velocidad de nado se realizó a partir del registro focal diario automático (durante 4 horas) de la distancia y el tiempo de desplazamiento de los animales mediante el software Jonás 10.1. El mismo brinda la posición del animal y la hora, con lo cual se puede conocer entre que puntos se desplazó y el tiempo que requirió dicho desplazamiento. Se calculó:

c.1) La *distancia media de recorrido*: se obtiene del promedio de las distancias parciales que se calculan según:

$$dn - m = \sqrt{(Xn - Xm)^2 + (Yn - Ym)^2} \quad [4]$$

Los datos se expresan en cm.

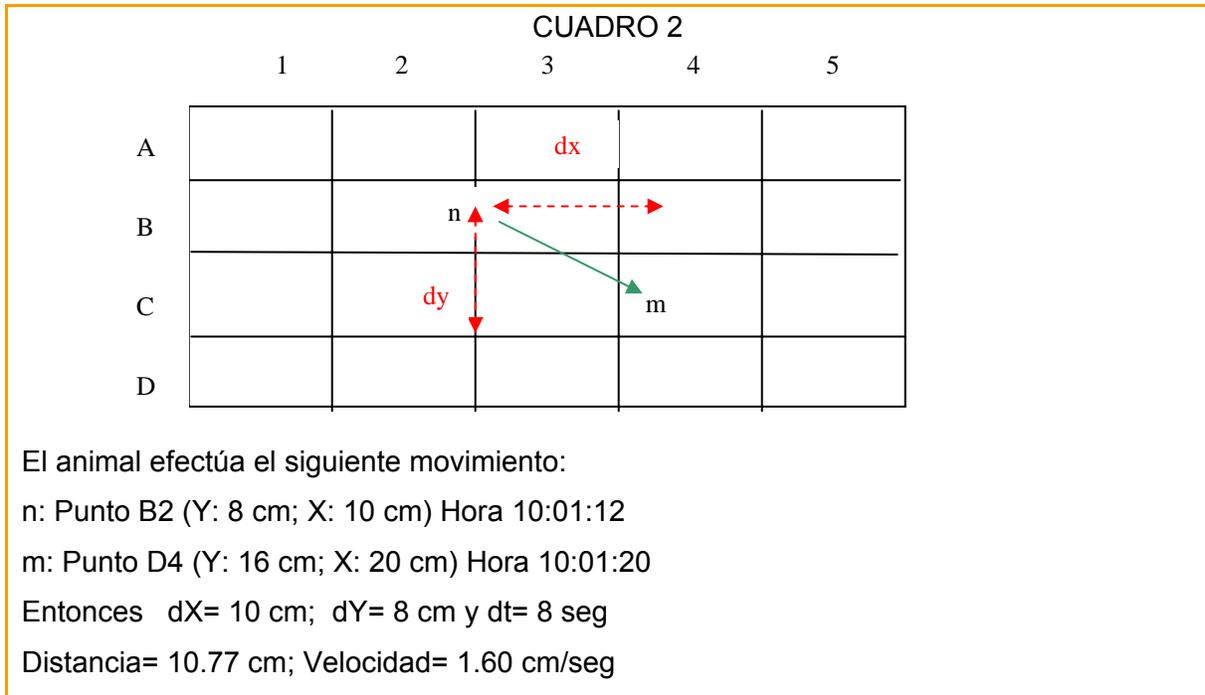
c.2) La *velocidad media de natación* según:

$$V = \frac{dn - m}{dt} \quad [5]$$

En [4] y [5] n: punto de partida; m: punto de llegada

Los datos se expresan en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

En el Cuadro 2 se ilustra con un ejemplo hipotético el procedimiento seguido para determinar estos parámetros:



d) *Series temporales de movimiento*: este análisis se realizó para una hora experimental.

e) *Anexo I: Estudio preliminar de Aplicación*: Efectos de muestras del agua del río Luján sobre *Parámetros Comportamentales* de *Cyprinus carpio*.

2- Registros múltiples y de los síndromes de toxicidad:

2.a) Descripción del equipo:

Se utilizó un acuario con la misma sectorización mostrada en la Figura 13.b. Frente al mismo se montó una mini cámara digital CCTV Modelo DF-335CP conectada mediante un cable de VHS a la computadora. La captura de imágenes para su posterior procesamiento se efectuó mediante el *Digital Video Surveillance System* el cual posee un controlador de tiempo y velocidad de reproducción.

2.b) Diseño experimental:

Condiciones experimentales:

Se colocaron 6 ejemplares de *C. carpio* por pecera. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas para los estudios de Actividad (Página 58). El protocolo experimental constó de dos períodos consecutivos: Control (4 días) y Exposición (5 días) que las utilizadas en los experimentos de Estudio de la Actividad (pág. 58).

En los períodos C y E (0,3 mg Cd.L⁻¹) se realizaron filmaciones diarias de 15 minutos de duración entre las 12:00 y las 12:15 hs; el bioterio era clausurado una hora previa al muestreo para evitar la perturbación de los animales.

2.c) Parámetros comportamentales evaluados:

Las filmaciones, permitieron registrar para cada animal los siguientes parámetros, asociados a la descripción de síndromes de toxicidad de Drummond y col (1986):

- a) Permanencia en la superficie del acuario (Capa A),
- b) Permanencia en el fondo del acuario (Capa D)
- c) Sobrereactividad ³
- d) Aletargamiento ⁴

Los datos de a) y b) fueron evaluados de forma manual mediante el uso de un cronómetro y se expresaron como tiempo (en s); los parámetros c) y d) se indicaron mediante cruces para expresar intensidades relativas de las respuestas de acuerdo a la siguiente escala: x- respuesta nula o escasa; xx- respuesta media; xxx- respuesta de alta intensidad.

³ Drummond y col (1986) lo denominaron *overreactive*.

⁴ Drummond y col (1986) lo denominaron *underreactive*

V- **Biomarcadores Morfológicos:**

1) **Factor de condición (FC):**

A partir de los datos de peso y longitud de los peces, se calculó el Factor de Condición de Fulton (Smolders y col, 2002) según la siguiente ecuación:

$$FC = PH / (\text{longitud})^3 * 100$$

donde: PH: peso húmedo del animal (g), longitud (cm). El FC se indica en g.cm⁻³ multiplicado por 100 para expresiones en porcentaje.

2) **Microscopía electrónica de barrido (MEB) de branquias:**

Algunos de los peces utilizados en los experimentos de Comportamiento fueron empleados para este estudio. Al final de cada período fueron seleccionados ejemplares que se anestesiaron con agua con hielo. Se cortaron las branquias, se lavaron con buffer fosfato de sodio al 1% (pH 7.2) varias veces para eliminar residuos. Luego se fijaron en Glutaraldehido 2.5 % (en buffer fosfato) durante 48 hs. A continuación se procedió a la deshidratación de los tejidos en series de alcohol y acetona (ver Anexo II).

Luego de la deshidratación, las branquias se desecaron con la técnica del Punto Crítico y se revistieron con oro-paladio evaporado. Los órganos se montaron en tacos de bronce, se observaron y tomaron registros fotográficos entre 10 y 15 kv en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL SLM 100 (servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP).

Se fijaron branquias procedentes de:

- a) *Astyanax fasciatus* :
 - a.1) Control (AP)
 - a.2) Exposición: 4 días a 0.3 mg Cd.L⁻¹.
 - a.3) Recuperación (AP)

b) *Australoheros facetum*:

b.1) Control (AP)

b.2) Exposición: 4 días a 0.3 mg Cd.L⁻¹.

b.3) Recuperación (AP)

c) *Cyprinus carpio*:

c.1) Control (AP)

c.2) Exposición: 4 días a 0.3 y 0.5 mg Cd.L⁻¹.

c.3) Recuperación (AP)

Anexo I: Estudio preliminar de Aplicación: Efectos de muestras del agua del río Luján sobre la morfología (MEB) de branquias de *Cyprinus carpio*.

VI- Biomarcadores Fisiológicos (en *Cyprinus carpio*):

a) Diseño experimental:

Las condiciones ambientales fueron iguales a las descritas en la Página 57. Se utilizaron dos acuarios Control y dos con soluciones de Cadmio. Se colocaron 10 animales en cada uno. Cada experimento se desarrolló a lo largo de los siguientes períodos sucesivos (Figura 15):

a) *Aclimatación* [A]

Este período se extendió por 7 días. Durante el mismo los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum*.

b) *Tiempo inicial* (To)

Se retiraron 2 peces de cada acuario en los que se determinaron: peso (PH), longitud, consumo de oxígeno y excreción de NH₄⁺ (ver Anexo II).

c) *Período de registro*

Durante este período, que duró 5 días, se registraron diariamente en los animales remanentes: Ingesta de alimento y la Producción de heces.

En los acuarios de exposición, las concentraciones nominales de Cd^{+2} fueron de: 0.20, 0.30, 0.60 y 2.00 mg.L^{-1} .

d) Tiempo final (Tf)

Luego de los 6 días de registro, en los 5 peces restantes se evaluaron los siguientes parámetros: peso (PH), longitud, consumo de oxígeno y excreción de NH_4^+ (ver Anexo II).

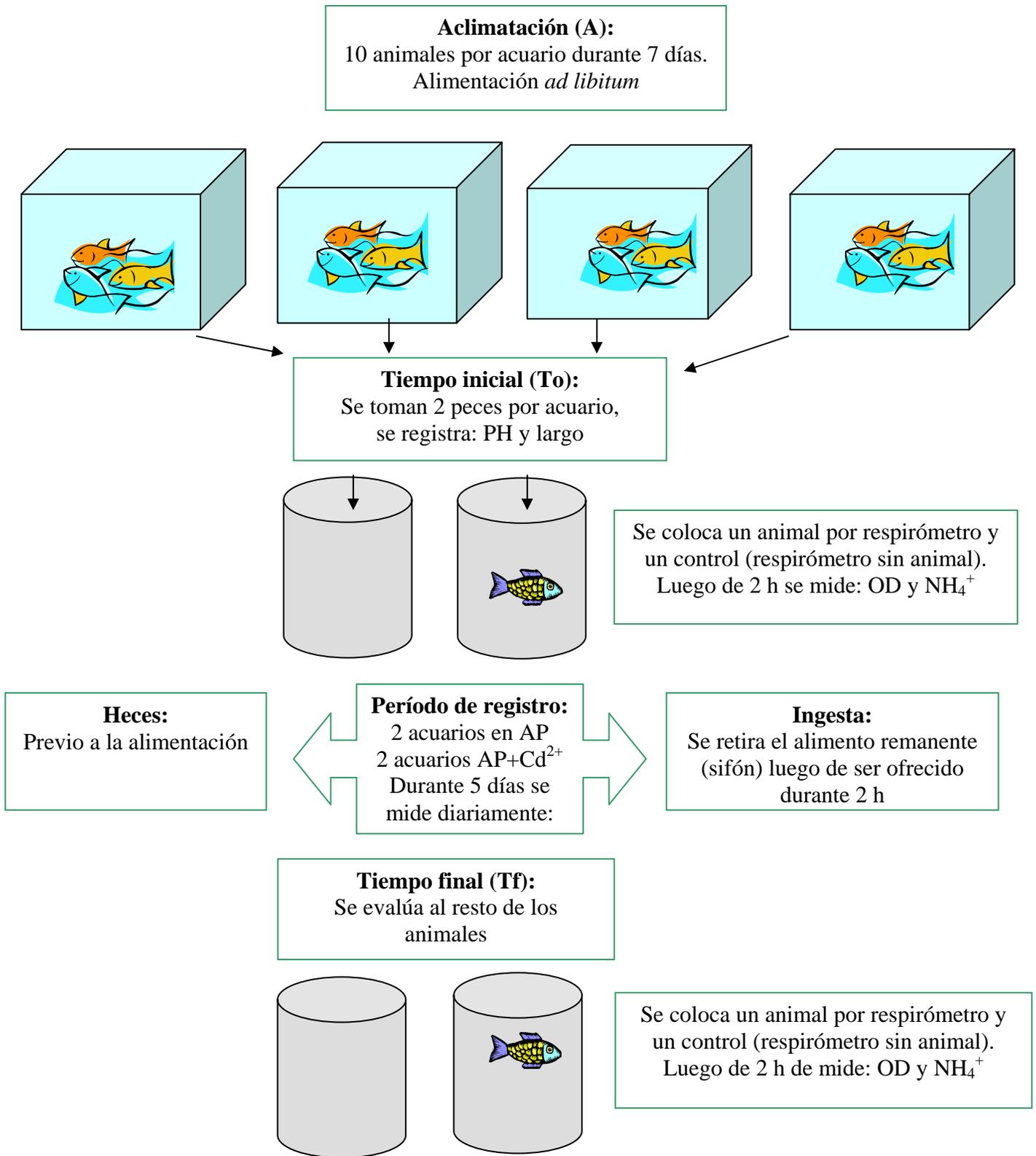


Figura 15. Esquema del diseño experimental para el estudio del efecto del Cd sobre biomarcadores fisiológicos de juveniles de *Cyprinus carpio*.

b) Parámetros fisiológicos evaluados

- a) Ingesta de alimento
- b) Producción de heces
- c) Eficiencia de asimilación (U)
- d) Asimilación neta (A)
- e) Tasa metabólica (TM)
- f) Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO)
- g) Cociente de amonio (CA)
- h) Campo de crecimiento (CC)
- i) Superficie de respuesta: integrando la información de d), e) y g)

a) Ingesta de alimento: se suministró diariamente el 5 % del peso húmedo (promedio) por acuario. El alimento permaneció durante 2 horas, luego de las cuales, el remanente se retiró por sifón. Se filtró y los filtros se secaron a 60°C hasta peso constante (aproximadamente 48 h).

La ingesta se calculó como la diferencia entre el peso del alimento ofrecido y el remanente. Los resultados se expresaron como: *mg (de alimento)/g de PH/día*.

b) Producción de heces: las heces se recolectaron diariamente durante 5 días, empezando 24 horas después de haber retirado el alimento de los acuarios. Se recolectaron mediante sifón, fueron filtradas y el residuo se secó a 60°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron como: *mg (de heces)/g PH/día*

c) Eficiencia de asimilación aparente: se calculó de la siguiente manera:

$$U (\%) = \frac{\text{Ingesta} - \text{Heces}}{\text{Ingesta}} \times 100 \quad [6]$$

Los resultados se expresaron como porcentaje

d) Asimilación neta: se calculó de la siguiente manera:

$$A = \text{Ingesta} - \text{Heces} \quad [7]$$

Los resultados se expresaron como: *J/g PS/día*

e) Tasa metabólica (TM): los peces, se colocaron 45 minutos en recipientes de plástico de un volumen aproximado de 300 ml, con aireación; luego se tomó una muestra de agua para medir el OD inicial (O_i). Después de este período los animales permanecieron por 45 min sin aireación y con el recipiente tapado, se tomó una muestra de agua y se midió el OD final (O_f). El consumo de oxígeno se calculó como la diferencia entre las dos muestras de agua. La Los resultados se expresaron como *mg O₂/hora/g PH*

f) Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO): con los datos registrados en el ítem d) se calculó la eficiencia de extracción de oxígeno según Espina y col (2000) como:

$$EEO(\%) = \frac{(O_i - O_f) * 100}{O_i} \quad [8]$$

Los resultados se expresaron como porcentaje.

g) Cociente de amonio⁵: en los mismos recipientes en los cuales se midió oxígeno se tomó una muestra adicional de agua para determinar la concentración de NH_4^+ . Paralelamente se tomó una medida en un recipiente sin pez (blanco). Las mediciones se realizaron inmediatamente luego de tomar las muestras. El cociente de amonio (CA) se calculó según De Boeck y col (1995) como la relación molar de NH_4^+ excretado y de O_2 consumido (por h/g PH).

$$CA = \frac{NH_4^+ \text{ excretado } (\mu M NH_4/h/g PH)}{O_2 \text{ consumido } (\mu M O_2/h/g PH)} \quad [9]$$

- h) Campo de crecimiento (CC)⁵: se calculó a partir de los datos de Ingesta de alimento, Producción de heces, excreción de NH_4^+ y consumo de O_2 . Se calculó como:

$$\text{CC} = \text{A} - (\text{CA} + \text{TM}) \quad [10]$$

Los datos de consumo de O_2 y excreción de NH_4^+ fueron transformados en Joules. Las conversiones utilizadas fueron las siguientes (Elliot y Davidson 1975):

5.94 cal/mg NH_4^+

3.36 cal/mg O_2

1 Joule = 0.239 Cal

PS = se estimó como el 27% del PH (Wilson y col, 1994a)

Los resultados se expresaron como J/día/g PS

- i) Superficie de respuesta: las relaciones entre la Eficiencia de asimilación (U), el Amonio Excretado (AE) y la Tasa Metabólica (TM) se establecieron mediante ecuaciones polinomiales ($Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_1 x_2$; donde β_0 a β_5 son los coeficientes parciales del polinomio) para estimar la relación entre los regresores U (Eje y), TM (Eje x) y AE (Eje z) para las dos concentraciones ensayadas. Los resultados se visualizan a través de las respectivas Superficies de Respuesta (Montgomery y Peck, 1982).

⁵ Se llevaron a cabo sobre peces mantenidos en 0.20 y 0.30 mg Cd.L⁻¹.

VII- Análisis estadísticos

a) *Comprobación de los Supuestos del ANOVA*

La normalidad se probó con el *test* de Kolmogorov-Smirnov y la del supuesto de homogeneidad de varianzas con el *test* de Barlett.

b) *Biomarcadores comportamentales:*

Para poder comparar los resultados obtenidos con los grupos expuestos al Cd, los valores del grupo *Controles Permanentes* (15 días) se fraccionaron agrupándolos de forma paralela a cada uno de los tres períodos de la serie experimental (Control, Exposición y Recuperación). Previamente se determinó ausencia de diferencias estadísticas entre los mismos (ANOVA de medidas repetidas).

Mediante ANOVA de un factor (especie) de medidas repetidas y el *test* de Tukey, se evaluaron las diferencias en los *Indices de Actividad Relativa* (I_a) entre cada uno de los períodos (C, E y R). Se verificó que los datos cumplieran con los supuestos del ANOVA. En los casos donde no se cumplía homocedacia, también se realizó el *test* no paramétrico de Friedman para medidas repetidas y el de Dunn (Siegel y Castellan, 1998).

Para evaluar las significatividades de las diferencias en las *Preferencias Espaciales* y en los *Registros Múltiples Simultáneos* se realizó un ANOVA de dos factores (período y posición) de medidas repetidas y el *test* de Tukey.

Se utilizó el *Test de t* para evaluar las diferencias entre los períodos experimentales en el análisis de la *velocidad de natación* y las *distancias de recorrido* (media y total).

c) *Biomarcadores fisiológicos:*

Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó un ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo) y el *test* de Tukey o el *test* no paramétrico de Mann-Whitney. Se verificó que los datos cumplieran con los supuestos del ANOVA.

El polinomio obtenido en la Superficie de Respuesta posteriormente fue analizado mediante Regresión Lineal y la correlación de Durbin y Watson.

d) *Paquetes estadísticos utilizados:*

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas InStat 3.01, Sigma Stat, Statistica e InfoStat para Windows.

Resultados

I- Parámetros fisicoquímicos de los medios:

En la Tabla 8 se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos de todas las muestras de los medios tomadas de los acuarios en los que se llevaron a cabo los experimentos de comportamiento, discriminados por período y considerados en conjunto.

Parámetro	Control [C]	Exposición [E]	Recuperación [R]	Total
pH	8,50 ± 0,03 (107)	8,52 ± 0,03 (104)	8,56 ± 0,03 (110)	8,53 ± 0,02 (321)
Oxígeno disuelto (mg.L ⁻¹)	7,58 ± 0,16 (76)	7,66 ± 0,15 (71)	7,97 ± 0,20 (65)	7,74 ± 0,12 (212)
Dureza (mM CaCO ₃)	0,77 ± 0,01 (63)	0,75 ± 0,01 (52)	0,76 ± 0,01 (43)	0,76 ± 0,01 (158)
Conductividad (μS.cm ⁻¹)	877,77 ± 4,72 (25)	845,93 ± 7,45 (13)	861,38 ± 6,28 (13)	861,69 ± 9,19 (51)
Cd nominal (mg.L ⁻¹)	0	0,3	0	–
Cd analítico (mg.L ⁻¹)	<0,02 (86)	0,28 ± 0,01 (116)	<0,02 (86)	–
Cd nominal (mg.L ⁻¹)	0	0,5	0	–
Cd analítico (mg.L ⁻¹)	<0,02 (33)	0,48 ± 0,01 (55)	<0,02 (33)	–
Cd nominal (mg.L ⁻¹)	0	0,6	0	–
Cd analítico (mg.L ⁻¹)	<0,02 (28)	0,66 ± 0,01 (35)	<0,02 (28)	–

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de todos los medios muestreados en cada período (C, E, R) y en conjunto (Total) en los experimentos de Comportamiento. Datos expresados como medias ± ESM; entre paréntesis: número de mediciones.

De los valores obtenidos se puede concluir que el perfil fisicoquímico en los medios de los acuarios se mantuvo constante durante los tres períodos analizados.

En la Tabla 9 se hallan los valores de las concentraciones nominales y analíticas de Cadmio en los medios de los estudios de los Parámetros Fisiológicos.

[Cd ²⁺] (mg.L ⁻¹)	Control [C]	Exposición [E]
Nominal	0	0.20
Analítico	<0.02 (26)	0.20 ± 0.01 (34)
Nominal	0	0.30
Analítico	<0.02 (13)	0.34 ± 0.03 (13)
Nominal	0	0.60
Analítico	<0.02 (13)	0.57 ± 0.03 (13)
Nominal	0	2.00
Analítico	<0.02 (13)	2.19 ± 0.21(13)

Tabla 9. Concentraciones de Cd²⁺ de los medios muestreados en cada período en los estudios de los Biomarcadores Fisiológicos. Datos expresados como medias ± ESM; entre paréntesis: número de mediciones.

II- Parámetros comportamentales:

1) Actividad natatoria total:

En la Tabla 10 se presentan los *Índices de Actividad Relativa* para los grupos Control Permanente (CoP) de las tres especies estudiadas.

Especie	Día 1 a 4	Día 5 a 8	Día 9 a 15	Total (Días 1 a 15)
<i>Cyprinus carpio</i>	1,038±0,120 (28)	1,026±0,120 (28)	1,071±0,114 (49)	1,045±0,118 (105)
<i>Astyanax fasciatus</i>	1,011±0,056 (24)	1,011±0,047 (24)	1,011±0,054 (42)	1,011±0,053 (90)
<i>Australoheros facetum</i>	1,088±0,170 (36)	0,972±0,046 (36)	1,022±0,102 (63)	1,027±0,106 (135)

Tabla 10. Índices de Actividad Relativa (I_a), de los peces Controles Permanentes (CoP). Los datos, discriminados por período y en conjunto (Total), están expresados como medias \pm ESM; entre paréntesis, número de mediciones.

El análisis estadístico de los datos de la Tabla 10 no detectó diferencias significativas en ningún caso, tanto al considerar los datos fraccionados por período o en conjunto los 15 días (última columna de la Tabla 10). Al analizar los I_a totales se aprecia que las tres especies presentaron un valor próximo a 1, lo que indica que no hubo cambios significativos en la actividad natatoria espontánea durante el período experimental.

En las Tablas 11, 12 y 13 están los *Índices de Actividad Relativa* de todos los animales expuestos a las tres concentraciones de Cadmio ensayadas con sus respectivos registros en Controles y luego de su transferencia a medios limpios.

Especie	Día 1 a 4 (C)	Día 5 a 8 (E)	Día 9 a 15 (R)
<i>Cyprinus carpio</i>	1,060 \pm 0,170 (56)	2,850 \pm 1,400 (56)	1,170 \pm 0,180 (98)
<i>Astyanax fasciatus</i>	1,056 \pm 0,124 (36)	1,198 \pm 0,272 (36)	1,624 \pm 0,443 (63)
<i>Australoheros facetum</i>	1,061 \pm 0,128 (60)	3,354 \pm 2,303 (60)	1,343 \pm 0,295 (105)

Tabla 11. Índice de Actividad Relativa (I_a) de los peces Control (C), Expuestos a 0,3 mg Cd.L⁻¹ (E) y a medios limpios (R). Datos expresados como medias \pm ESM; entre paréntesis, número de mediciones.

	Día 1 a 4 (C)	Día 5 a 8 (E)	Día 9 a 15 (R)
<i>Cyprinus carpio</i>	0,815 ± 0,053 (36)	1,550 ± 0.600 (36)	1,070 ± 0.330 (63)
<i>Astyanax fasciatus</i>	1,107 ± 0,169 (28)	1,153 ± 0,202 (35)	1, 515 ± 0,338 (39)
<i>Australoheros facetum</i>	1,003 ± 0.025 (28)	0,895 ± 0, 107 (35)	2,003 ± 0,643 (42)

Tabla 12. Índice de Actividad Relativa (I_a) de los peces Control (C), Expuestos a 0,5 mg Cd.L⁻¹ (E) y a medios limpios (R). Datos expresados como medias ± ESM; entre paréntesis, número de mediciones.

	Día 1 a 4 (C)	Día 5 a 8 (E)	Día 9 a 15 (R)
<i>Cyprinus carpio</i>	0,820 ± 0,080 (16)	1,029 ± 0,102 (16)	1,084 ± 0,316 (28)
<i>Astyanax fasciatus</i>	1,120 ± 0,160 (12)	1,078 ± 0,134 (12)	1,269 ± 0,443 (21)
<i>Australoheros facetum</i>	1,060 ± 0,120 (28)	4,050 ± 2,810 (28)	1,680 ± 0,620 (35)

Tabla 13. Índice de Actividad Relativa (I_a) de los peces Control (C), Expuestos a 0,6 mg Cd.L⁻¹ (E) y a medios limpios (R). Datos expresados como medias ± ESM; entre paréntesis, número de mediciones.

En la Tabla siguiente (14) se muestran las significatividades estadísticas de las diferencias halladas en los I_a entre los tratamientos (datos de Tablas 11, 12 y 13):

Cd^{2+} (mg.L ⁻¹)	Especie	Significatividad estadística		Test	Post test
0,3	<i>C. carpio</i>	C vs E C vs R	P < 0,01 P < 0,01	Friedman	Dunn's
0,5	<i>C. carpio</i>	C vs E	P < 0,01	ANOVA	Tukey
0,6	<i>C. carpio</i>	C vs E C vs R	P < 0,01 P < 0,01	ANOVA	Tukey
0,3	<i>A. fasciatus</i>	C vs R	P < 0,05	ANOVA	Tukey
0,5	<i>A. fasciatus</i>	NS		ANOVA	Tukey
0,6	<i>A. fasciatus</i>	NS		ANOVA	Tukey
0,3	<i>A. facetum</i>	C vs E	P < 0,05	Friedman	Dunn's
0,5	<i>A. facetum</i>	C vs E	P < 0,05	Friedman	Dunn's
0,6	<i>A. facetum</i>	C vs E	P < 0,05	ANOVA	Tukey

Tabla 14. Resumen de los análisis estadísticos de los I_a registrados en los períodos experimentales de *C. carpio*, *A. fasciatus* y *A. facetum*. NS: no significativo

Se registraron diferencias significativas entre el período Control y el de Exposición para *Cyprinus carpio* y *Australoheros facetum* en todas las concentraciones de Cd. En *Cyprinus carpio*, hubo además, diferencias entre los períodos Control y Recuperación para 0,3 y 0,6 mg.L⁻¹. Para *Astyanax fasciatus*, a pesar de que el Índice aumentó en las concentraciones evaluadas, las diferencias demostraron ser significativas solamente entre los períodos Control y Recuperación a 0,3 mg.L⁻¹.

2) Preferencias espaciales:

Estos datos informan acerca de las veces que los peces se encontraron en cada posición durante el tiempo de registro.

2.a) Preferencias Altitudinales:

En las Tablas 15, 16 y 17 se hallan las Preferencias Altitudinales y la significatividad estadística de los datos de las tres especies estudiadas. Se presentan los registros de las localizaciones de los Controles Permanentes (bloque a) y de los expuestos sucesivamente a cada condición (Control, Exposición, Recuperación) (bloques b, c y d), como porcentaje de veces (medias \pm ESM) en que el animal fue detectado en cada una de las capas horizontales durante el tiempo de registro.

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	26,56 ± 7,32 (24)	28,15 ± 9,17 (24)	27,14 ± 9,98 (24)
B	20,60 ± 3,79 (24)	14,98 ± 3,04 (24)	14,41 ± 4,35 (24)
C	21,00 ± 4,16 (24)	18,52 ± 4,13 (24)	17,39 ± 2,81 (24)
D	31,82 ± 10,08 (24)*	38,33 ± 10,03 (24)*	41,03 ± 12,49 (24)*

a

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	30,12 ± 4,55 (56)*	41,43 ± 3,99 (56)*	33,27 ± 3,56 (56)*
B	25,42 ± 2,22 (56)*	33,16 ± 3,01 (56)*	31,01 ± 4,18 (56)*
C	15,34 ± 2,74 (56)	12,25 ± 2,17 (56)	14,47 ± 2,95 (56)
D	29,10 ± 3,38 (56)	13,14 ± 2,31 (56)	21,22 ± 3,17 (56)

b

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	28,40 ± 3,12 (36)*	35,71 ± 3,12 (36)*	23,70 ± 3,27 (36)*
B	18,44 ± 2,71 (36)	18,59 ± 2,80 (36)	23,07 ± 3,67 (36)
C	18,72 ± 2,51 (36)	14,75 ± 2,62 (36)	16,34 ± 1,51 (36)
D	34,42 ± 5,03 (36)*	30,93 ± 4,08 (36)*	36,88 ± 5,38 (36)*

c

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	16,15 ± 5,28 (28)	32,59 ± 14,01 (28)*	28,07 ± 8,16 (28)
B	23,81 ± 5,36 (28)	19,09 ± 6,98 (28)	22,25 ± 8,48 (28)
C	24,55 ± 3,21 (28)	14,23 ± 3,64 (28)	15,84 ± 3,68 (28)
D	35,47 ± 11,65 (28)*	34,08 ± 17,75 (28)*	33,82 ± 14,15 (28)*

d

Tabla 15. Preferencias Altitudinales de *Cyprinus carpio* para Controles Permanentes (a) y Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d); frecuencia porcentual media ± ESM. * Indica las diferencias estadísticas entre las capas de cada período. Entre paréntesis número de determinaciones. A: capa superficial, B y C: capas intermedias; D: capa profunda.

Cyprinus carpio:

En la Tabla 15.a, se observa que las carpas, luego de su permanencia por 15 días en agua potable, CoP, mostraron una preferencia por el fondo del acuario, hallándose el 32 - 41% de las veces en la capa D, con en una tendencia al aumento con el tiempo. El *test* de Tukey mostró diferencias significativas para esa posición, comparada con el resto de las franjas.

En las carpas Expuestas a $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabla 15.b) se encontraron diferencias significativas entre las capas A y B y las C y D, mostrando una tendencia a preferir las capas superficiales durante la exposición al Cd.

En la exposición a $0,5$ y $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabla 15 c y d) se observó una respuesta muy similar entre ambos grupos: los animales se distribuyeron la mayor cantidad de veces en las capas superficiales y profundas. Se observaron diferencias significativas entre las capas A y D versus las B y C para ambas concentraciones de Cadmio.

En estos peces se observó una Recuperación incompleta.

Con respecto al análisis del comportamiento en cada capa, entre los períodos C, E y R, no se encontraron diferencias significativas, ni para los CoP ni para los Expuestos. Cabe señalar que las frecuencias de los Controles, en los cuatro grupos de peces, presentaron casi siempre valores comparables entre sí.

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	20,20 ± 2,95 (36)	24,34 ± 3,86 (36)	18,99 ± 3,25 (36)
B	23,13 ± 5,10 (36)	23,98 ± 4,96 (36)	20,33 ± 0,80 (36)
C	29,26 ± 3,30 (36)*	25,04 ± 5,38 (36)*	30,33 ± 5,76 (36)*
D	27,41 ± 4,76 (36)*	26,64 ± 1,44 (36)*	30,34 ± 6,21 (36)*

a

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	20,01 ± 3,33 (60)	43,20 ± 5,99 (60)*	22,51 ± 2,77 (60)
B	18,47 ± 2,70 (60)	22,20 ± 2,88 (60)	18,85 ± 1,99 (60)
C	22,06 ± 2,58 (60)	15,02 ± 1,96 (60)	19,46 ± 2,11 (60)
D	39,44 ± 4,14 (60)*	19,56 ± 5,08 (60)	39,15 ± 4,91 (60)*

b

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	16,72 ± 4,49 (28)	45,18 ± 8,00 (28)*	16,97 ± 3,01 (28)
B	28,77 ± 4,68 (28)	17,05 ± 2,88 (28)	21,34 ± 3,66 (28)
C	30,56 ± 1,81 (28)	15,52 ± 3,74 (28)	27,98 ± 2,02 (28)
D	23,93 ± 2,84 (28)	22,23 ± 3,02 (28)	33,70 ± 5,99 (28)

c

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	20,80 ± 3,74 (28)	39,16 ± 6,93 (28)*	17,58 ± 3,97 (28)
B	19,44 ± 2,61 (28)	20,44 ± 4,05 (28)	14,95 ± 3,02 (28)
C	20,88 ± 3,10 (28)	17,59 ± 2,06 (28)	17,30 ± 2,23 (28)
D	38,85 ± 3,05 (28)*	22,78 ± 7,36 (28)	50,15 ± 6,10 (28)*

d

Tabla 16. Preferencias Altitudinales de *Australoheros facetum* para Controles Permanentes (a) y Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d) frecuencia porcentual media ± ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las capas de cada período. Entre paréntesis número de determinaciones. A: capa superficial, B y C: capas intermedias; D: capa profunda.

Australoheros facetum:

De los datos de la Tabla 16.a se desprende que las chanchitas CoP mostraron una preferencia, igual que las carpas, por el fondo del acuario, dado que permanecieron de manera estable la mayor parte del tiempo (52 - 61 %) en las capas C y D (aunque la preferencia por la última no fue tan concluyente como en *C. carpio*). Los aumentos del tercer período se debieron a una ligera migración desde las dos capas superiores y encontrándose diferencias significativas entre éstas y el resto.

Por el contrario, el análisis estadístico puso en evidencia que el Cd afecta a la posición de estos peces; las chanchitas expuestas a 0,3 mg.L⁻¹ (Tabla 16.b) mostraron claramente su preferencia por la capa superficial del acuario; el mismo patrón de comportamiento se repitió a 0,5 y 0,6 mg.L⁻¹ (Tabla 16 b,c). En todos los casos se apreció una recuperación prácticamente completa cuando el medio contaminado fue reemplazado por otro “limpio”.

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	39,87 ± 4,55 (24)*	37,24 ± 5,77 (24)*	43,09 ± 9,47 (24)*
B	15,44 ± 2,16 (24)	29,81 ± 5,13 (24)	22,08 ± 7,59 (24)
C	12,95 ± 5,81 (24)	7,66 ± 4,27 (24)	8,47 ± 4,00 (24)
D	31,72 ± 2,73 (24)	25,28 ± 3,44 (24)	26,35 ± 2,14 (24)

a

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	30,79 ± 5,46 (36)	27,36 ± 5,93 (36)	23,53 ± 7,13 (36)
B	6,14 ± 1,53 (36)	12,51 ± 3,61 (36)	14,36 ± 2,49 (36)
C	14,54 ± 1,39 (36)	13,01 ± 2,58 (36)	21,30 ± 4,80 (36)
D	48,53 ± 4,35 (36)*	47,10 ± 6,76 (36)*	40,79 ± 5,99 (36)*

b

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	22,21 ± 7,16 (28)	32,61 ± 7,63 (28)	33,13 ± 7,92 (28)*
B	22,30 ± 8,53 (28)	20,74 ± 7,92 (28)	25,59 ± 7,88 (28)
C	15,64 ± 2,49 (28)	14,49 ± 3,08 (28)	14,59 ± 3,03 (28)
D	39,83 ± 10,57 (28)*	32,14 ± 8,12 (28)*	26,66 ± 6,39 (28)

c

Capa	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
A	28,99 ± 13,21 (28)	31,32 ± 12,26 (28)	27,90 ± 12,46 (28)
B	38,63 ± 15,93 (28)*	33,76 ± 14,81 (28)	41,23 ± 13,84 (28)*
C	14,00 ± 4,76 (28)	15,37 ± 4,26 (28)	14,31 ± 3,24 (28)
D	18,36 ± 5,41 (28)	19,56 ± 3,59 (28)	16,55 ± 7,02 (28)

d

Tabla 17. Preferencias Altitudinales de *Astyanax fasciatus* para Controles Permanentes (a) y Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d) frecuencia porcentual media ± ESM. * Indica diferencias significativas. Entre paréntesis número de determinaciones. A: capa superficial, B y C: capas intermedias; D: capa profunda.

Astyanax fasciatus:

Puede observarse que las mojaras presentaron otro tipo de comportamiento diferente del de las especies anteriores. En este caso los Controles Permanentes (Tabla 17.a) mostraron una localización preferencial en los extremos del acuario, especialmente por la capa A.

Las de 0.3 y 0.5 mg Cd.L⁻¹ (Tabla 17.b y c) prefirieron el fondo del acuario en los tres períodos, esto es, no modificaron sus preferencias; sólo puede apreciarse que en Cd 0.5 mg Cd.L⁻¹ los peces prefirieron permanecer la mayor parte de las veces en las capas A y D. En ambos casos las preferencias señaladas fueron mayores que en los CoP y los valores no marcaron diferencias atribuibles al metal.

A diferencia de lo ocurrido en las otras dos especies, los cambios ocurridos en las preferencias altitudinales en 0,5 mg Cd.L⁻¹ no retornaron a los valores del período control.

En la Tabla 18 se presenta un resumen de los resultados del análisis estadístico de las preferencias altitudinales.

Cd ²⁺ (mg.L ⁻¹)	Especie	Diferencias halladas (p<0.05)		
		Control	Exposición	Recuperación
0,3	<i>C. carpio</i>	A y B vs C y D	A y B vs C y D	A y B vs C y D
0,5	<i>C. carpio</i>	A y D vs B y C	A y D vs B y C	A y D vs B y C
0,6	<i>C. carpio</i>	D vs A, B y C	D vs A, B y C	D vs A, B y C
0,3	<i>A. facetum</i>	D vs A, B y C	A vs B, C y D	D vs A, B y C
0,5	<i>A. facetum</i>		A vs B, C y D	
0,6	<i>A. facetum</i>	D vs A, B y C	A vs B, C y D	D vs A, B y C
0,3	<i>A. fasciatus</i>	D vs A, B y C	D vs A, B y C	D vs A, B y C
0,5	<i>A. fasciatus</i>	D vs A, B y C	D vs A, B y C	A vs B, C y D
0,6	<i>A. fasciatus</i>	B vs A, C y D		B vs A, C y D

Tabla 18. Resumen de los análisis estadísticos de las Preferencias Altitudinales registradas en los períodos experimentales de *C. carpio*, *A. facetum* y *A. fasciatus*. (Datos considerados: bloques b, c y d de las Tablas 15, 16 y 17).

2.b) Preferencias Laterales:

En las Tablas 19, 20 y 21 se encuentran las Preferencias Laterales y la significatividad estadística de los registros. Se presentan los de las localizaciones de los Controles Permanentes (bloque a) y las de los expuestos sucesivamente a cada condición (Control, Exposición, Recuperación) (bloques b, c y d); los resultados están expresados como porcentaje de veces (medias \pm ESM) en que el animal fue detectado en cada una de las franjas verticales durante el tiempo de registro.

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	25,15 ± 3,01 (24)*	26,82 ± 6,35 (24)*	32,43 ± 8,18 (24)*
2	14,59 ± 2,27 (24)	14,51 ± 2,68 (24)	12,23 ± 3,11 (24)
3	17,59 ± 3,09 (24)	19,65 ± 3,43 (24)	13,62 ± 2,78 (24)
4	14,75 ± 1,71 (24)	16,66 ± 2,28 (24)	12,02 ± 3,06 (24)
5	27,89 ± 7,18 (24)*	22,33 ± 2,57 (24)*	29,68 ± 7,17 (24)*

a

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	26,95 ± 2,93 (56)*	26,30 ± 3,21 (56)*	27,69 ± 5,18 (56)*
2	19,07 ± 3,18 (56)	15,25 ± 1,34 (56)	12,48 ± 1,80 (56)
3	21,49 ± 4,56 (56)	22,62 ± 4,43 (56)	18,95 ± 4,51 (56)
4	14,54 ± 2,35 (56)	12,17 ± 1,69 (56)	12,96 ± 3,13 (56)
5	17,92 ± 2,78 (56)	23,64 ± 4,30 (56)	27,88 ± 7,14 (56)*

b

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	29,34 ± 3,29 (36)*	29,51 ± 5,24 (36)*	37,54 ± 6,27 (36)*
2	16,39 ± 2,35 (36)	15,37 ± 2,46 (36)	15,50 ± 2,28 (36)
3	17,04 ± 2,31 (36)	16,78 ± 3,83 (36)	12,60 ± 1,18 (36)
4	12,97 ± 1,50 (36)	11,20 ± 1,51 (36)	12,87 ± 2,78 (36)
5	24,23 ± 3,69 (36)*	27,13 ± 3,81 (36)*	21,47 ± 6,60 (36)*

c

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	26,31 ± 5,61 (28)*	31,42 ± 6,15 (28)*	25,85 ± 5,22 (28)*
2	15,51 ± 2,18 (28)	19,15 ± 4,53 (28)	16,05 ± 4,36 (28)
3	11,41 ± 1,81 (28)	10,94 ± 1,41 (28)	11,96 ± 1,27 (28)
4	12,80 ± 1,72 (28)	12,75 ± 1,63 (28)	12,86 ± 0,87 (28)
5	33,94 ± 3,60 (28)*	25,72 ± 3,09 (28)*	33,26 ± 7,12 (28)*

d

Figura 19. Preferencias Laterales de *Cyprinus carpio* para Controles Permanentes (a) y Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d); frecuencia porcentual media ± ESM. * Indica diferencias estadísticas. Entre paréntesis número de determinaciones. 1: franja en la cual se produce el goteo de las soluciones.

Cyprinus carpio:

En la Tabla 19 se puede apreciar que las carpas CoP (19.a) mostraron una acentuada preferencia por los extremos laterales del acuario, ubicándose la mayor parte del tiempo y por igual en las franjas 1 y 5. Este comportamiento fue confirmado por el análisis estadístico de los datos experimentales; se hallaron diferencias significativas al contrastar los valores correspondientes a la franja 1 y 5 y las 2, 3 y 4.

Ese claro perfil de preferencias laterales en los peces CoP no se modificó sustancialmente en los que estuvieron Expuestos a $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd (Tabla 19.b), ya que solamente la franja vertical 1 difirió del resto de las posiciones, indicando que luego de su exposición a esa concentración del metal la tendencia de su distribución fue hacia la uniformidad, con valores comparables con sus controles. En la exposición a $0,5$ y $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabla 19.b.c) se observó el mismo patrón que el de los CoP, en los que los animales volvieron a ser registrados la mayor parte de las veces, preferentemente, en los extremos de los acuarios (franjas 1 y 5).

El ANOVA (Tabla 22) no detectó diferencias significativas entre los períodos C, E y R ni para los Controles Permanentes ni para los Expuestos al metal.

En suma, puede afirmarse que el metal no afectó las preferencias laterales de las carpas respecto de las halladas en los controles. Cabe señalar que tampoco se evidenciaron comportamientos inequívocos de escape de la franja correspondiente al sitio de goteo de las soluciones de Cd.

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	23,31 ± 9,42 (36)	21,54 ± 3,01 (36)	33,36 ± 9,92 (36)
2	25,12 ± 3,52 (36)	25,71 ± 6,36 (36)	18,75 ± 1,08 (36)
3	11,83 ± 4,31 (36)	16,37 ± 3,84 (36)	15,58 ± 2,85 (36)
4	12,11 ± 4,00 (36)	17,36 ± 7,08 (36)	13,46 ± 3,96 (36)
5	27,60 ± 7,29 (36)	19,01 ± 4,97 (36)	18,84 ± 2,74 (36)

a

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	29,55 ± 6,08 (60)	22,51 ± 5,81 (60)	27,42 ± 4,15 (60)
2	17,92 ± 3,37 (60)	16,73 ± 3,75 (60)	18,89 ± 5,55 (60)
3	14,99 ± 2,22 (60)	13,00 ± 3,51 (60)	9,33 ± 1,72 (60)
4	16,61 ± 3,38 (60)	18,32 ± 4,85 (60)	16,57 ± 2,01 (60)
5	20,91 ± 4,69 (60)	29,43 ± 5,58 (60)	27,77 ± 4,99 (60)

b

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	35,08 ± 2,21 (28)*	38,94 ± 6,49 (28)*	39,14 ± 9,29 (28)*
2	14,43 ± 0,87 (28)	14,70 ± 2,72 (28)	12,02 ± 2,56 (28)
3	21,12 ± 1,82 (28)	11,25 ± 1,80 (28)	16,34 ± 3,46 (28)
4	22,44 ± 0,78 (28)	9,51 ± 3,84 (28)	15,16 ± 1,74 (28)
5	6,92 ± 2,60 (28)	25,60 ± 7,69 (28)	17,33 ± 9,06 (28)

c

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	29,55 ± 6,08 (28)*	22,51 ± 5,80 (28)	27,42 ± 4,15 (28)*
2	17,92 ± 3,37 (28)	16,73 ± 3,75 (28)	18,89 ± 5,55 (28)
3	14,99 ± 2,22 (28)	13,00 ± 3,51 (28)	9,33 ± 1,72 (28)
4	16,61 ± 3,38 (28)	18,32 ± 4,85 (28)	16,57 ± 2,01 (28)
5	20,91 ± 4,69 (28)	29,43 ± 5,58 (28)*	27,76 ± 4,99 (28)*

d

Tabla 20. Preferencias Laterales de *Australoheros facetum* Controles Permanentes (a); Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d) frecuencia porcentual media ± ESM. * Indica diferencias estadísticas. Entre paréntesis número de determinaciones. 1: franja en la cual se produce el goteo de la solución.

Australoheros facetum:

Puede observarse que los CoP (Tabla 20.a) de las chanchitas presentaron un comportamiento distinto del exhibido por las carpas. En esta especie no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la Preferencia Lateral, mostrándose una permanencia temporal relativamente uniforme de los individuos en cada franja.

De la misma manera, en los peces que estuvieron expuestos a 0,3 y 0,5 mg.L⁻¹ (Tabla 20.b,c) del contaminante tampoco se encontraron diferencias significativas en sus tiempos de permanencia en favor de alguna franja particular aunque considerando los datos en conjunto la tendencia fue a ubicarse en la mas alejada del sitio de goteo del tóxico. En los animales en 0,6 mg.L⁻¹ (Tabla 20.d) se observó una ligera tendencia al agrupamiento en extremo opuesto al cual se produce el goteo. Estos comportamientos no se modificaron durante los períodos de Recuperación.

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	31,46 ± 4,98 (24)*	46,21 ± 3,67 (24)*	40,96 ± 8,24 (24)*
2	26,16 ± 4,24 (24)	24,79 ± 5,09 (24)	18,80 ± 9,01 (24)
3	15,77 ± 2,19 (24)	10,19 ± 3,43 (24)	15,69 ± 5,61 (24)
4	11,76 ± 2,33 (24)	12,80 ± 2,80 (24)	13,67 ± 3,34 (24)
5	14,85 ± 4,23 (24)	6,00 ± 2,40 (24)	10,87 ± 5,29 (24)

a

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	16,97 ± 3,57 (36)	16,21 ± 2,13 (36)	14,70 ± 2,67 (36)
2	19,07 ± 2,33 (36)	16,98 ± 2,89 (36)	15,71 ± 3,16 (36)
3	20,49 ± 5,45 (36)	28,37 ± 6,98 (36)	24,13 ± 7,41 (36)
4	19,43 ± 5,55 (36)	21,27 ± 8,78 (36)	19,43 ± 7,36 (36)
5	24,04 ± 6,32 (36)	17,16 ± 1,99 (36)	26,03 ± 4,64 (36)

b

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	17,26 ± 1,22 (28)	22,97 ± 8,70 (28)	18,30 ± 6,36 (28)
2	11,89 ± 4,89 (28)	15,02 ± 4,79 (28)	20,24 ± 4,86 (28)
3	26,62 ± 1,90 (28)	26,38 ± 10,79 (28)	26,86 ± 9,31 (28)
4	29,35 ± 3,47 (28)	22,41 ± 9,50 (28)	20,14 ± 8,57 (28)
5	14,87 ± 7,87 (28)	13,19 ± 4,25 (28)	14,46 ± 2,84 (28)

c

Franja	Control (C)	Exposición (E)	Recuperación (R)
1	25,72 ± 3,59 (28)*	22,50 ± 4,72 (28)*	26,17 ± 4,69 (28)*
2	17,36 ± 2,73 (28)	16,28 ± 4,47 (28)	15,37 ± 1,64 (28)
3	16,78 ± 2,09 (28)	14,36 ± 2,93 (28)	12,62 ± 2,51 (28)
4	16,92 ± 2,81 (28)	14,10 ± 3,07 (28)	17,21 ± 2,17 (28)
5	23,20 ± 4,19 (28)*	32,74 ± 4,44 (28)*	28,61 ± 3,62 (28)*

d

Tabla 21. Preferencias Laterales de *Astyanax fasciatus* para Controles Permanentes (a) y Expuestos a Cadmio: 0,3 (b); 0,5 (c) y 0,6 mg.L⁻¹ (d) frecuencia porcentual media ± ESM. *Indica diferencias estadísticas. Entre paréntesis número de determinaciones. 1: franja en la cual se produce el goteo de la solución.

Astyanax fasciatus:

En las mojaras que permanecieron 15 días continuos en agua potable (CoP) (Tabla 21.a) se encontraron diferencias significativas mostrando una acentuada preferencia por la franja 1 del acuario; así, entre el 60 y el 70% del tiempo los peces fueron localizados en las franjas 1 y 2.

En los expuestos a 0,3 y 0,5 mg.L⁻¹ de Cd (Tabla 21.b,c), ese perfil de distribución lateral se perdió completamente: no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las franjas verticales, indicando, que los peces se distribuyeron de manera aproximadamente uniforme; este comportamiento no se modificó en el período siguiente de Recuperación. En los expuestos a 0,6 mg.L⁻¹ (Tabla 21.d) se observó una tendencia a permanecer la mayor parte de las veces en las franjas extremas (1 y 5) del acuario, que en la Recuperación tampoco se revirtió, aunque los valores se aproximaron a los del período control.

En la Tabla 22 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el análisis estadístico de las preferencias laterales.

Cd ²⁺ (mg.L ⁻¹)	Especie	Diferencias halladas (p<0.05)		
		Control	Exposición	Recuperación
0,3	<i>C. carpio</i>	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5
0,5	<i>C. carpio</i>	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5
0,6	<i>C. carpio</i>	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5
0,3	<i>A. facetum</i>			
0,5	<i>A. facetum</i>	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5	1 vs 2, 3, 4 y 5
0,6	<i>A. facetum</i>	1 vs 2, 3, 4 y 5	5 vs 1, 2, 3 y 4	1 vs 2, 3, 4 y 5
0,3	<i>A. fasciatus</i>			
0,5	<i>A. fasciatus</i>			
0,6	<i>A. fasciatus</i>	1 y 5 vs 2, 3 y 4	1 y 5 vs 2, 3 y 4	1 y 5 vs 2, 3 y 4

Tabla 22. Resumen de los análisis estadísticos de los obtenidos para las Preferencias laterales registradas en los períodos experimentales de *C. carpio*, *A. facetum* y *A. fasciatus*. (Datos considerados: bloques b,c y d de las Tablas 19, 20 y 21).

3) Velocidad media de natación y distancia media de recorrido:

En las Tablas 23, 24 y 25 se muestran los resultados correspondientes a los cambios ocurridos en la velocidad media de natación (a) y distancia de recorrido media (b) de *Cyprinus carpio*, *Australoheros facetum* y *Astyanax fasciatus* respectivamente, Controles Permanentes (CoP) y expuestos a las tres concentraciones de Cadmio.

Cyprinus carpio:

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	10,1 ± 1,01 (N=7)	9,5 ± 0,76 (N=7)	11,6 ± 1,55 (N=7)
0.3	5,2 ± 0,03 (N=14)	5,9 ± 0,07 (N=14)	6,8 ± 0,01 (N=14)*
0.5	3,6 ± 0,20 (N=9)	7,2 ± 0,01 (N=9)*	5,6 ± 0,02 (N=9)
0.6	8,5 ± 0,02 (N=7)	21,3 ± 0,04 (N=7)*	7,7 ± 0,02 (N=7)

a

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	11,4 ± 0,10 (N=7)	12,2 ± 0,21 (N=7)	12,0 ± 0,11 (N=7)
0.3	15,5 ± 0,50 (N=14)	16,8 ± 0,60 (N=14)	11,0 ± 0,60 (N=14)
0.5	12,4 ± 0,40 (N=9)	18,3 ± 0,81 (N=9)*	17,3 ± 0,60 (N=9)
0.6	14,3 ± 0,42 (N=7)	17,8 ± 0,53 (N=7)	25,3 ± 0,80 (N=7)*

b

Tabla 23. a) Velocidad media de natación (cm/s) y b) Distancia de recorrido media (cm) durante el registro de 4 horas de *Cyprinus carpio*. Valores promedio ± ESM. * Indica diferencias significativas entre períodos experimentales.

Para la *velocidad media* (Tabla 23.a), en los CoP no se observan variaciones significativas en la velocidad, el análisis estadístico mostró aumentos significativos entre Control y Expuestos a 0,5 y 0,6 mg Cd.L⁻¹; los cambios

retornaron a valores comparables con los del período control durante la Recuperación. Si bien a 0,3 mg Cd.L⁻¹ se observó un aumento de la velocidad tanto en la Exposición como en la Recuperación, sólo este último difirió significativamente.

La *distancia media de recorrido* (Tabla 23.b), los CoP no muestran variaciones, se registraron aumentos significativos en los animales expuestos a 0,5 y 0,6 mg.L⁻¹; estos cambios no se modificaron en los períodos de Recuperación; en 0,3 mg.L⁻¹ no hubo alteraciones importantes.

Australoheros facetum:

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	6.5 ± 1.21 (N=9)	5.0 ± 0.55 (N=9)	4.39 ± 0.81 (N=9)
0.3	4,1 ± 0,30 (N=15)	5,9 ± 0,30 (N=15)	5,7 ± 0,10 (N=15)
0.5	3,9 ± 0,04 (N=7)	7,9 ± 0,01 (N=7)*	6,5 ± 0,02 (N=7)
0.6	5,7 ± 0,10 (N=7)	9,2 ± 0,21 (N=7)*	9,1 ± 0,02 (N=7)

a

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	14,9 ± 1,10 (N=9)	15,5 ± 0,55 (N=9)	15,1 ± 0,43 (N=9)
0.3	15,2 ± 1,02 (N=15)	16,6 ± 0,52 (N=15)	16,1 ± 0,40 (N=15)
0.5	12,2 ± 0,84 (N=7)	19,0 ± 0,21 (N=7)*	15,4 ± 0,30 (N=7)
0.6	13,1 ± 1,03 (N=7)	23,2 ± 0,80 (N=7)*	20,6 ± 0,81 (N=7)

b

Tabla 24. a) Velocidad media (cm/s) y b) Distancia de recorrido media (cm) durante el registro de 4 horas de *Australoheros facetum*. Valores promedio ± ESM. * Indica diferencias significativas entre períodos experimentales.

Al igual que en las carpas en los CoP no se registraron variaciones significativas en la *velocidad media* (Tabla 24.a). Ese parámetro mostró aumentos estadísticamente significativos entre Control y Expuestos a 0,5 y 0,6 mg.L⁻¹. En el período de Recuperación el retorno a los valores Control no fue completo.

Para la *distancia media de recorrido* (Tabla 24.b) se hallaron aumentos significativos en los animales expuestos a 0,5 y 0,6 mg.L⁻¹ cuyos valores, tampoco se restablecieron a los niveles de los controles.

Astyanax fasciatus:

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	7,4 ± 0,41 (N=6)	7,0 ± 1,07 (N=6)	7,2 ± 1,16 (N=6)
0.3	7,6 ± 0,12 (N=9)	12,0 ± 0,10 (N=9)*	7,2 ± 0,14 (N=9)
0.5	8,0 ± 0,16 (N=7)	13,1 ± 0,16 (N=7)*	12,1 ± 0,21 (N=7)
0.6	7,3 ± 0,05 (N=7)	17,6 ± 0,11 (N=7)*	9,1 ± 0,02 (N=7)

a

[Cd ²⁺] mg.L ⁻¹	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
CoP	10,9 ± 0,46 (N=6)	11,3 ± 0,55 (N=6)	11,0 ± 0,32 (N=6)
0.30	11,7 ± 0,50 (N=9)	17,3 ± 0,6 (N=9)	12,8 ± 0,05 (N=9)
0.50	16,2 ± 0,31 (N=7)	22,4 ± 1,5 (N=7)	15,3 ± 0,15 (N=7)
0.60	10,0 ± 0,24 (N=7)	14,6 ± 0,4 (N=7)*	11,3 ± 0,33 (N=7)

b

Tabla 25. a) Velocidad media (cm/s) y b) Distancia de recorrido media (cm) durante el registro de 4 horas de *Astyanax fasciatus*. Valores promedio ± ESM. * Indica diferencias significativas entre períodos experimentales.

En los CoP de las mojarra no se observan variaciones significativas en la *velocidad media* (Tabla 25.a); el análisis estadístico mostró aumentos importantes

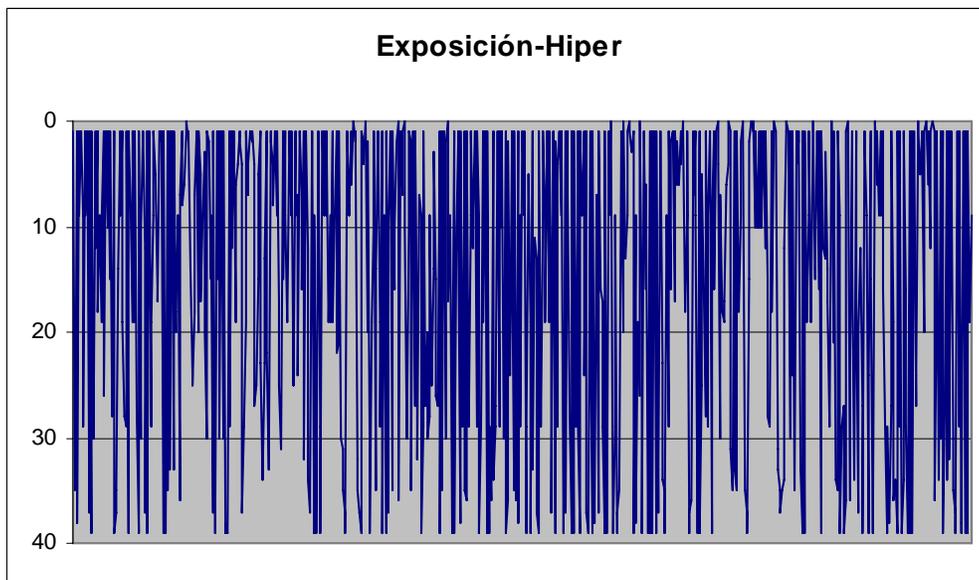
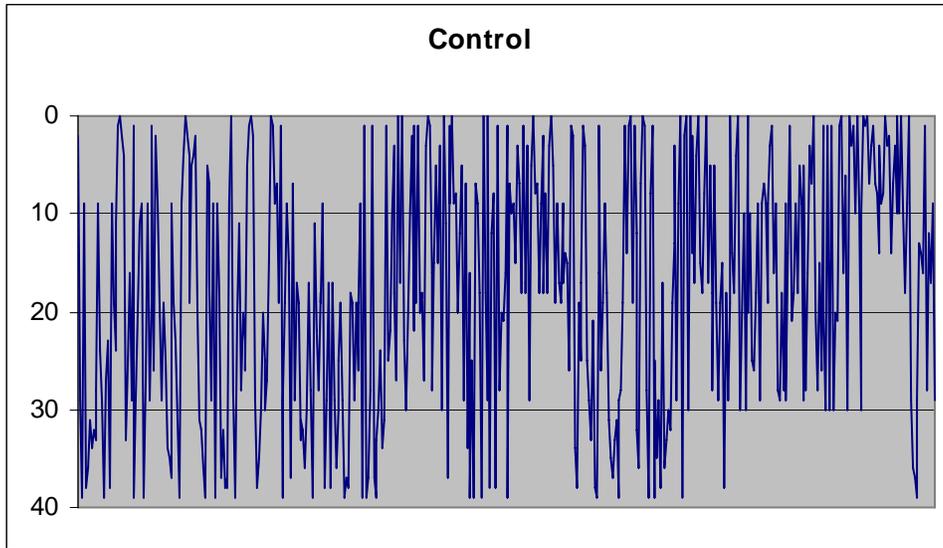
y significativos entre Control y Expuestas a las tres concentraciones de Cadmio ensayadas. En el período de Recuperación las velocidades retornaron a los valores basales especialmente en las expuestas a 0.3 y 0.6 mg.L⁻¹. En los CoP.

La *distancia media de recorrido* (Tabla 25.b) aumentó en los tres grupos pero sólo las diferencias en los animales expuestos a 0.6 mg.L⁻¹ fueron estadísticamente significativas. Cabe señalar que todos los aumentos registrados en los medios con Cd exhibieron claras tendencias de reversibilidad en el último período experimental.

4) Espectros temporales de movimiento:

En la Figura 16 se muestra uno de los registros correspondientes al patrón de natación de *Cyprinus carpio* durante una hora. Se pueden observar el comportamiento normal de este parámetro y luego de la exposición a la concentración más alta de Cd (0,5 mg.L⁻¹).

En los análisis de los patrones de natación se puede observar que: a) en el período Control el movimiento es aleatorio, es decir, que se mueven de forma constante y por todas las profundidades del acuario; b) en la Exposición los animales presentan dos períodos: 1) de hipoactividad: en la cual los animales reducen sus movimientos a lo largo del tiempo y no se observa preferencia por alguna profundidad; 2) de hiperactividad: los animales aumentan de forma notable su actividad y los movimientos siguen siendo aleatorios; c) durante la Recuperación los animales reducen nuevamente su actividad y muestran preferencia por las capas superficiales y profundas del acuario.



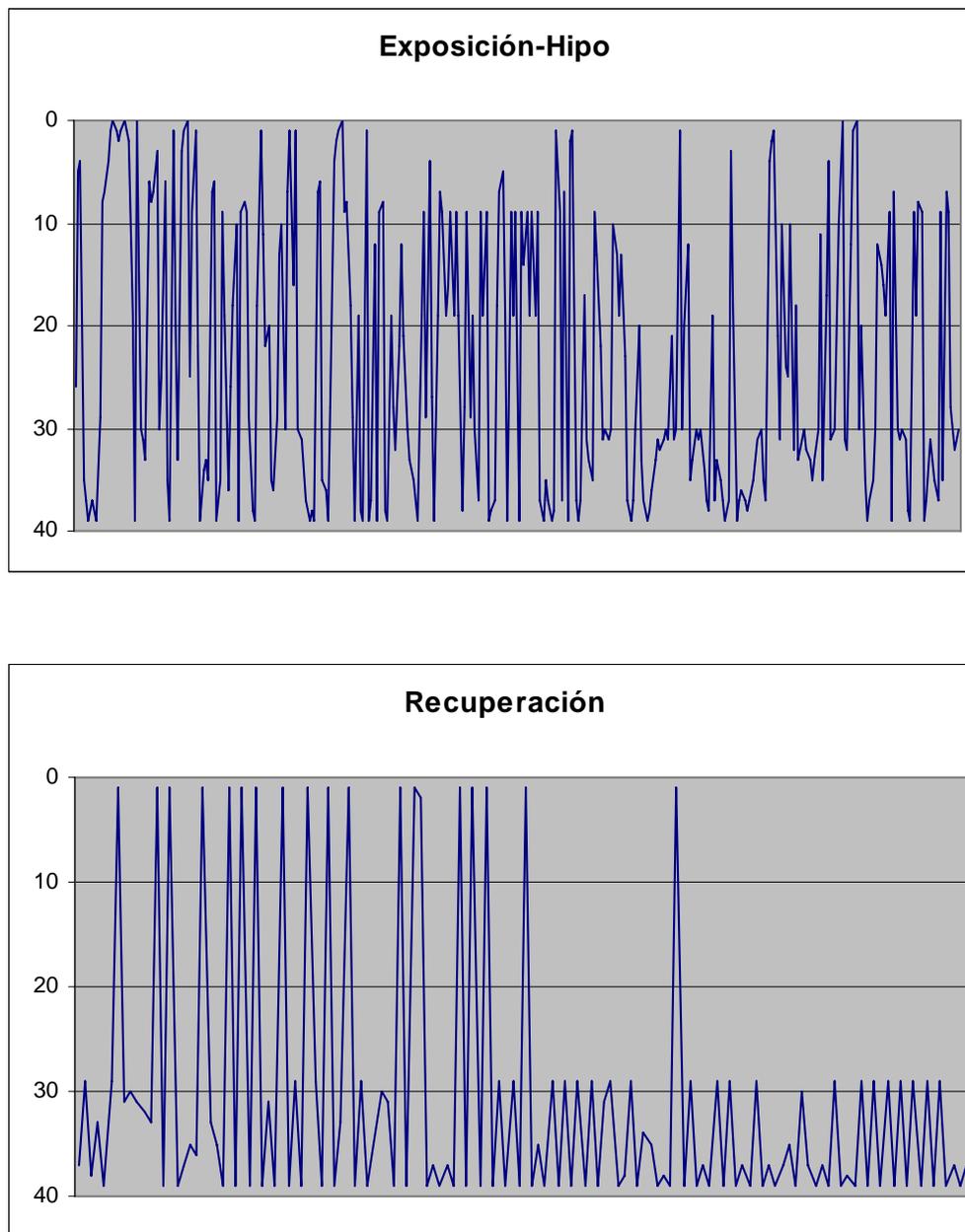


Figura 16. Actividad natatoria de *Cyprinus carpio* a través del tiempo para los períodos experimentales. Eje y: Profundidad de natación en el acuario; Eje x: Tiempo (1 hora). (a) Control, (b,c) Exposición y (d) Recuperación.

5- Registros múltiples de los síndromes de toxicidad:

En la Tabla 26.a se presentan los resultados obtenidos para cuatro parámetros comportamentales (Tiempo de Permanencia en las capas A y D; sobrereactividad y aletargamiento) evaluados en *Cyprinus Carpio*, mantenidos durante 5 días en 0.3 mg Cd.L^{-1} .

	Control				Exposición				
	Días				Días				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Permanencia en la capa A	384,0 ± 56,0	305,2 ± 38,9	318,8 ± 14,5	321,5± 16,4	256,5± 58,3	275,6± 32,0	365,4± 49,0	4,7 ± 1,7*	5,7 ± 1,5*
Permanencia en la capa D	323,7 ± 55,9	224,8 ± 47,4	278,7 ± 24,7	251,3 ± 19,5	11,9 ± 2,4*	14,3 ± 5,5*	13,4 ± 4,1*	284,3 ± 40,6	244,3 ± 39,6

a

Sobre reactividad	x	x	x	x	xx	xx	xx	xxx	xxx
Aletargamiento	x	x	x	x	xx	xx	xx	xxx	xxx

b

Tabla 26. a) Tiempo (en s) de permanencia de *Cyprinus carpio* (N=6) en las capas horizontales A y D de los acuarios. b) grado de intensidad del comportamiento. x: Intensidad nula o escasa; xx: intensidad media; xxx: alta intensidad. Los datos corresponden a Controles y Expuestos a $0,3 \text{ mg Cd.L}^{-1}$. Valores promedio ± ESM. * Indica diferencias significativas.

Durante el período Control los animales permanecieron una cantidad de tiempo similar tanto en la capa superficial como en la del fondo del acuario y su actividad fue “normal” (la presencia de aletargamiento y sobre reactividad fue nula-escasa). Al iniciarse la Exposición al Cd y durante los primeros tres días, contrariamente a los controles, pasaron la mayor parte del tiempo en la Capa A. En los dos días subsiguientes los animales se encontraron agrupados en la capa D del acuario. En cuanto a su actividad, el Cd desencadenó una clara respuesta,

graduada, de media a elevada, acompañada al final de nados compulsivos (sobre reactividad).

En el CD adjunto (Anexo III) se documenta una selección de los registros fílmicos que documentan las respuestas más conspicuas de las carpas expuestas al Cadmio (0.3 mg Cd.L^{-1}).

III- Parámetros morfológicos

3.a- Factor de Condición

En la Tabla 27 se presentan los valores del Factor de Condición para los ejemplares de *Cyprinus carpio* utilizados para el estudio de Biomarcadores Fisiológicos.

Grupo	Cd ²⁺ (mg.L ⁻¹)			
	0.2	0.3	0.6	2.0
Inicial	1.25 ± 0.15 (n = 9)	1.29 ± 0.18 (n = 10)	1.54 ± 0.23 (n = 8)	1.43 ± 0.17 (n = 8)
Control	1.31 ± 0.13 (n = 10)	1.35 ± 0.17 (n = 10)	1.32 ± 0.24 (n = 10)	1.37 ± 0.11 (n = 10)
Expuesto	1.27 ± 0.17 (n = 10)	1.40 ± 0.23 (n = 8)	1.44 ± 0.21 (n = 9)	1.27 ± 0.11 (n = 8)

Tabla 27: Factor de Condición de *Cyprinus carpio* (peces utilizados en el estudio de biomarcadores fisiológicos). Media ± ESM. Entre paréntesis número de animales.

El análisis estadístico no reveló diferencias entre los grupos experimentales.

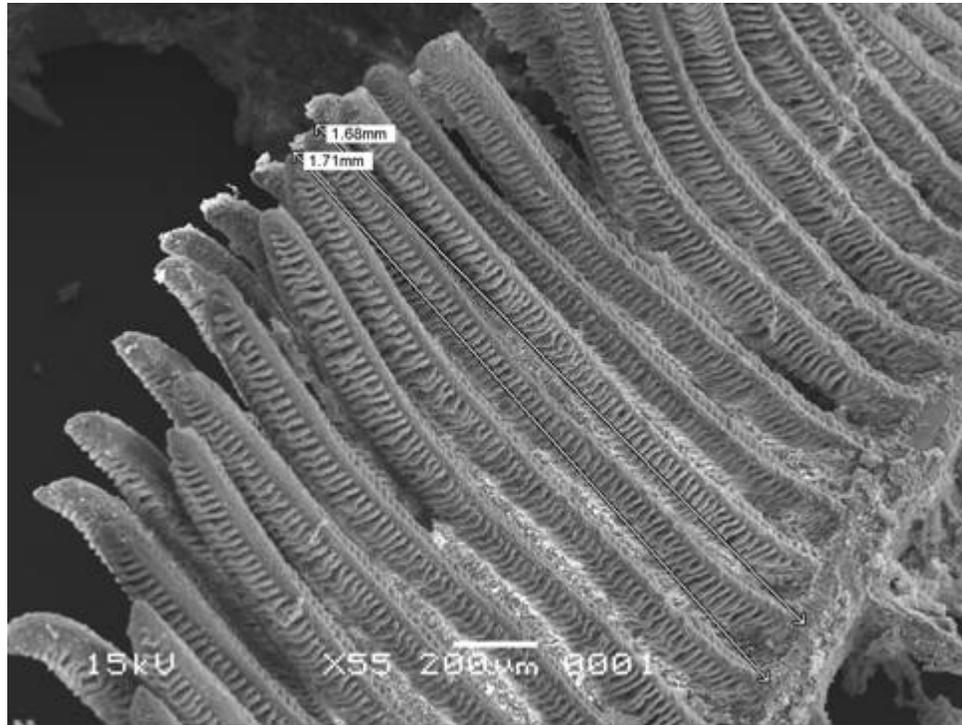
3.b. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de branquias

3.b.1) *Cyprinus carpio* (Figuras 17 y 18)

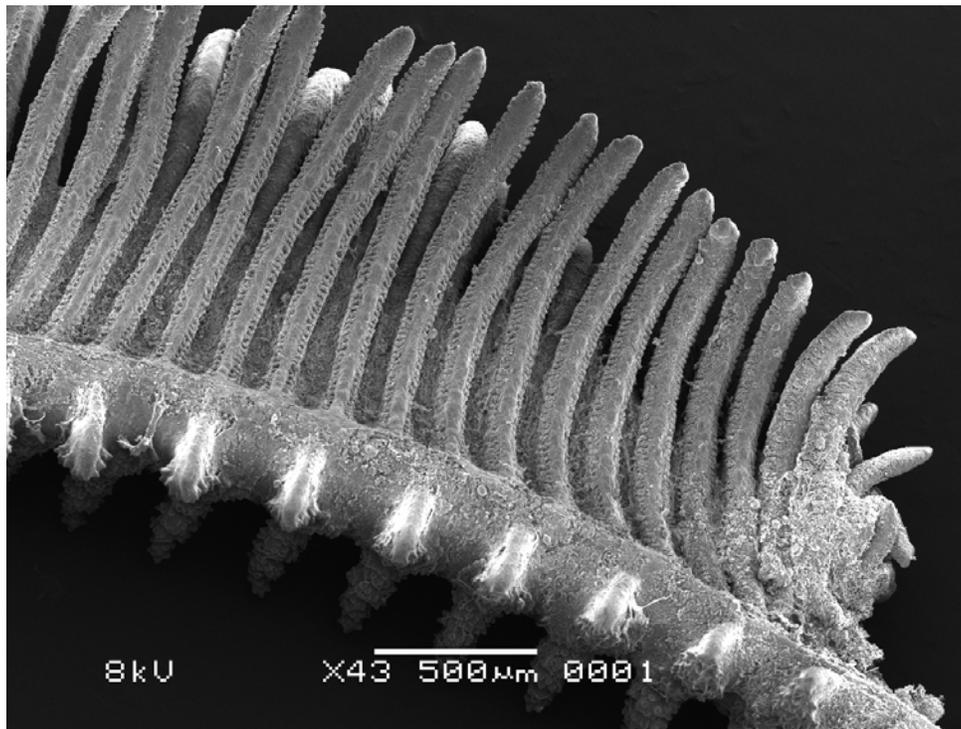
En la Figura 17.A se observan los filamentos branquiales de un individuo Control (en AP); la misma muestra las *lamelas secundarias* que aparecen como finas “solapas” semicirculares, bilateralmente dispuestas en las *lamelas primarias* (o filamentos branquiales) y estas a su vez, localizadas perpendicularmente a lo largo del arco branquial. En B y C se aprecia el estado de las branquias luego de la Exposición al Cadmio (0.3 y 0.5 mg.L⁻¹) durante 4 días, siendo manifiesto un proceso de deterioro tanto de las lamelas primarias como secundarias, las cuales se observan edematizadas, con deformación de la estructura y fusión de lamelas secundarias adyacentes. Este proceso es más agudo a 0.5 mg.L⁻¹. En D se muestran *filamentos branquiales* de una carpa en el período de Recuperación,

luego de su exposición por 4 días en 0.3 mg Cd.L^{-1} , allí se observa una manifiesta recuperación del aspecto de los filamentos, presentando imágenes comparables a las apreciadas en los Controles.

En la Figura 18 se muestra, con mayor aumento, el extremo de un *filamento branquial* de los mismos ejemplares Control en AP (A), Expuestos (B y C) y Recuperados (D) de la Figura 17. Es notable la hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales de las *lamelas secundarias*, lo que provoca la fusión de las mismas. La deestructuración epitelial también se aprecia en el desprendimiento de las células pavimentosas que adoptan un aspecto redondeado. En los *filamentos branquiales* de animales recuperados no se observa la fusión de las lamelas aunque todavía se observan las células epiteliales hipertróficas, posiblemente debido a que el tiempo de recuperación fue insuficiente para la reversión completa de las alteraciones provocadas por el Cadmio.



A



B

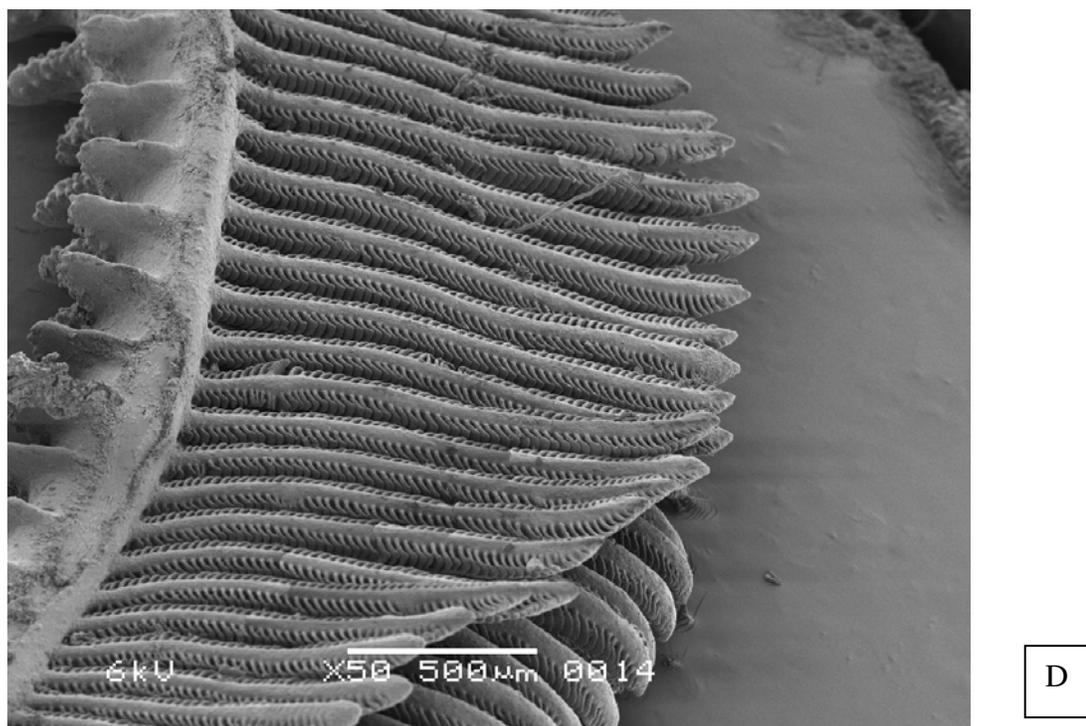
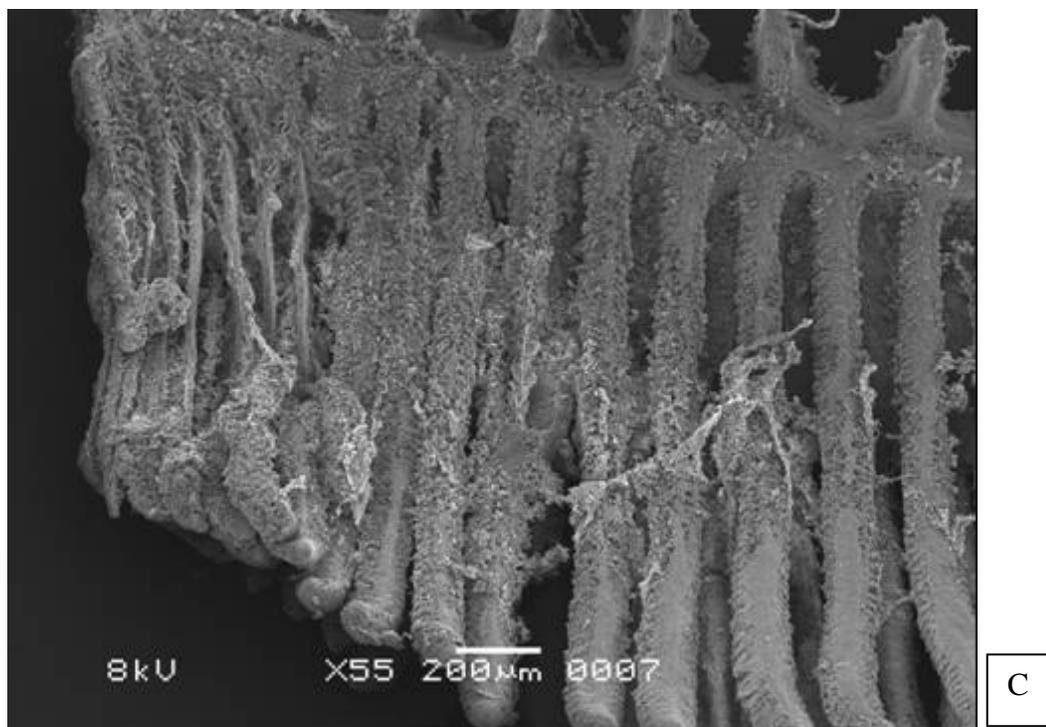
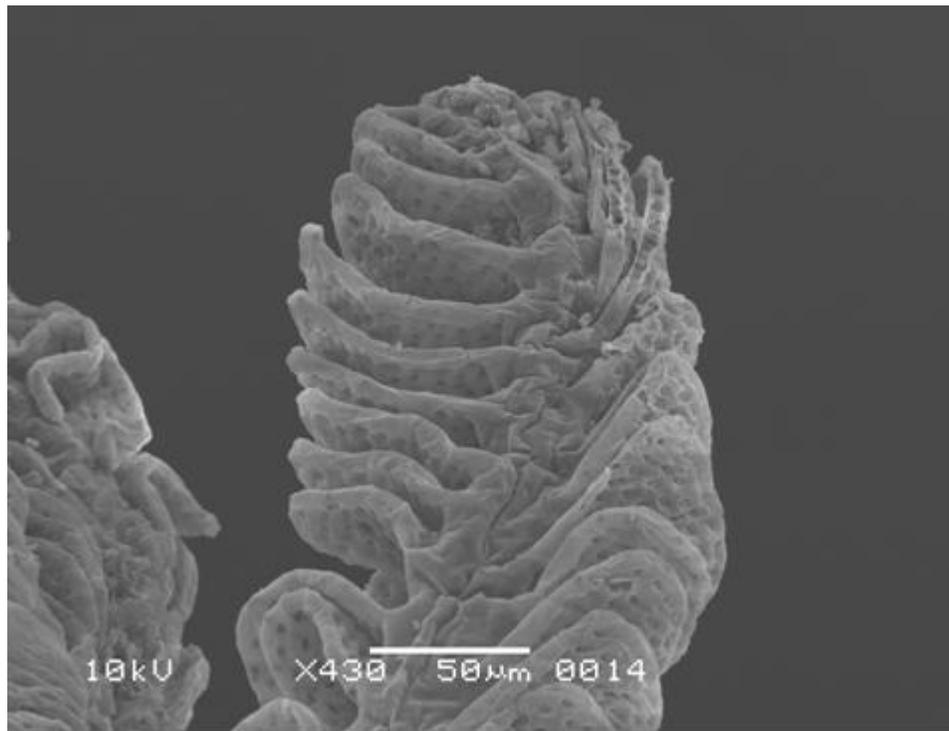
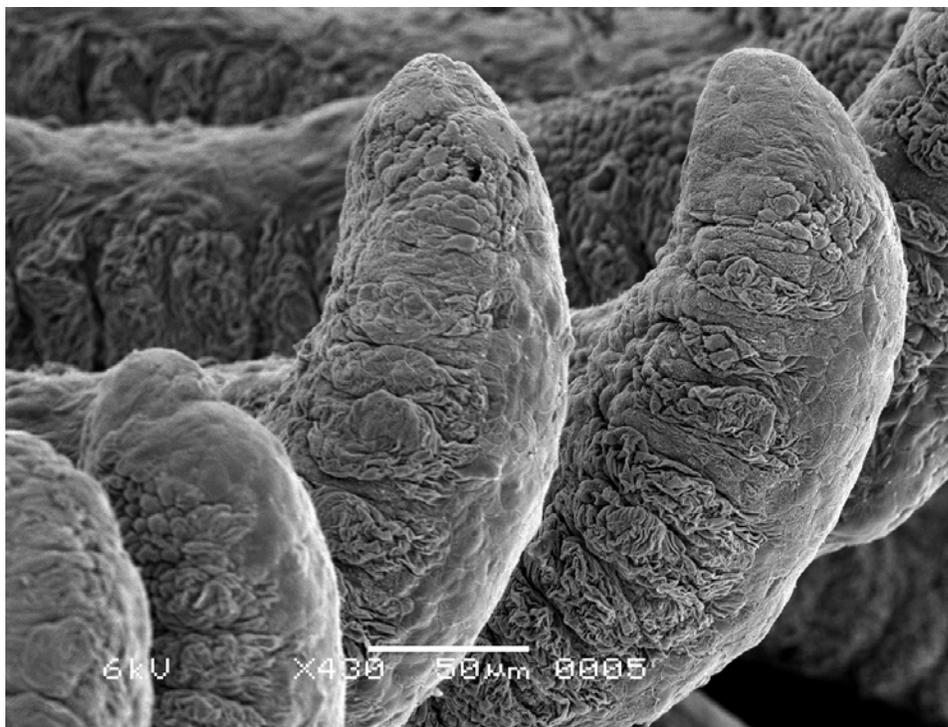


Figura 17. Imágenes al MEB de los filamentos branquiales de *Cyprinus carpio* en cuatro individuos: Control (A), Expuesto a 0.3 (B) y 0.5 mg.L⁻¹ Cd (C); en (D) un ejemplar Recuperado de 0.3 mg.L⁻¹Cd. Aumentos: 43-55X; barra: 200-500 µm. En A se registra, además, la longitud del filamento branquial.



A



B

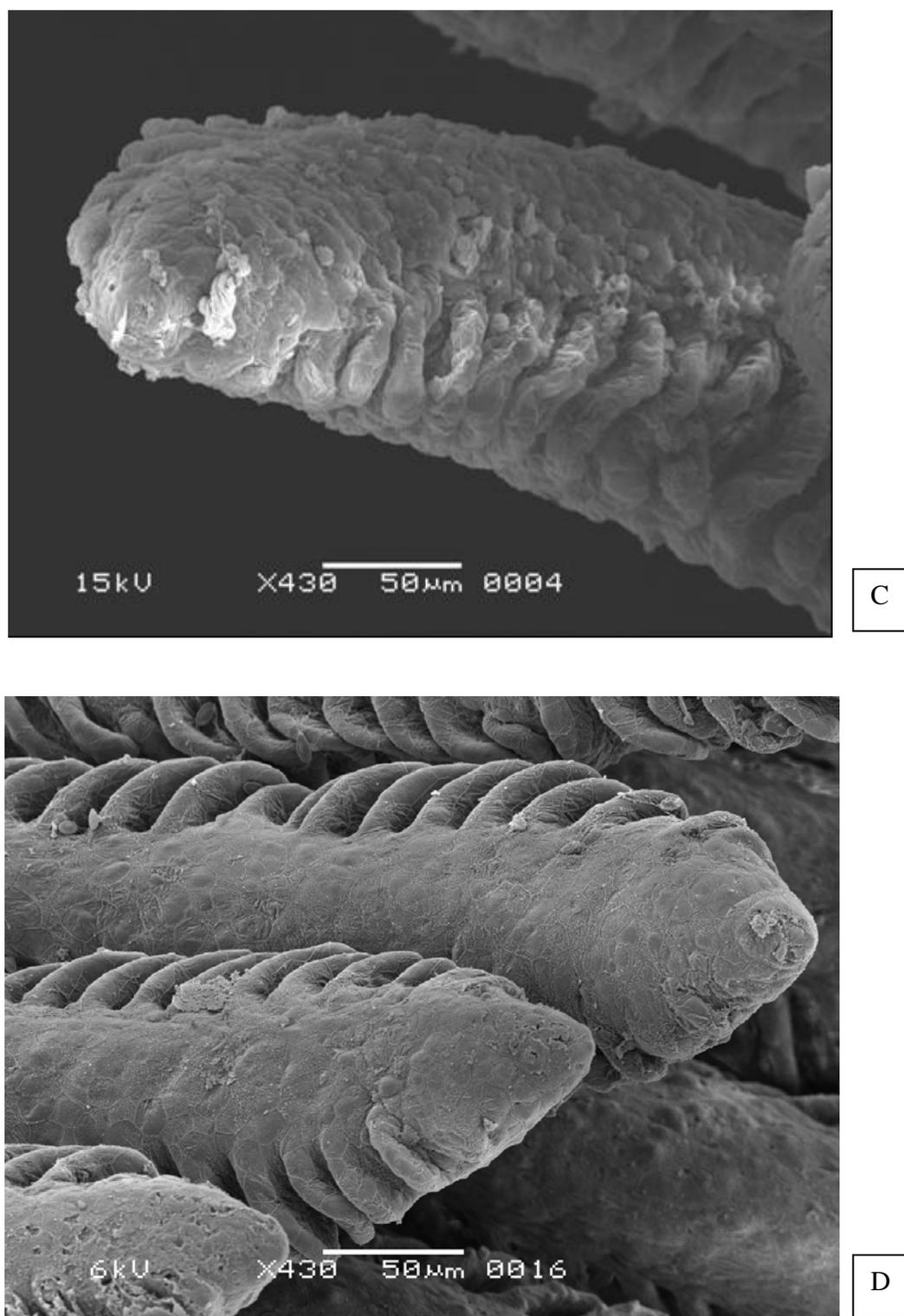
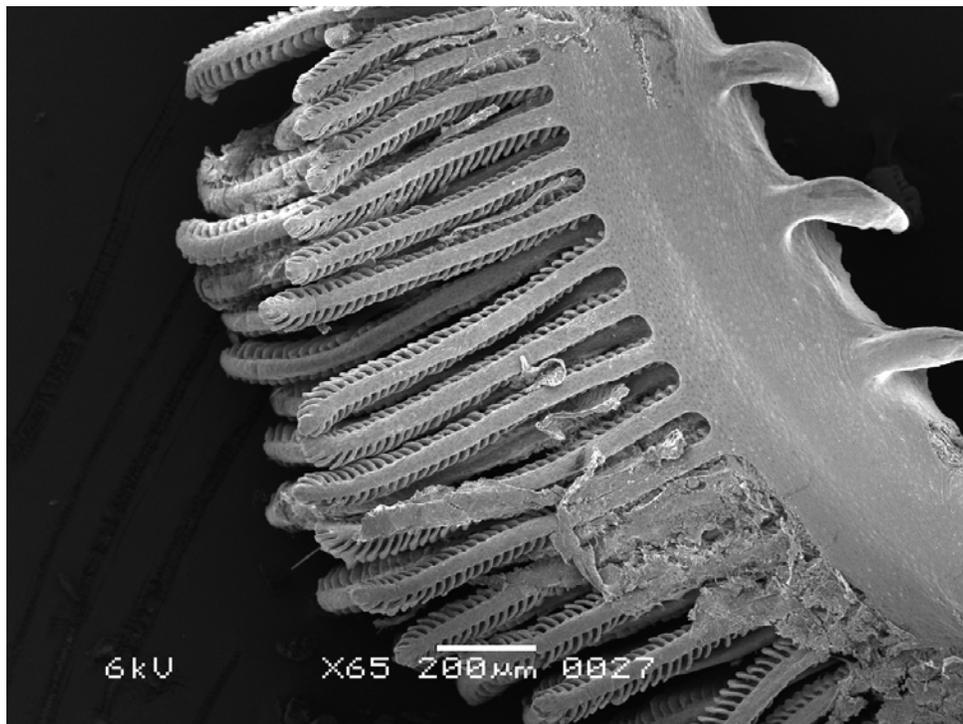
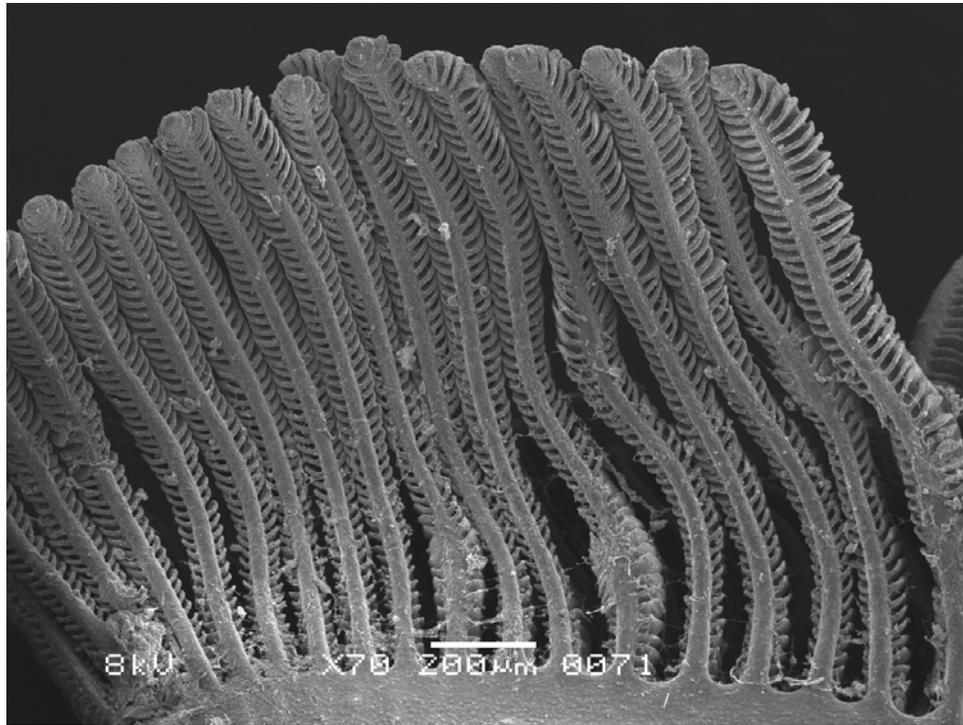


Figura 18. Imágenes al MEB de filamentos branquiales de *Cyprinus carpio* en los mismos individuos de la Fig. 17. Control (A), Expuesto a 0.3 (B) y 0.5 mg.L⁻¹ Cd (C); en (D) un ejemplar Recuperado de 0.3 mg.L⁻¹ Cd (D). Aumento: 430X; barra: 50 µm

3.b.2) *Australoheros facetum* (Figuras 19 y 20)

En la Figura 19.A se observan los *filamentos branquiales* completos de un individuo Control (en AP): se pueden apreciar los mismos detalles descritos en *Cyprinus carpio* (Figura 17.A). En B se aprecia el estado de las branquias luego de la exposición al Cadmio (0.3 mg.L^{-1}): se observa un proceso de deterioro tanto de las *lamelas primarias* como *secundarias*, las cuales se hallan edematizadas, con deformación de la estructura y fusión de *lamelas secundarias* adyacentes. En 19.C se observa que las anomalías ocurridas en medios con Cd muestran una tendencia a la restauración con imágenes comparables a las del Control.

En la Figura 20 se muestra el extremo de un *filamento branquial* de un pez Control (A), uno Expuesto (B y C) y otro Recuperado (D) con mayor detalle. En los animales expuestos se observan los mismos fenómenos de hipertrofia descritos en *Cyprinus carpio*. En el caso de la recuperación se vuelven a observar los límites celulares y no se aprecia fusión de *lamelas secundarias*.



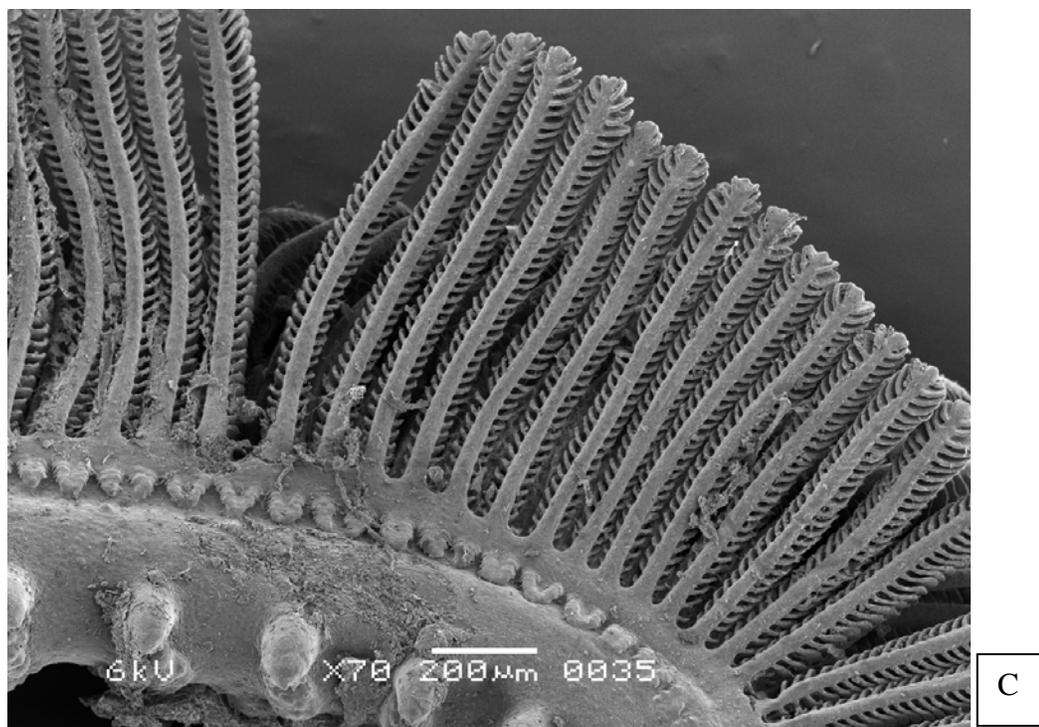
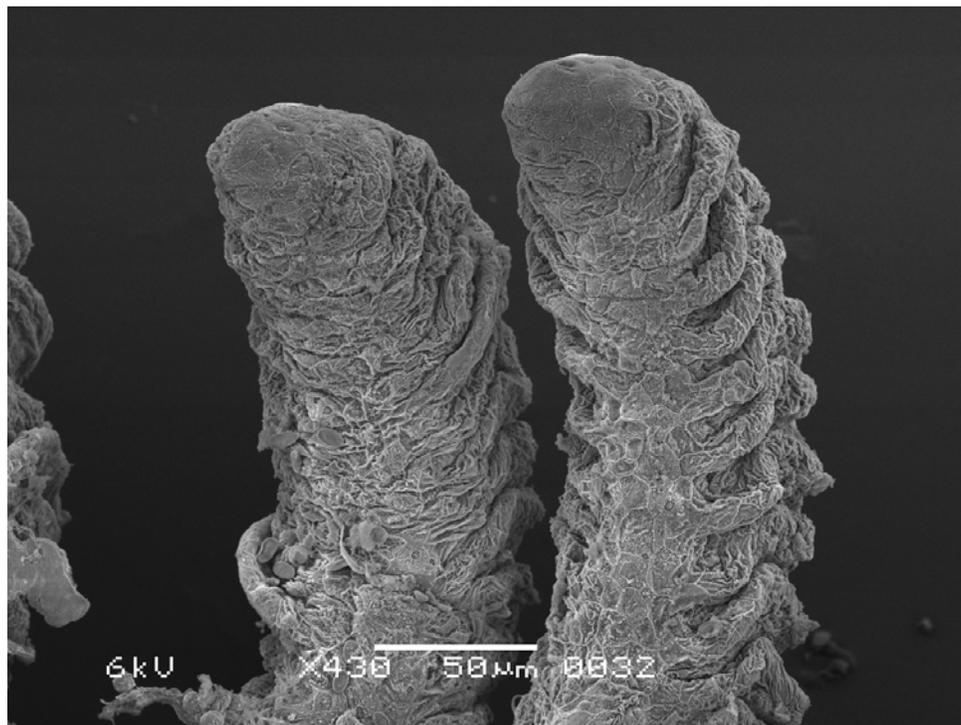
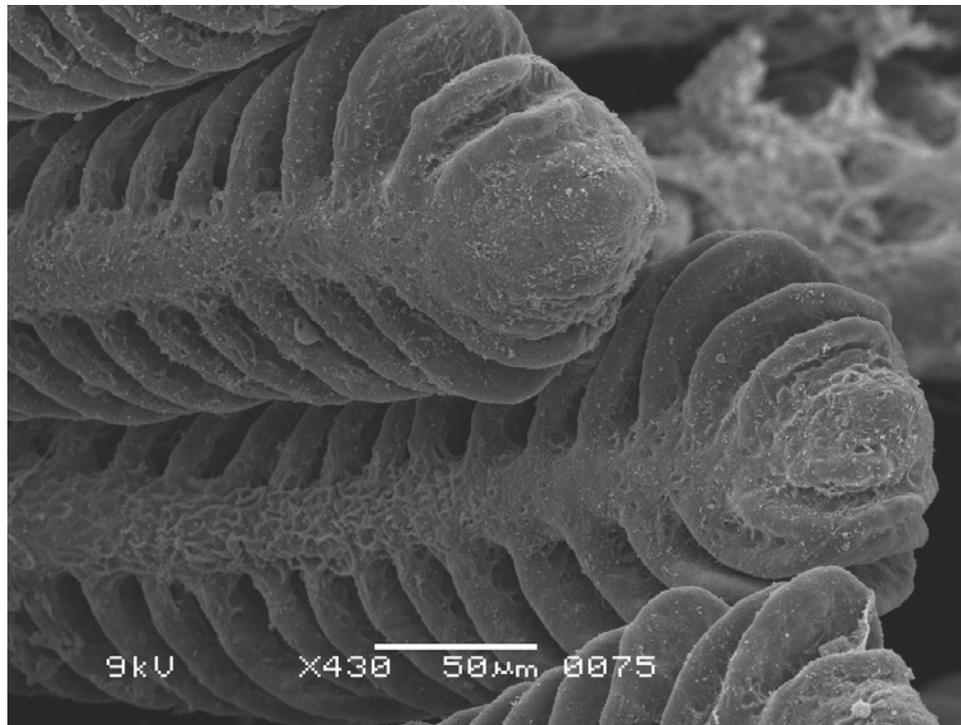


Figura 19. Imágenes al MEB de los filamentos branquiales de *Australoheros facetum* en un individuo Control (A), otro Expuesto a 0.3 mg.L^{-1} (B) y uno Recuperado (C). Aumentos: 65-70X; barra: $200 \mu\text{m}$



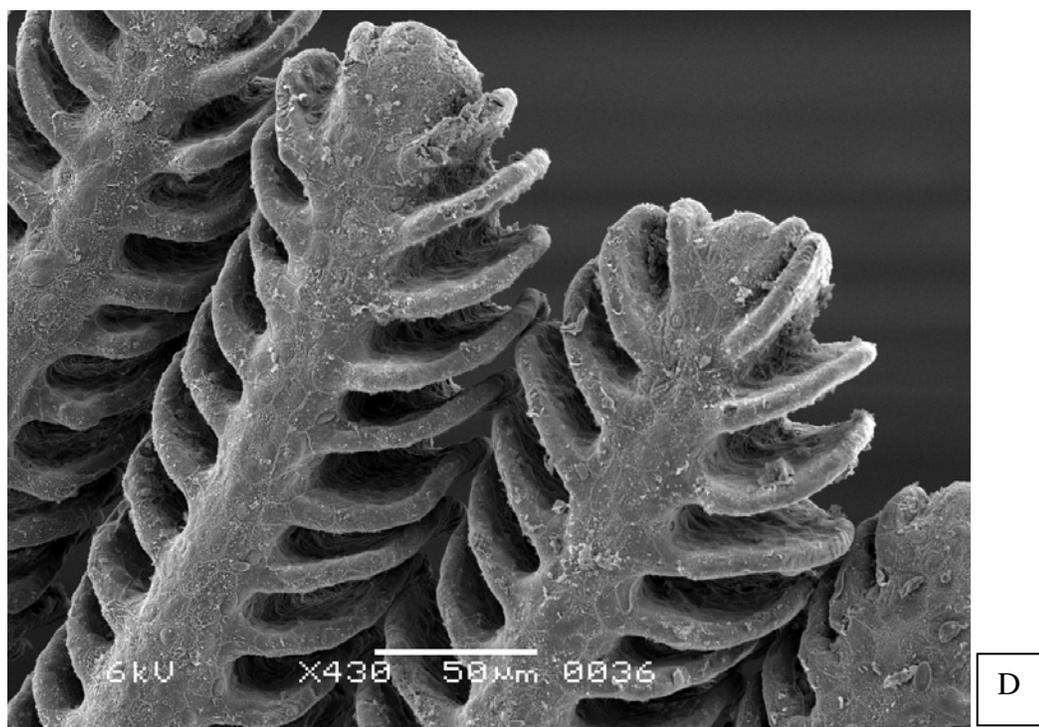
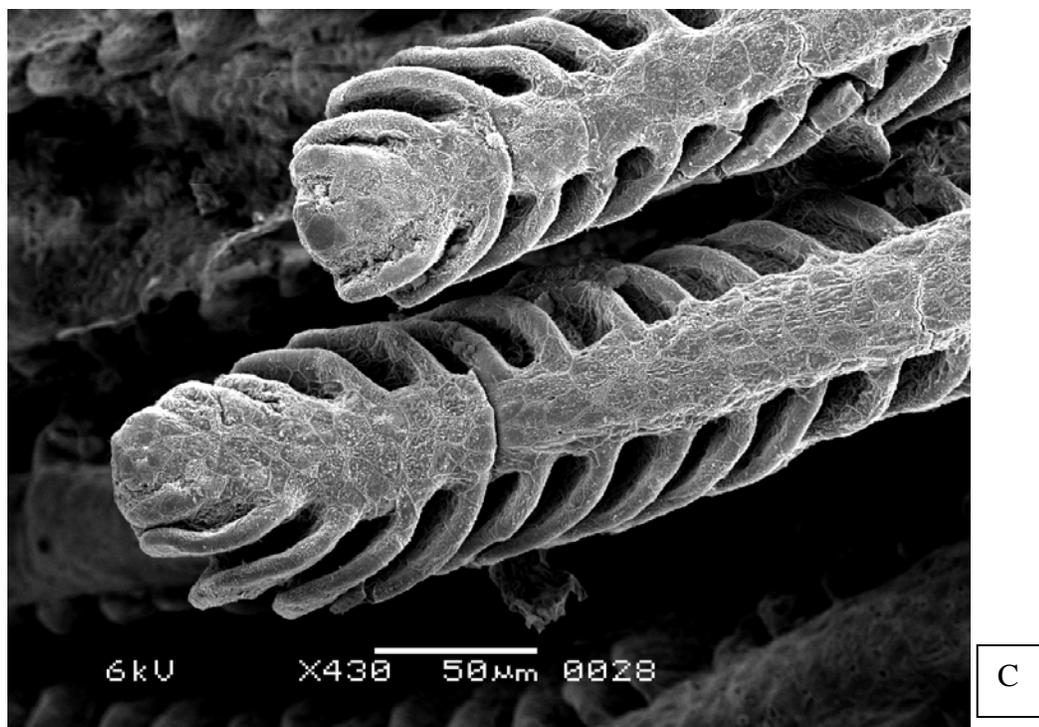
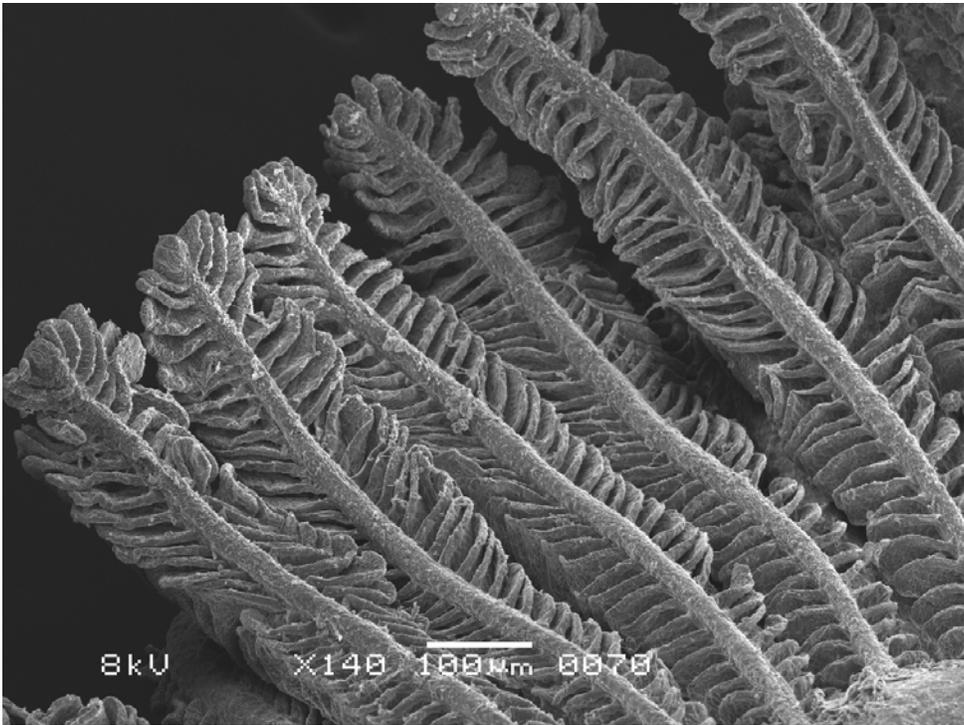


Figura 20. Imágenes al MEB de los extremos de filamentos branquiales de *Australoheros facetum* en un individuo Control (A); otro Expuesto a $0.3 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cd}$ (B y C) y uno Recuperado (D). Aumento: 430X; barra: 50 µm

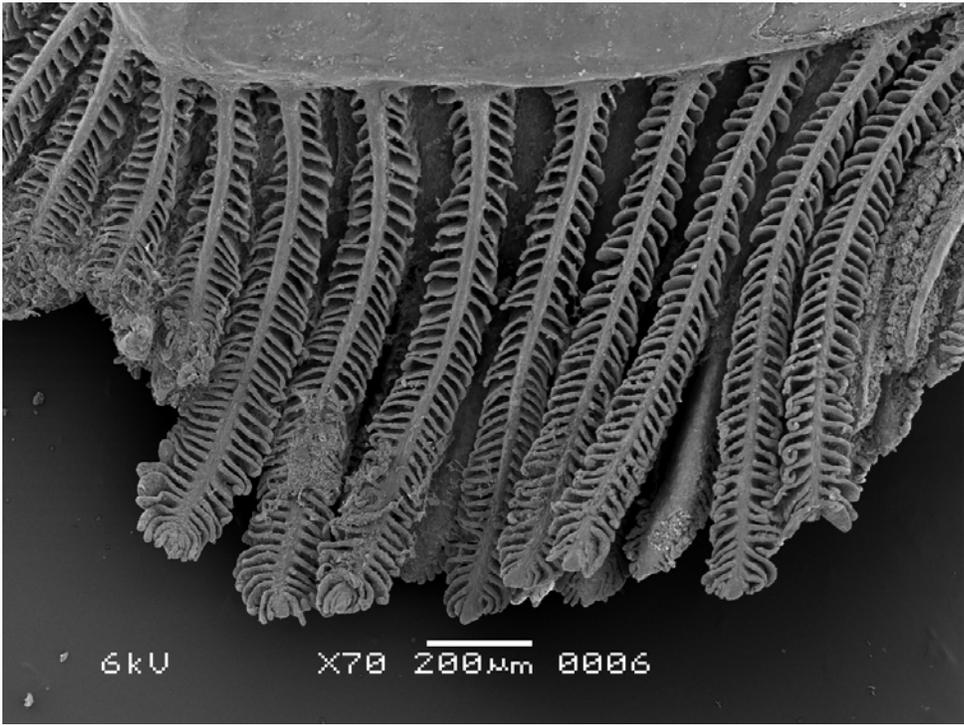
3.b.3) *Astyanax fasciatus* (Figuras 21 y 22)

En la Figura 21.A se observan los *filamentos branquiales* de un individuo Control (en AP): la imagen presenta detalles estructurales comparables a los descritos en *Cyprinus carpio* y *Australoheros facetum*. En B se aprecia el estado de los *filamentos branquiales* luego de la exposición al Cadmio (0.3 mg.L^{-1}), siendo manifiesto un proceso de deterioro tanto de las *lamelas primarias* como de las *secundarias* que se observan edematizadas, con fusión parcial de las mismas. Se observa además una gran cantidad de mucus sobre los filamentos. En C se ve el filamento de un individuo previamente expuesto al metal y recuperado: se aprecian evidencias de recuperación; no se observan edemas ni presencia de mucus.

En la Figura 22 se muestra, con mayor aumento, el extremo de un filamento branquial control (A), otro expuesto (B) y recuperado (C); imágenes del mismo pez de la Figura 21. En el individuo expuesto se observa hipertrofia celular con pérdida de los límites celulares. En el individuo recuperado las células del filamento se observan normales y con sus límites claramente delimitados.



A



B

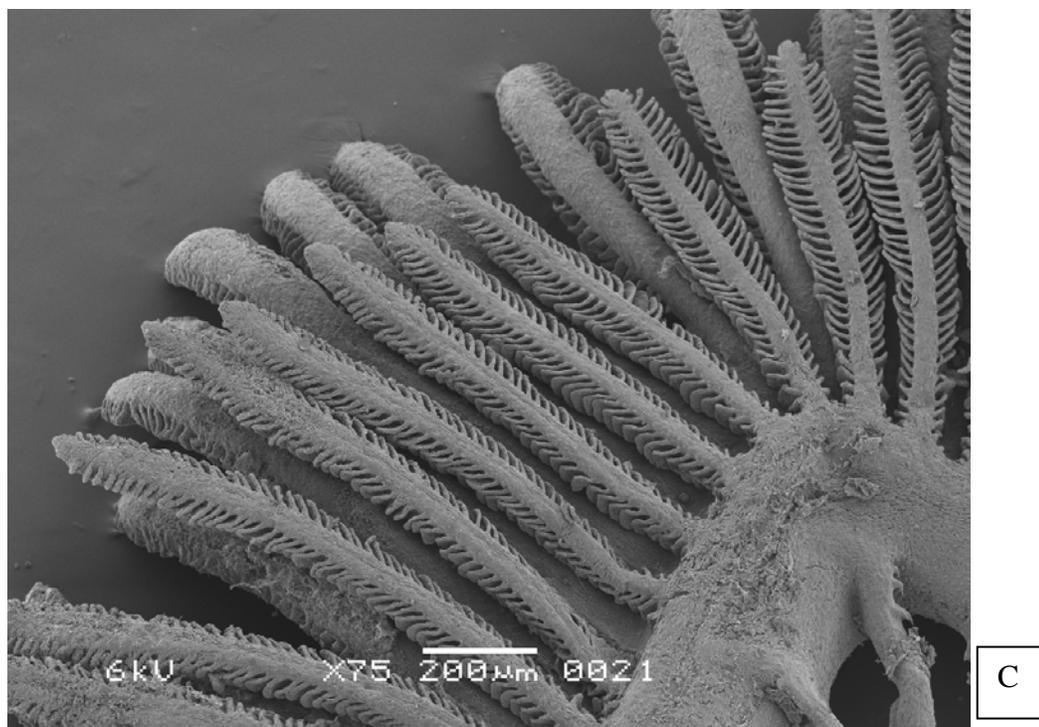
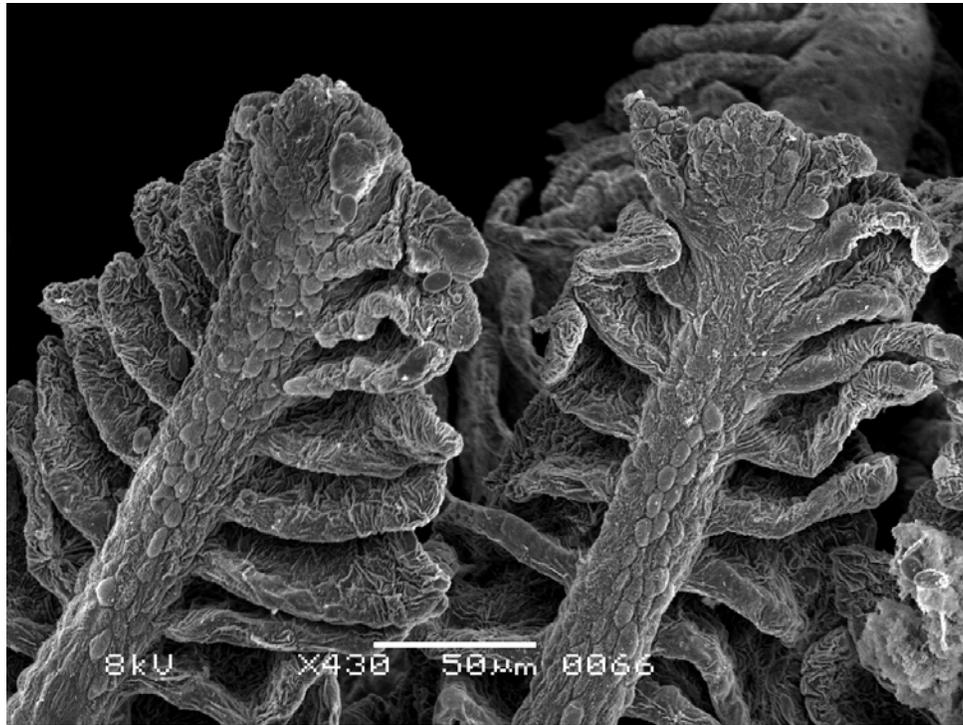
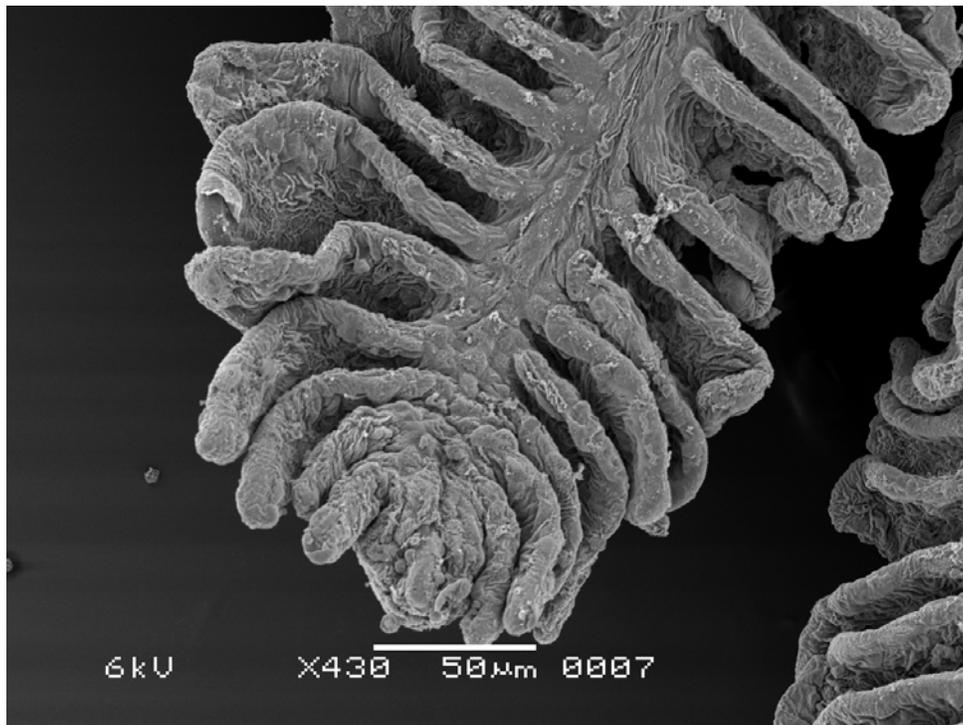


Figura 21. Imágenes al MEB de los filamentos branquiales de *Astyanax fasciatus* en un individuo Control (A), otro Expuesto a 0.3 mg.L^{-1} de Cd (B) y uno Recuperado (C). Aumentos: 70/75-140; barras: 100-200 μm .



A



B

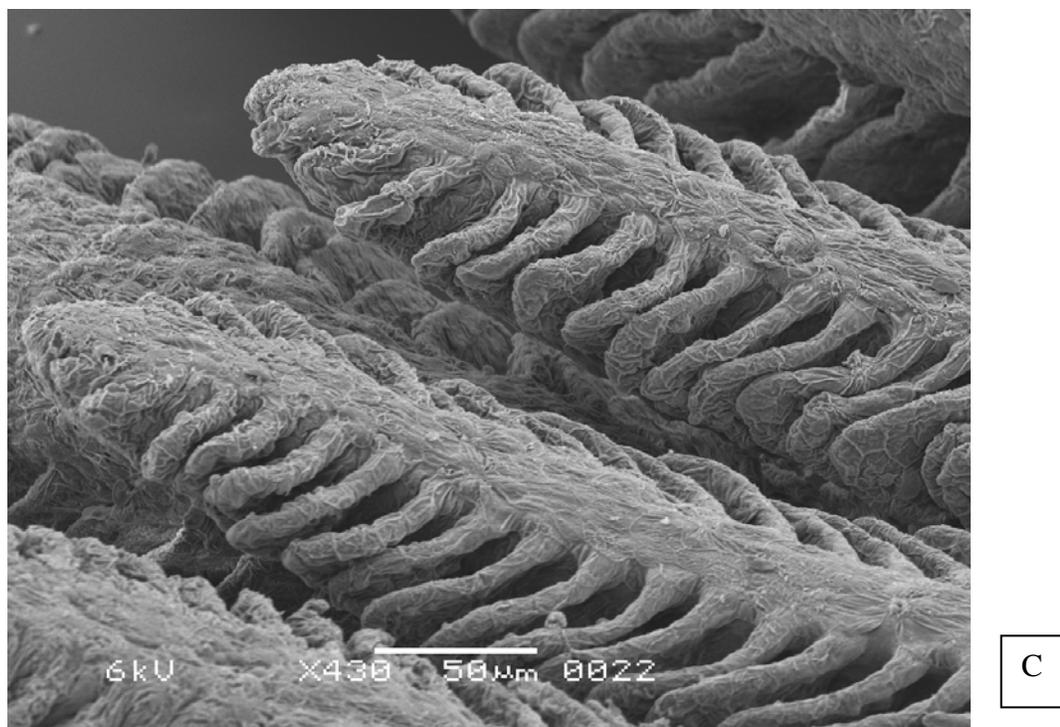


Figura 22. Imágenes al MEB de los filamentos branquiales de *Astyanax fasciatus* en los mismos individuos de la Figura 21: Control (A); otro Expuesto a 0.3 mg.L^{-1} de Cd (B) y uno Recuperado (C). Aumento: 430X; barra: $50 \mu\text{m}$

IV- Biomarcadores fisiológicos (en *Cyprinus carpio*)

4.a- Ingesta de alimento:

En las Figuras 23 a 26 se presenta la evolución en la Ingesta diaria total de alimento de *Cyprinus carpio*, expuesto a cuatro concentraciones de Cadmio y de sus controles simultáneos.

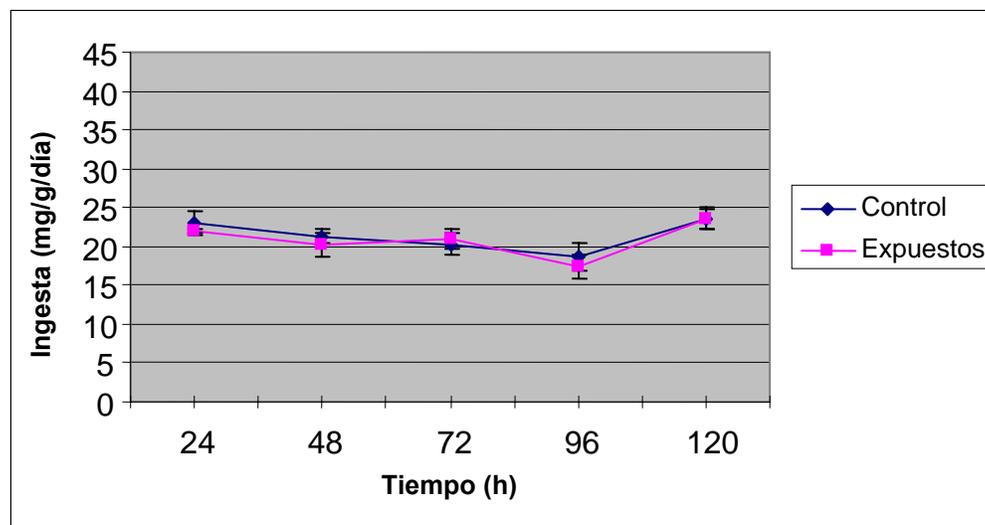


Figura 23: Ingesta de alimento (mg/g/día) de *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.20 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM.

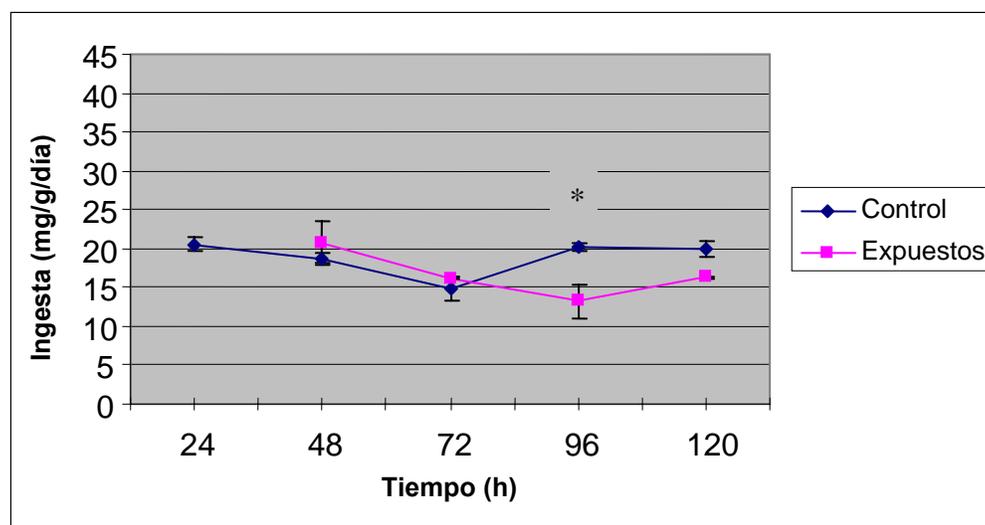


Figura 24: Ingesta de alimento (mg/g/día) de *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.30 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

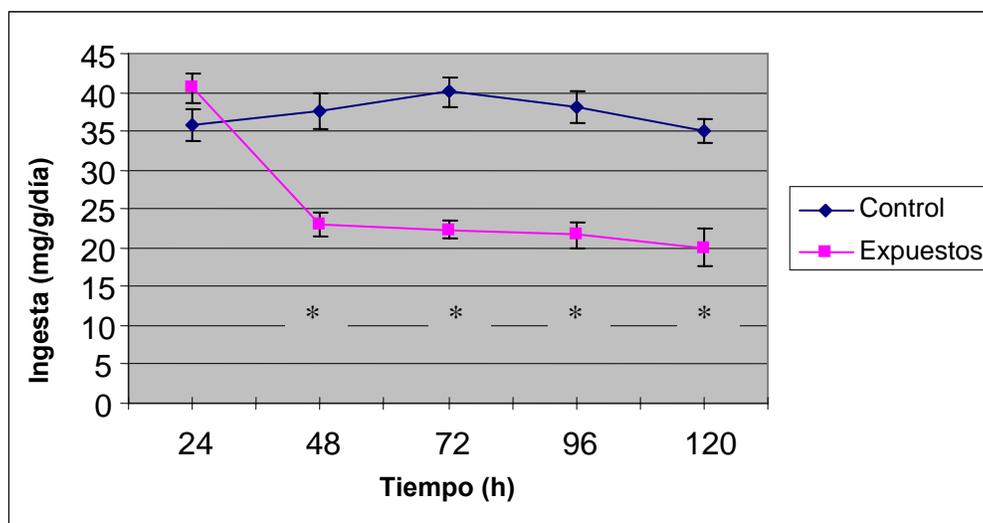


Figura 25: Ingesta de alimento (mg/g/día) de los *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.60 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

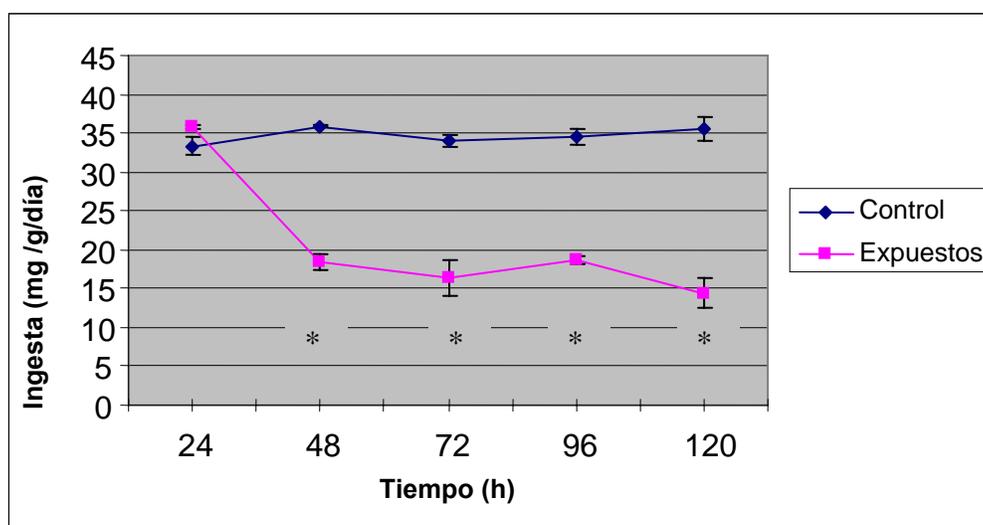


Figura 26: Ingesta de alimento (mg/g/día) de los *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (2.00 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

En los peces Expuestos a 0.20 mg.L^{-1} de Cd (Fig. 23), el análisis estadístico no mostró diferencias con los Controles. Tampoco se observaron diferencias en el tiempo en la secuencia de cada grupo experimental.

En los animales de 0.30 mg.L^{-1} (Fig. 24) se registraron diferencias entre ambos tratamientos ($p < 0.01$) sólo a las 96 horas.

Para los animales expuestos a 0.60 y 2.00 mg.L^{-1} (Fig. 25 y 26), hubieron diferencias significativas entre Controles y Expuestos ($p < 0.001$) a partir de las 48 horas. En estos grupos se observó una disminución del 50% en la ingesta ya a las 48 horas de iniciada la exposición a Cadmio que se mantuvo durante el resto de los días del ensayo.

4.b- Producción de Heces:

En las Figuras 27 a 30 se indica la evolución de la Producción de Heces diaria de peces: Expuestos a cuatro concentraciones de Cadmio y sus respectivos Controles simultáneos.

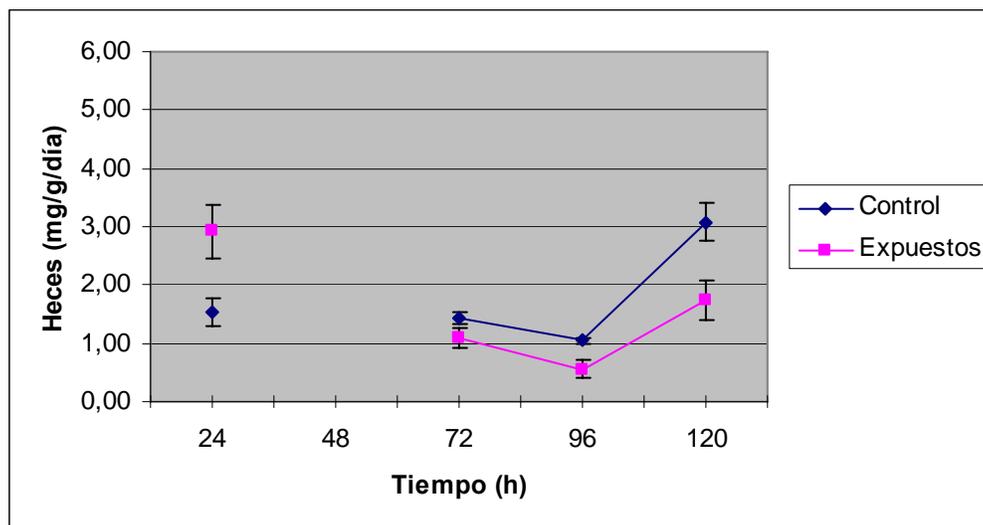


Figura 27: Heces producidas (mg/g/día) en *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.20 mg.L⁻¹). Los datos están expresados como medias (por condición N=10) ± ESM. (No se dispusieron de los datos correspondientes a 48 horas).

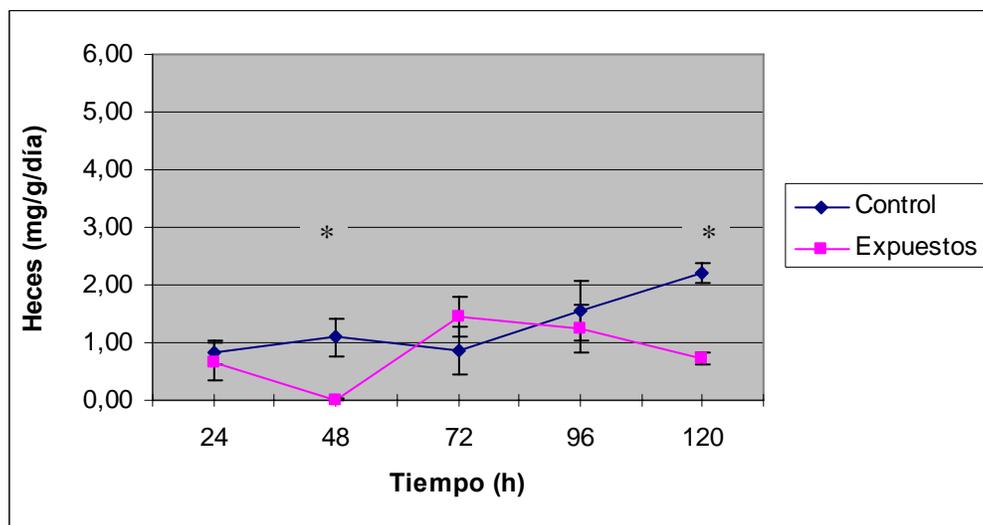


Figura 28: Heces producidas (mg/g/día) en *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.30 mg.L⁻¹). Los datos están expresados como medias (por condición N=10) ± ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

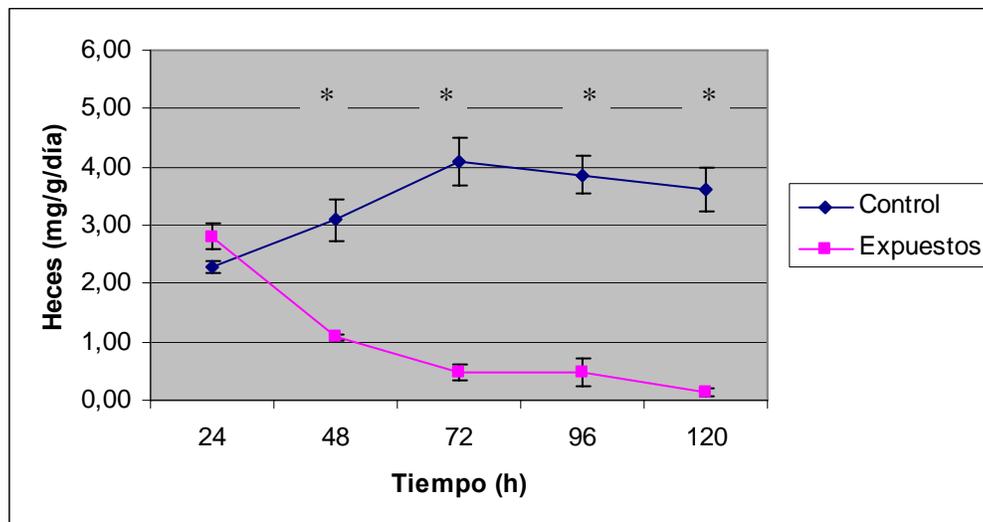


Figura 29: Heces producidas (mg/g/día) de los *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (0.60 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

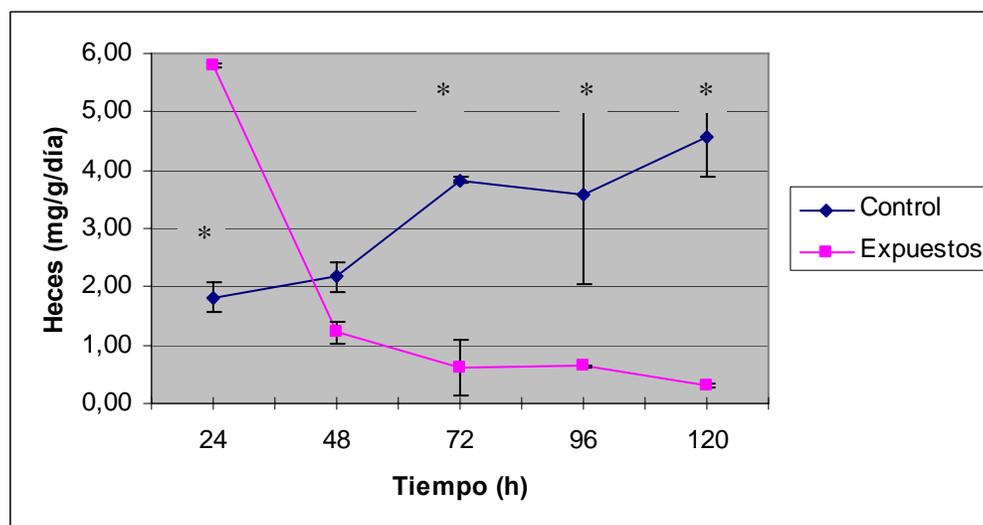


Figura 30: Heces producidas (mg/g/día) en *C. carpio*, Controles y Expuestos a Cd (2.00 mg.L^{-1}). Los datos están expresados como medias (por condición $N=10$) \pm ESM. *Indica significatividad estadística ($p < 0.01$).

Para los animales Expuestos a $0.20 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ (Fig. 27), el análisis estadístico no mostró diferencias significativas con los Controles.

En las carpas Expuestas a $0.30 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ (Fig. 28), se registraron reducciones significativas respecto de los Controles en las heces producidas a 48 y 120 horas ($p < 0.001$).

Para los peces Expuestos a $0.60 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ (Fig. 29), hubieron diferencias muy importantes y significativas con respecto a los Controles ($P < 0.001$). Se observó una reducción en la producción de heces a partir de las 48 horas.

En las carpas Expuestas a $2.00 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ (Fig. 30), el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales en la producción de heces para todos los tiempos excepto a las 48 horas. En los animales expuestos se observó un aumento importante en la producción de heces a las 24 horas que fue reduciéndose a lo largo del tiempo, diferenciándose completamente de los controles.

4.c- Eficiencia de Asimilación Aparente (U):

En las Figuras 31 a 34 se presentan los valores de la Eficiencia de Asimilación diaria para los: Controles y Expuestos a cuatro concentraciones de Cadmio.

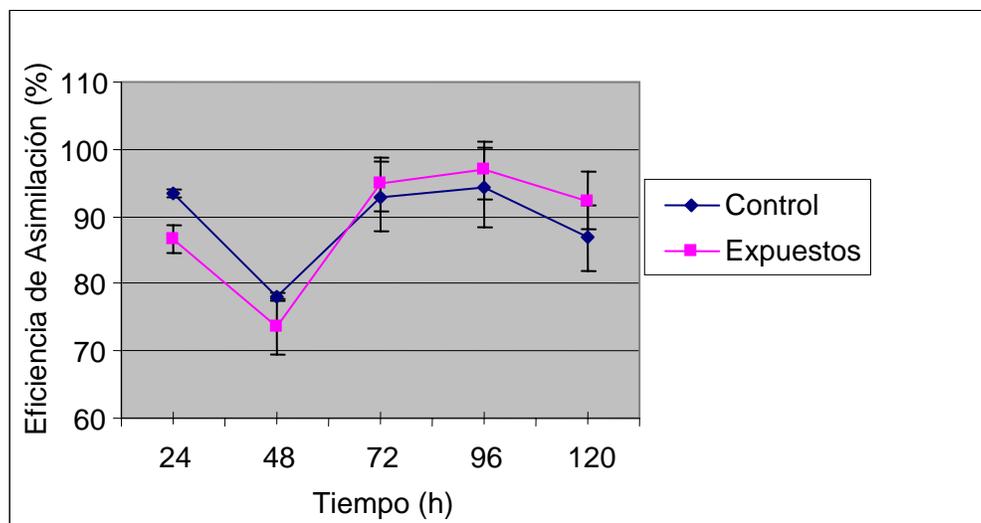


Figura 31: Eficiencia de Asimilación (%) de *C. carpio*, Controles y Expuestos a 0.20 mg.L⁻¹ de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10).

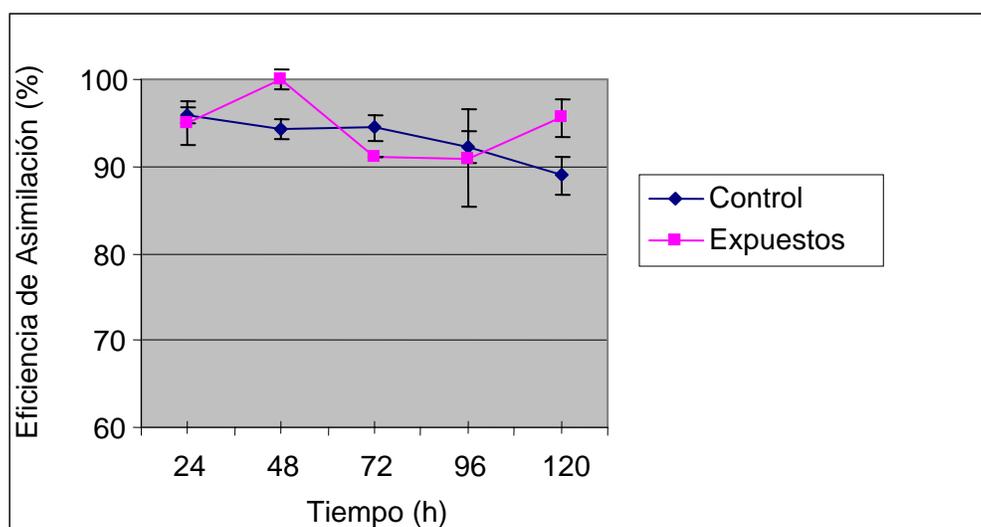


Figura 32: Eficiencia de Asimilación (%) de *C. carpio*, Controles y Expuestos a 0.30 mg.L⁻¹ de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10).

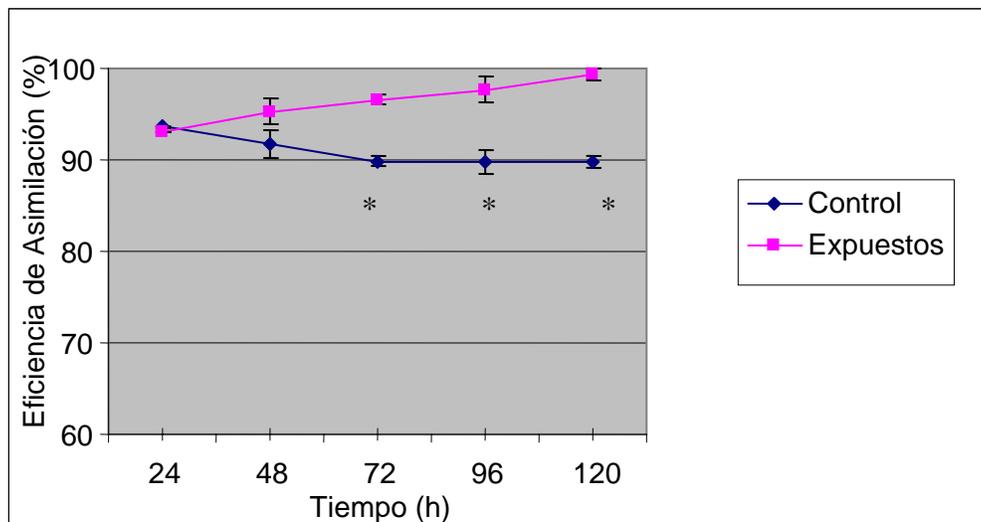


Figura 33: Eficiencia de Asimilación (%) de *C. Carpio*, Controles y Expuestos a 0.60 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10). *Indica significatividad estadística.

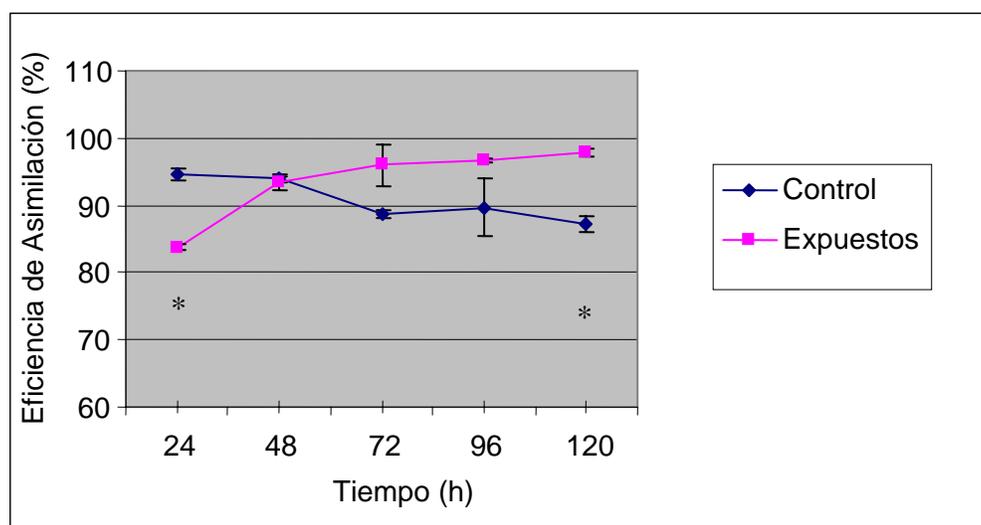


Figura 34: Eficiencia de Asimilación (%) de *C. Carpio*, Controles y Expuestos a 2.00 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10). *Indica significatividad estadística.

En las carpas Expuestas a 0.20 mg.L^{-1} (Fig. 31) se encontró que las curvas de Eficiencia de asimilación en ambos grupos no exhibieron diferencias en el tiempo ni entre los tratamientos.

Otro tanto se registró en los peces Expuestos a 0.30 mg.L^{-1} (Fig. 32). A 0.60 mg.L^{-1} (Fig. 32) hubo diferencias entre tratamientos y dentro de los Expuestos diferencias entre las Eficiencias desde las 48 horas ($p < 0.05$).

Cuando fueron Expuestos a 2.00 mg.L^{-1} (Fig. 34) se encontraron diferencias entre tratamientos y dentro de los Expuestos diferencias entre la asimilación a las 24 horas y el resto ($p < 0.05$), excepto a las 48 horas.

En los animales Expuestos a 0.60 y 2.00 mg.L^{-1} se observó un aumento significativo en la Eficiencia de asimilación a lo largo del tiempo. Esta respuesta no se observó tan claramente en sus respectivos Controles ni en los Expuestos a la menor concentración.

4.d- Asimilación neta:

En las Figuras 35 a 38 se presentan los valores de la Asimilación neta diaria para los dos grupos de peces: Controles y Expuestos a cuatro concentraciones de Cadmio.

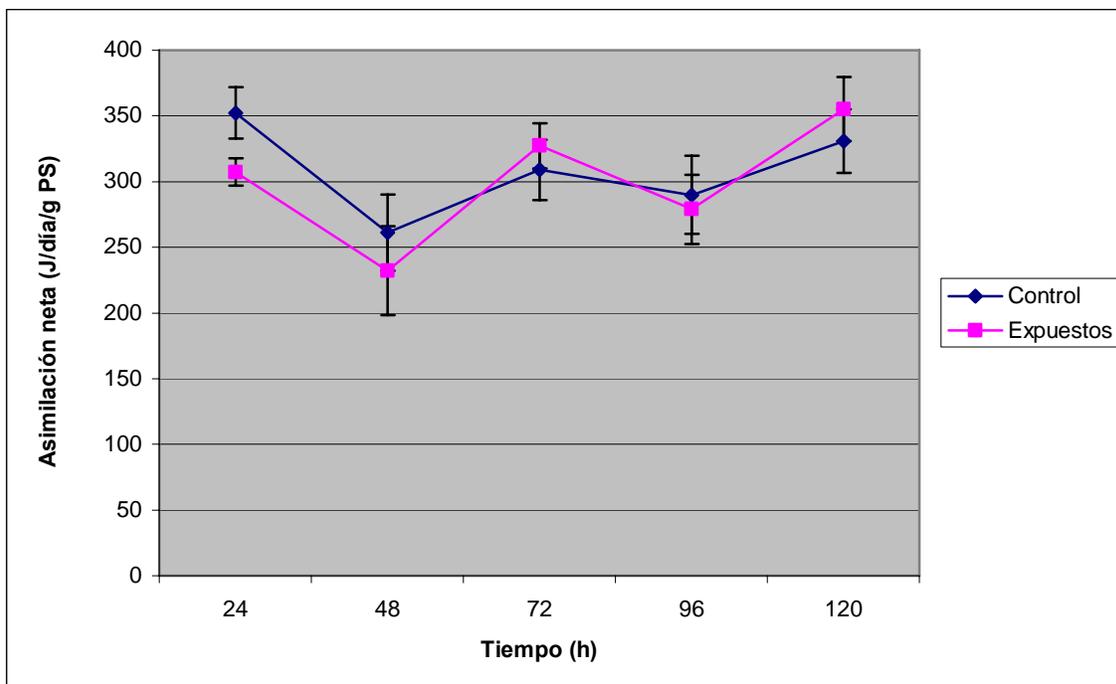


Figura 35: Asimilación neta (J/día/g PS) de *C. carpio* en Controles y Expuestos a 0.20 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10).

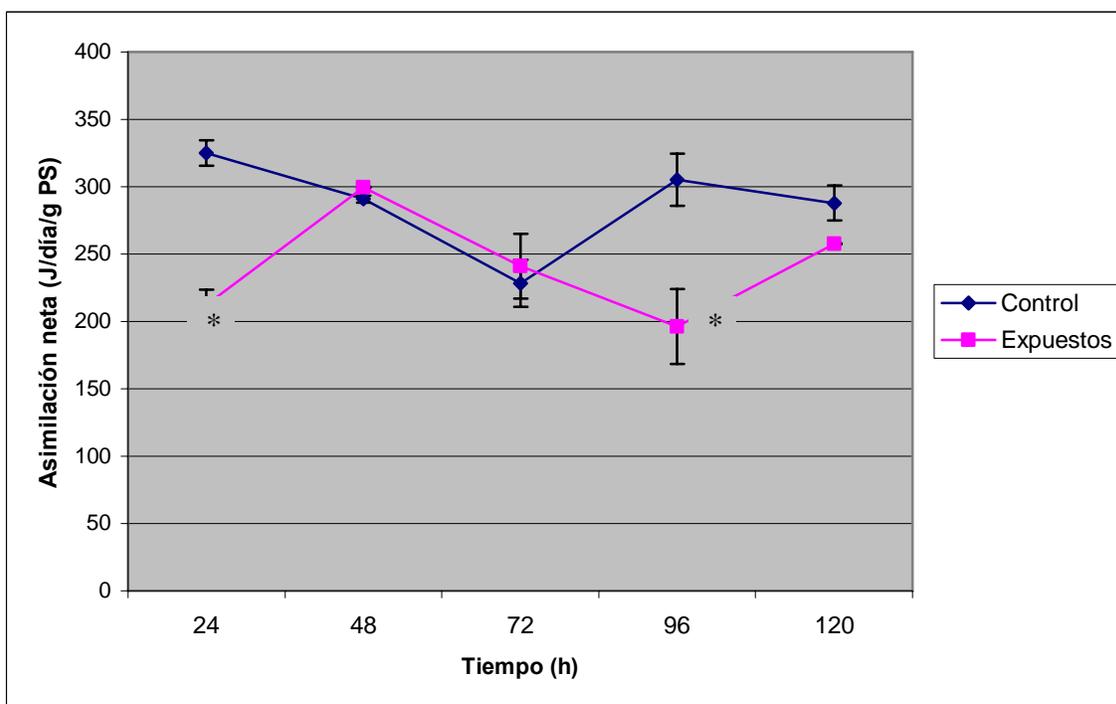


Figura 36: Asimilación neta (J/día/g PS) de *C. carpio* en Controles y Expuestos a 0.30 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10). *Indica significatividad estadística.

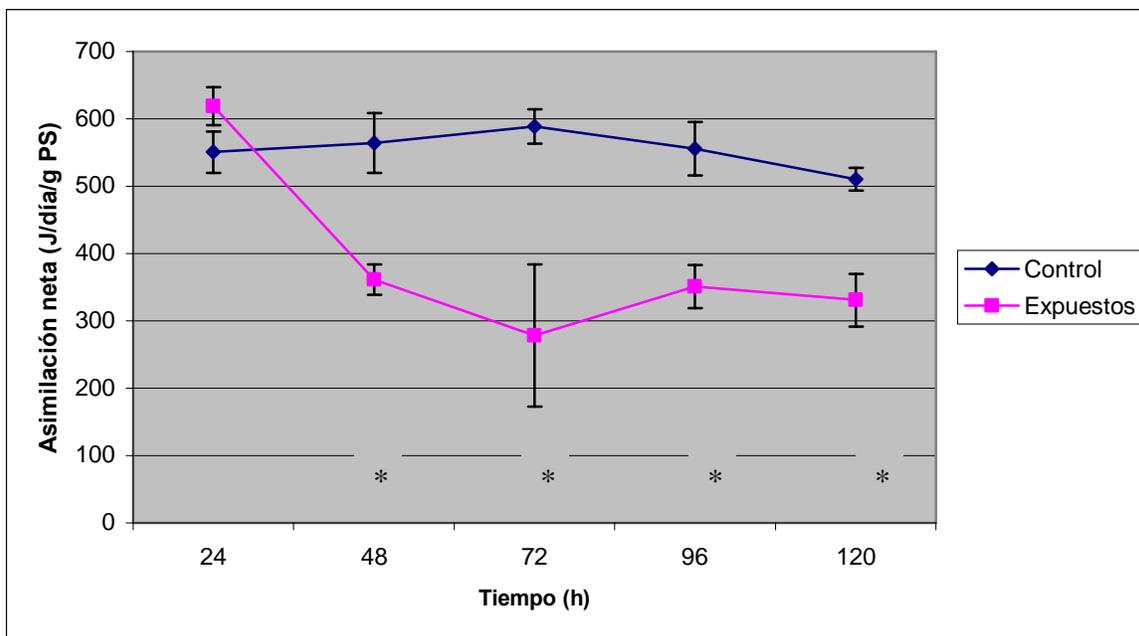


Figura 37: Asimilación neta (J/día/g PS) de *C. carpio* en Controles y Expuestos a 0.60 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10). *Indica significatividad estadística.

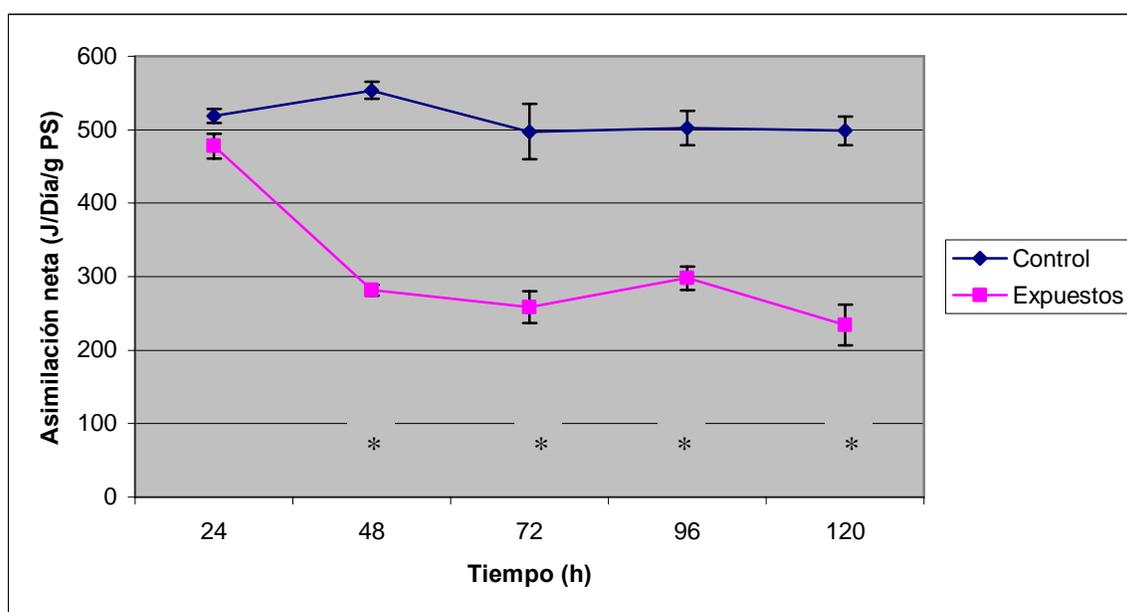


Figura 38: Asimilación neta (J/día/g PS) de *C. carpio* en Controles y Expuestos a 2.00 mg.L^{-1} de Cd. Los datos están expresados como medias \pm ESM (N=10). *Indica significatividad estadística.

Para la Asimilación neta se observó que en las carpas Control y Expuestas a 0.20 mg Cd.L⁻¹ existieron diferencias entre ambos grupos. En las expuestas a 0.30 mg Cd.L⁻¹ hubo diferencias entre las 24 y 96 hs.

En cambio, en los animales expuestos a las dos concentraciones más altas se observó una respuesta similar caracterizada por una reducción (cercana al 50%) y sostenida a partir de las 48 hs.

4.e- Tasa metabólica específica:

En la Tabla 28 se representan los valores de las Tasas Metabólicas para los dos grupos de carpas: Controles y Expuestos al Cadmio. Las determinaciones se efectuaron al final de los períodos.

Cd (mg.L ⁻¹)	Tasas Metabólicas		
	Control	Exposición	p
0.20	100.0 ± 3.7	122.8 ± 3.3	<0.05
0.30	100.0 ± 2.0	95.3 ± 1.4	NS
0.60	100.0 ± 8.1	70.1 ± 1.4	<0.05
2.00	100.0 ± 6.7	77.5 ± 8.7	<0.05

Tabla 28: Tasa metabólica de *Cyprinus carpio* Controles (N=10) y Expuestos a Cadmio (N=10). Los datos están expresados como porcentajes promedios respecto de los Controles ± ESM.

La Tasa Metabólica para los animales Expuestos a 0.30 no tuvo diferencia significativa con sus Controles.

En los Expuestos al resto de las concentraciones se hallaron diferencias significativas con los Controles (p<0.05); en 0.20 se observó un aumento (del 23%) y en 0.60 y 2.00 se registró una reducción del 23-30%.

4.f- Eficiencia de extracción de oxígeno:

En la Tabla 29 se representan los valores de la Eficiencia de Extracción de Oxígeno, para los dos grupos de peces: Controles y Expuestos a cuatro concentraciones de Cadmio.

Cd (mg.L ⁻¹)	Eficiencia de Extracción de Oxígeno		
	Control	Exposición	p
0.20	100.0 ± 3.8	159.0 ± 8.1	<0.05
0.30	100.0 ± 6.3	101.8 ± 7.6	NS
0.60	100.0 ± 3.8	73.9 ± 2.5	<0.05
2.00	100.0 ± 5.6	84.3 ± 8.1	NS

Tabla 29: Eficiencia de Extracción de Oxígeno de los *Cyprinus carpio*; Controles (N=10) y Expuestos a Cadmio (N=10). Los datos están expresados como porcentajes promedio respecto de los Controles ± ESM.

Para los animales expuestos a 0.30 y 2.00 mg.L⁻¹ no se hallaron diferencias con sus controles. Aquellos expuestos a 0.20 y 0.60 mg.L⁻¹ presentaron diferencias significativas con los Controles ($p < 0.05$), aunque en direcciones opuestas; en el primer caso hubo un importante aumento (60%), mientras que en el segundo se registró una disminución del 26%.

4.g- Cociente de amonio:

En la Tabla 30 se indican los valores de Cociente de Amonio para grupos experimentales: Controles y Expuestos a las dos concentraciones menores de Cadmio.

Cd (mg.L ⁻¹)	Cociente de Amonio		
	Control	Exposición	p
0.20	100.0 ± 12.0	132.6 ± 6.6	<0.05
0.30	100.0 ± 13.3	288.3 ± 8.5	<0.05

Tabla 30: Cociente de amonio de *Cyprinus carpio*; Controles (N=10) y Expuestos a Cadmio (N=10). Los datos están expresados como porcentajes promedios respecto de los controles ± ESM.

El cociente de amonio de las carpas Expuestas al metal difirió significativamente de los Controles con registros de aumentos del 33% en 0.20 mg Cd.L⁻¹, mientras que en 0.3 mg.L⁻¹ este parámetro se elevó casi tres veces.

4.h- Campo de crecimiento:

La Tabla 31 presenta los valores de Campo de Crecimiento para los grupos: Control y Expuestos a dos concentraciones de Cadmio.

Cd (mg.L ⁻¹)	Campo de Crecimiento		
	Control	Exposición	P
0.20	100.0 ± 6.3	91.8 ± 1.7	<0.05
0.30	100.0 ± 7.3	69.1 ± 3.9	<0.05

Tabla 31: Campo de crecimiento de *Cyprinus carpio*; Controles (N=10) y Expuestos a Cadmio (N=10). Los datos están expresados como porcentaje promedio relativos a los controles ± ESM.

El Campo de Crecimiento de los animales Expuestos difirió de los Controles. Para ambas concentraciones se observó una disminución estadísticamente significativa en el Campo de Crecimiento.

4.i- Superficies de respuesta:

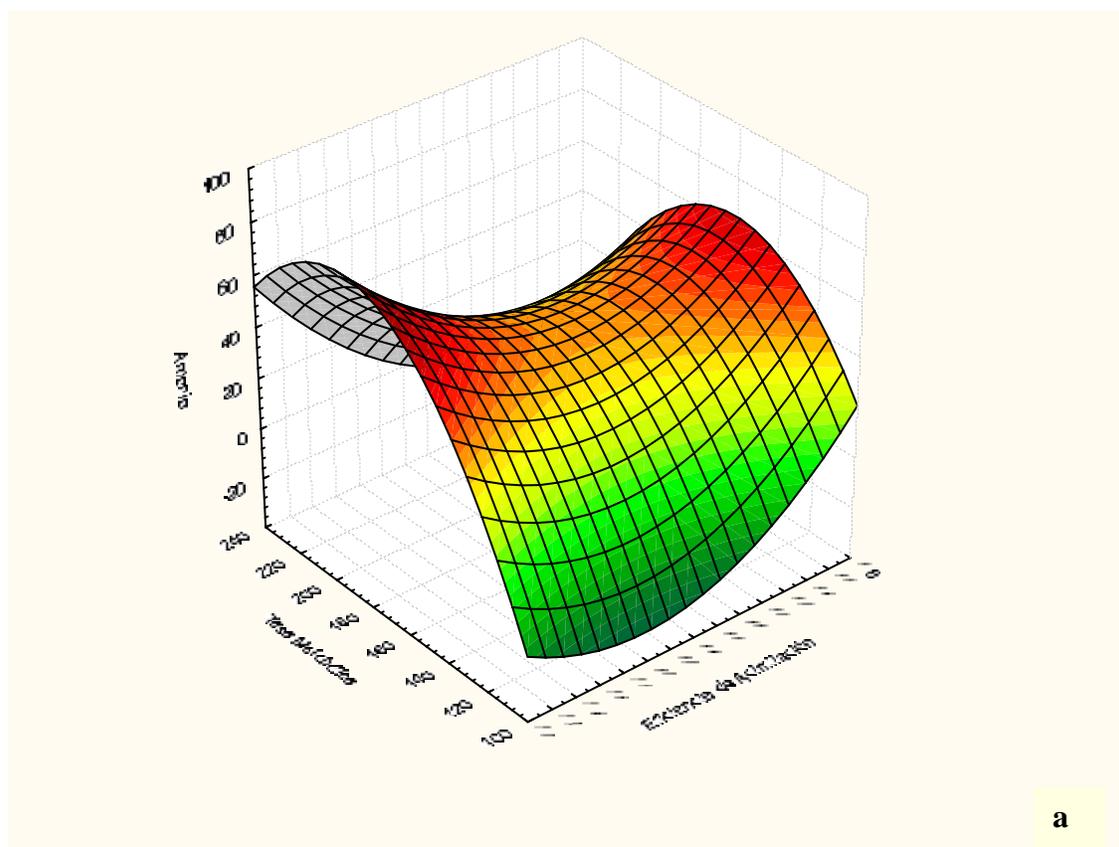
A partir de los datos experimentales, se realizó el análisis de la respuesta integrada de Eficiencia de asimilación (U), Amonio excretado (AE) y Tasa Metabólica (TM) para 0.2 y 0.3 mg Cd.L⁻¹ y se determinaron las ecuaciones predictivas de las respuestas de los animales. A los efectos de estos cálculos se consideraron los valores crudos de dichos parámetros.

En la Tabla 32 se presenta un resumen con los resultados de la aplicación del polinomio utilizado, la regresión y los valores correspondientes a la correlación de Durbin y Watson. Se realizaron regresiones formando pares con las tres variables estudiadas; de ellas, el par TM-AE fue el único estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los dos grupos de carpas expuestas a Cd.

	$\beta 0$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	R^2	F	p	D-W
<i>Control</i>										
U vs TM	397.24	-20.84	+6.20	+0.15	-0.02	-0.01	0.042	0.349	0.571	
U vs AE							0.045	0.381	0.554	
TM vs AE							0.062	0.529	0.487	
<i>Exposición 0.2</i>										
U vs TM	295.87	-2.89	-1.77	+0.06	-0.03	+0.01	0.212	2.153	0.180	
U vs AE							0.029	0.243	0.635	
TM vs AE							0.443	6.367	0.035	2.48*
<i>Control</i>										
U vs TM	-9064,85	+202,28	-4,09	-1,10	-0,02	-4,50.10 ⁻³	2.65.10 ⁻⁶	2.12.10 ⁻⁵	0.996	
U vs AE							0.031	0.253	0.628	
TM vs AE							0.036	0.301	0.598	
<i>Exposición 0.3</i>										
U vs TM	-3582,05	+95,95	-7,67	-0,59	+0,06	+3,90.10 ⁻³	0.086	0.752	0.411	
U vs AE							0.022	0.182	0.681	
TM vs AE							0.439	6.282	0.036	2.03*

Tabla 32: Superficie de respuesta. Valores obtenidos para la regresión lineal, la correlación de Durbin y Watson y parámetros del polinomio resultantes de la integración de la relación entre Eficiencia de asimilación (U), Amonio excretado (AE) y Tasa metabólica (TM) de *Cyprinus carpio* expuestos a 0.20 y 0.30 mg.L⁻¹ de Cd. *Correlación significativa negativa.

En las Figuras 39 y 40 se representan gráficamente los valores determinados por aplicación de los polinomios correspondientes a la TM, U y AE en carpas controles y expuestas a 0.2 y 0.3 mg.L⁻¹ de Cadmio.



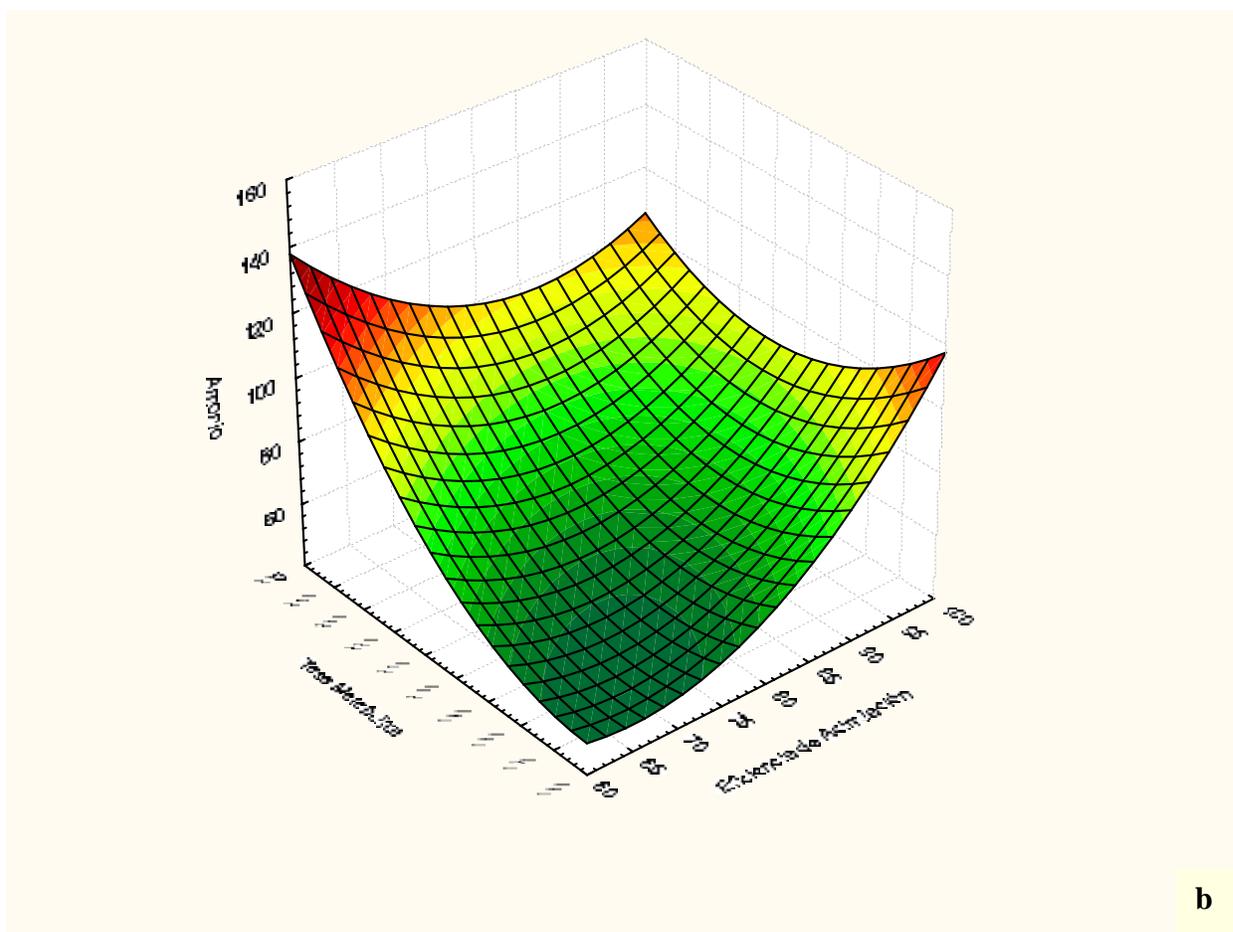
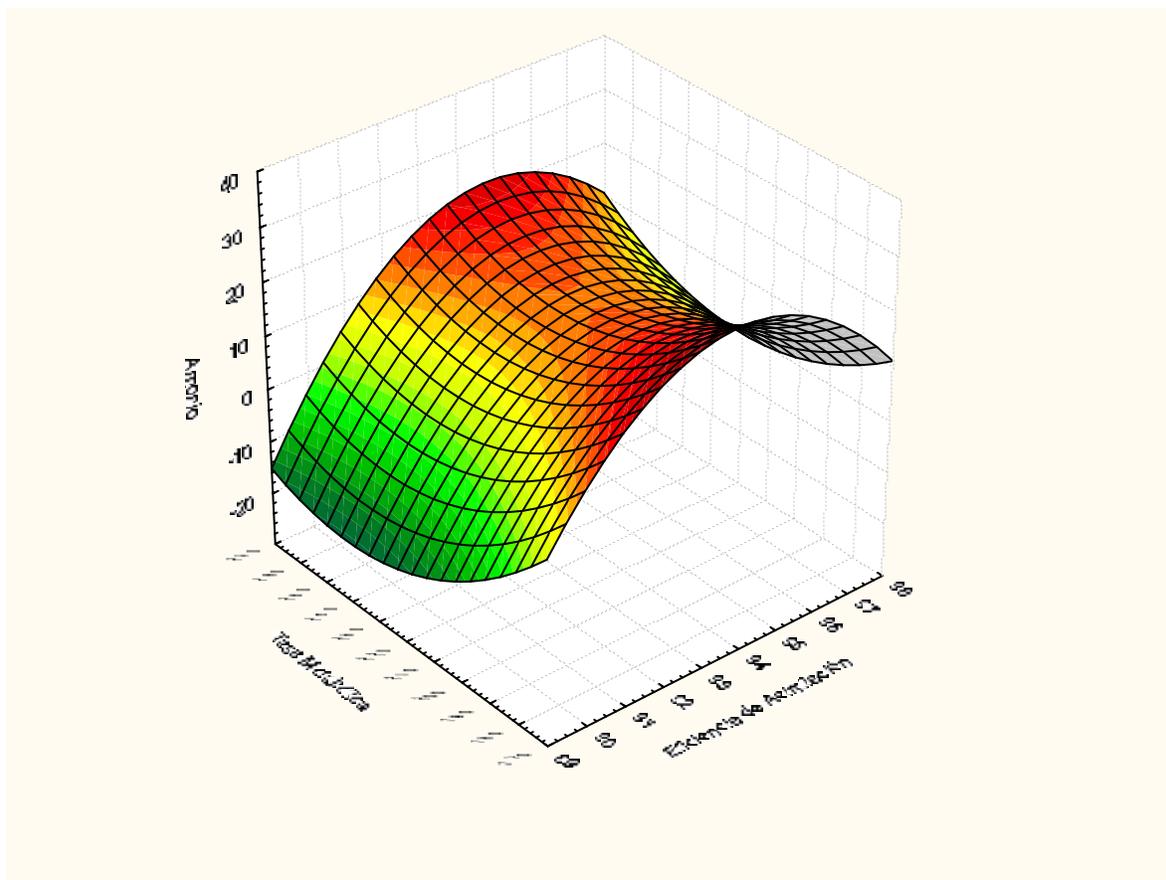


Figura 39: Superficie de respuesta que describe la relación entre AE, U y TM de *Cyprinus carpio*: Control (a) y Expuestos a 0.20 mg.L^{-1} de Cadmio (b).

En las carpas Control (Fig. 39.a) se observa que a bajos valores de TM hay un aumento de la U y de la AE. En cambio, a valores altos de Tasa Metabólica hay una alta excreción de NH_4^+ cuando la asimilación es baja y una disminución cuando la misma es alta.

Por el contrario, en los animales expuestos a Cadmio (Fig. 39.b) el modelo muestra un aumento de la excreción de NH_4^+ y de la asimilación cuando la Tasa Metabólica es alta.



a

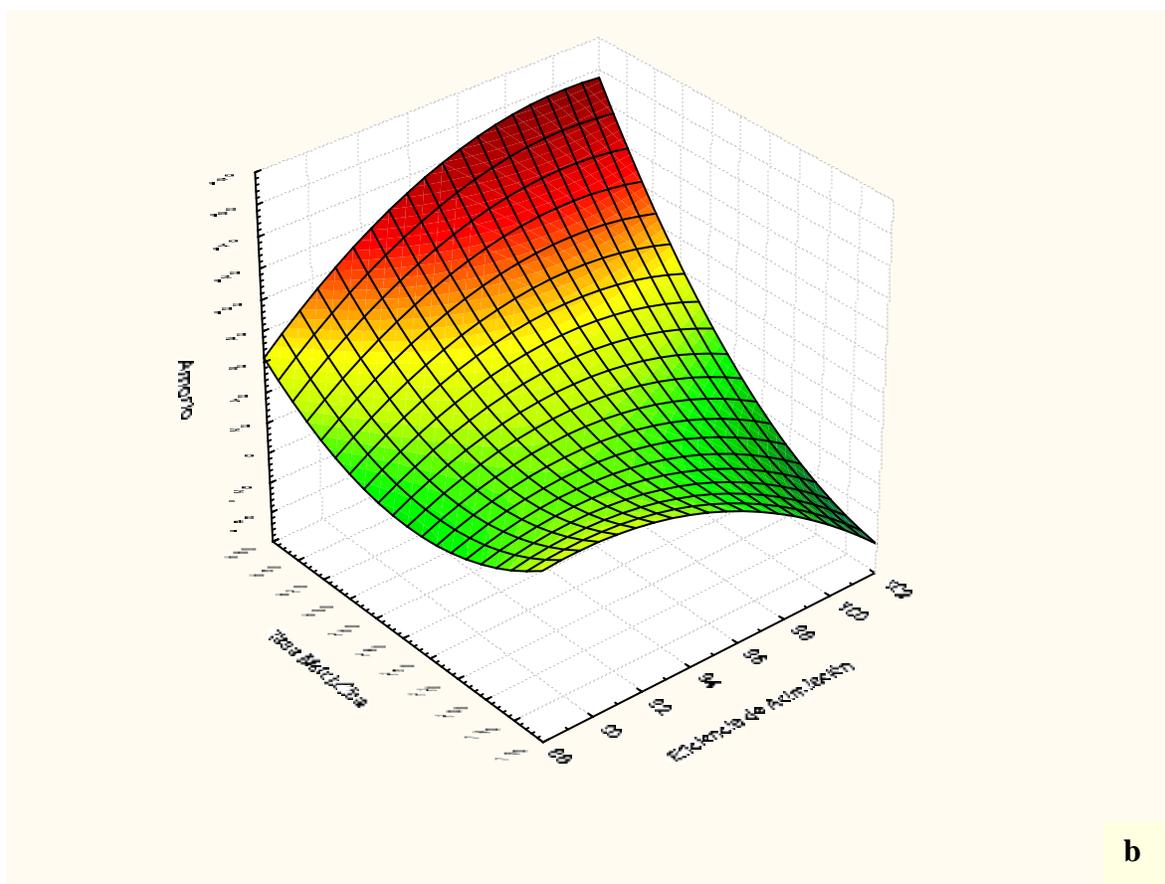


Figura 40: Superficie de respuesta que describe la relación entre AE, U y TM de *Cyprinus carpio*: Control (a) y Expuestos a 0.30 mg.L^{-1} de Cadmio (b).

Los cambios estimados en la Tasa metabólica en función de la Asimilación y la excreción de NH_4^+ de *Cyprinus Carpio* expuestos a 0.30 mg.L^{-1} registraron respuestas similares a las halladas en la concentración más baja.

Discusión

Introducción:

Los bioensayos de toxicidad agudos (ensayos de letalidad) proveen información útil para el estudio de aspectos relevantes para la toxicología comparada de contaminantes sobre la biota acuática. No obstante, se considera que es necesario abordar los problemas ligados a la contaminación del agua mediante la determinación de parámetros de subletalidad, condición ésta que en la realidad ocurre con mayor frecuencia. Este trabajo está motivado en esa propuesta e informar sobre diferentes tipos de respuesta subletales de peces dulceacuícolas expuestos a medios reconstituídos contaminados, en particular con Cd, o a muestras caracterizadas por ser alícuotas de mezclas naturales complejas de diversos tóxicos.

Marco de la Investigación:

Los pioneros en el estudio del comportamiento animal argumentaban que para comprender completamente el mismo se debería conocer el desarrollo, la causa y la evolución de las conductas. Tradicionalmente la Fisiología y la Biología del Comportamiento se visualizaban como dos campos separados y la literatura se focalizaba en una u otra. Actualmente, ambas disciplinas se han integrado relacionando estudios empíricos de laboratorio con observaciones de campo (Grue y col, 2002).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos mediante un dispositivo experimental que permitió estudiar simultáneamente diferentes aspectos del comportamiento natatorio de juveniles de tres especies de la ictiofauna pampásica (*Cyprinus carpio*, *Australoheros facetum* y *Astyanax fasciatus*), mediante una técnica original no invasiva, concentrando las observaciones en algunos aspectos de su actividad natatoria y en su posición espacial, comparando la magnitud de los parámetros determinados entre condiciones basales (o de referencia) y sus cambios luego de su exposición a Cadmio como tóxico de referencia en concentraciones subletales. Esta sería la primera vez que se realiza un trabajo comparativo entre estas tres especies lo que

permitiría estudiar la respuesta diferencial de las carpas, chanchitas y mojarra frente a un mismo contaminante ambiental.

El equipo utilizado presenta, entre otras, la ventaja que las determinaciones se llevan a cabo exponiendo un individuo a diferentes condiciones ambientales siendo, de esa manera, cada individuo, control de si mismo, para los parámetros cuantificados. Además se desarrolló para este trabajo un software original, el cual permitió determinar con exactitud la posición y el tiempo de permanencia de los peces en cada sitio.

Además, con el propósito de alcanzar una comprensión más amplia de los efectos del tóxico, las observaciones comportamentales (Respuestas primarias) fueron complementadas con estudios sobre algunos aspectos de la Fisiología (Metabolismo, Excreción, Campo de crecimiento, etc) y la Morfología de un órgano crítico como es la branquia en peces expuestos al metal (Respuestas secundarias).

Elección de las especies utilizadas:

La elección de dichas especies obedeció a los siguientes criterios básicos: a) *C. carpio* (carpa común) es un teleósteo cosmopolita cuya utilización como especie *test* para la realización de bioensayos de toxicidad es aconsejada y promovida por los Organismos reguladores internacionales; b) *A. fasciatus* es la mojarra más común en toda el área platense; se la encuentra en aguas mansas de arroyos y ríos, y en ambientes cerrados; c) *A. facetum* (chanchita) es una especie sudamericana que, a diferencia de las anteriores, presenta hábitos más bien sedentarios y así ofrece la posibilidad de extender los estudios comparativos a los efectos del metal en un animal poco activo. También cabe señalar que las tres especies se adaptan a las condiciones de cautiverio propias de los ensayos de laboratorio.

Importancia de los factores ambientales:

Se conoce que la toxicidad de los metales pesados está determinada por un número de factores biológicos (edad, sexo, estado nutricional, etc) y ambientales tales como la temperatura, la dureza del agua, el entorno fisicoquímico, el anión

acompañante, etc. (Newman y Clements, 2008; Fangué y col, 2008). Dichos factores también condicionan su bioacumulación (USEPA, 2001). Es por ello que con el fin de reducir la variabilidad de los cambios en la actividad natatoria de los peces atribuibles a esos factores se utilizaron, en cada especie, individuos juveniles de tamaño uniforme (Tabla 6) y las condiciones del entorno fisicoquímico se mantuvieron constantes (Tabla 8); también el flujo abierto de los medios de los acuarios, se controló periódicamente, de modo tal que la renovación de las soluciones ocurrieran en forma permanente y se asegurara la constancia de su perfil fisicoquímico. De esta manera la interpretación de los cambios detectados puede atribuirse a los aspectos biológicos de los peces antes que a factores externos ambientales experimentales.

Aunque pueden existir variaciones en la temperatura corporal, tasa metabólica, pH intracelular y contenido de energía corporal en respuesta a restricciones y demandas ambientales, la mayor parte de los animales tienen un rango de elección para estas variables fisiológicas. Casi todos los animales muestran también una variación rítmica innata, y normalmente sutil, de esas variables. Estas variaciones tienen una base diaria, mareal, lunar y normalmente se relacionan con cambios regulares del ambiente del animal; las primeras se denominan *Ritmos circadianos* (Randall y col, 2002) y en los peces están vinculadas a numerosos procesos fisiológicos (Zhadanova y Reeb, 2006). Debido a la existencia de estos ritmos endógenos, otro factor ambiental que se tuvo en cuenta fue el horario en el que se realizaron los registros y la fijación de un fotoperíodo desde la aclimatación de los animales experimentales. Las cuatro horas de muestreo fueron siempre de 10:00 a 14:00 hs. Cazenave y col (2008) observaron en *Jenynsia multidentata* una variación en la velocidad de nado y el porcentaje de movimientos entre el día y la noche en animales control. También podemos citar a Chakraborty y col (1992) que estudiaron en *Cyprinus carpio* el efecto del fotoperíodo en el consumo de oxígeno, reportando que los máximos y mínimos consumos decrecen cuando se extienden los períodos de luz u oscuridad.

La variabilidad de las respuestas – El Índice de Actividad relativa:

Kolok y col (1998) y Kolok (1999) mostraron que las variaciones individuales asociadas a la *performance* de nado, son importantes e inevitables, aún cuando los peces estudiados sean comparables morfológicamente y estén en el mismo estadio de vida. Ellos concluyeron que el análisis de los datos experimentales se debe realizar usando una aproximación individual, evaluando los parámetros conductuales de cada animal antes y durante la exposición al tóxico. Grillitsch y col (1999) arribaron a conclusiones similares en sus estudios sobre los efectos del Cadmio en el comportamiento (actividad locomotora espontánea) de semi-adultos de *Brachydanio rerio*. En este trabajo confirmamos ese comportamiento al comparar las respuestas de ejemplares de la misma especie y de talla comparable.

Esta circunstancia dificulta el análisis estadístico y la expresión numérica de los resultados experimentales. Para obviar ese inconveniente diseñamos un método de cálculo que permitió estandarizar los resultados en forma numérica mediante un Índice de Actividad Relativa (I_a). A través de este Índice se pudo evaluar y expresar cuantitativamente la actividad natatoria total de los peces, y detectar comparativamente variaciones de la misma en diferentes períodos, condiciones y conjuntos experimentales. La respuesta que se observa en el I_a presenta un comportamiento semejante a las CL-50 de un tóxico. Cuando este último parámetro es bajo está indicando una elevada toxicidad y cuando es alto una baja toxicidad. En nuestro caso un valor bajo de I_a indica una actividad elevada y un valor alto una merma en la actividad (Ossana N, 2005).

Toxicidad del Cadmio para los peces:

Los metales pesados son considerados poluentes del ambiente acuático por su persistencia en el mismo y su tendencia a su bioacumulación en organismos acuáticos. En concentraciones suficientes, es tóxico para todas las formas de vida, incluyendo microorganismos, plantas, animales y el ser humano (Waalkes, 2000). Este elemento se encuentra asociado como el causante de numerosos efectos deletéreos en los peces.

Una vez que el Cadmio es absorbido es transportado por la sangre a diferentes partes del cuerpo. En el hígado induce la síntesis de metalotioneinas. El complejo Cd-metalotioneina se considera menos tóxico que el Cd libre, pudiendo entonces la proteína actuar como agente detoxificante. La liberación del complejo desde el hígado a la sangre es lenta, con el resultado de una acumulación del complejo MT-Cd en ese órgano.

En humanos puede ocasionar: daño y disfunción renal; efectos óseos; incremento de la presión sanguínea sistólica; formación de edemas, proliferación celular y fibrosis en órganos respiratorios; disminución en la fertilidad y efectos fetotóxicos ligeros; carcinogénesis; mutagénesis; supresión de respuesta inmunohumoral (Repetto, 1995).

En peces se observan: i) deformidades esqueléticas, ii) alteración de varios sistemas enzimáticos incluyendo aquellos involucrados en la neurotransmisión, transporte transepitelial, metabolismo intermedio y actividad de oxidasas de función mixta, iii) nado anormal y distorsión corporal iv) alteración de comportamientos individuales y grupales, v) alteraciones en el metabolismo (Scott y Sloman, 2004; Wright y Welbourn, 1994), etc.

Es importante señalar que la literatura registra para la toxicidad aguda del Cadmio para los peces, expresada como CL-50, valores extremadamente variables, a veces con diferencias de varios órdenes de magnitud, para una misma especie, además de las condiciones determinantes de la toxicidad (edad, estadio de desarrollo, sexo) (USEPA, 1985). Cabe señalar que Bulus Rossini y Ronco (2004) determinaron la CL50-96 h para *A. facetum* que resultó 0.091 mg.L⁻¹. En nuestro laboratorio se mostró (de la Torre y col, 2000) que *C. carpio* de peso comparable a los utilizados en este estudio permaneció durante dos semanas en agua potable conteniendo 1.5-1.7 mg Cd.L⁻¹. En fecha reciente la misma USEPA (2001) revisó y actualizó el criterio para la calidad de agua dulce, indicando el uso de dos fórmulas para el cálculo de los Niveles Guía de Cadmio disuelto; uno de ellos, el de “máxima concentración” (o aguda) y otro de “concentración continua” (o crónica); para la dureza del agua utilizada en este estudio esas concentraciones resultan 1,622 y 0,222 µg.L⁻¹, respectivamente. El mismo documento señala,

además, la importancia de adoptar la relación de concentraciones aguda/crónica; es interesante que esa relación oscila entre 0.9-434 (USEPA, 2001) lo que confirma la enorme variabilidad de las relaciones dosis aguda/dosis crónica para peces dulceacuícolas.

La Ley 24051 de Residuos Peligrosos estipula esos niveles entre 0.2 y 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para durezas entre 0-60 y $> 180 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CO}_3\text{Ca}$, respectivamente. La Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación ha adoptado “Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente para Cadmio” (República Argentina, SSRH). Aplicando la fórmula que determina el nivel para Protección de la Biota Acuática (agua dulce) se alcanza el valor de 0.09 $\mu\text{g/L}$.

Las concentraciones utilizadas en nuestro estudio si bien son superiores a dicho nivel, resultaron subletales para las tres especies en los tiempos experimentales. Sin embargo cabe señalar que el nivel de la Subsecretaría mencionada es para protección de la biota acuática, mientras que las nuestras si bien no fueron letales, provocaron alteraciones en los parámetros de diverso carácter evaluados y con un importante grado de reversibilidad, que permitieron un conocimiento más detallado de los efectos tóxicos del Cd como consecuencia de exposiciones de los peces de tipo semi-crónicos.

Como ejemplos de efectos adversos del Cd en los peces podemos citar el trabajo de Pistole y col (2008) quienes observaron un decrecimiento del 30 % en la Tasa Metabólica de *Pimephales promelas* expuestos a concentraciones de Cd que oscilaron entre 1 y 2 mg.L^{-1} ; Watson y Benson (1988) informaron en esta misma especie una reducción en la actividad Na^+/K^+ ATPasa como respuesta inicial frente a la exposición al metal y un daño de las branquias reflejando un mecanismo de defensa; Almeida y col (2001 y 2002) en *Oreochromis niloticus* expuestos a 0.35, 0.75, 1.5 y 3.0 mgCd.L^{-1} (como CdCl_2) mostraron un cambio metabólico, una reducción del contenido de glucógeno y de la captación de glucosa en el músculo blanco.

Efectos del Cadmio sobre el comportamiento de los peces pampásicos:**a) Efectos sobre la actividad natatoria.**

El diseño experimental de este trabajo presenta la ventaja de tener dos controles: a) *Control permanente* (CoP): un animal que permanece a lo largo de todos los períodos del tiempo de experimentación en agua potable; b) *Control experimental*: un animal que pasa sucesivamente por los tres períodos experimentales, Control (AP), Exposición (AP + Cd) y Recuperación (AP).

En la Tabla 10 pueden apreciarse los valores del I_a registrados en peces controles. Los mismos muestran para las tres especies una notable similitud, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. No obstante cabe señalar que ese valor fue ligeramente superior para las chanchitas, lo cual confirma los hábitos más sedentarios de esta especie.

También merece destacarse que el patrón de actividad de cada especie permaneció prácticamente sin cambios a lo largo de las semanas.

Los I_a de los peces en los períodos control de los grupos experimentales (expuestos a tres concentraciones de Cadmio) (Tablas 11, 12 y 13) fueron comparables con los anteriores resultando igualmente próximos a 1.0.

Estos resultados contribuyen a validar la información brindada por el Índice.

Cuando los peces fueron Expuestos al Cadmio, se observó un aumento del Índice en las tres especies y en las tres concentraciones ensayadas, lo cual indica que este contaminante, a esas concentraciones, deprimió significativamente la actividad natatoria. Solamente en las chanchitas expuestas a 0.5 mg Cd.L^{-1} y las mojarras en 0.6 mg Cd.L^{-1} se observó una disminución del I_a .

En relación a lo señalado previamente, es interesante destacar que Drummond y Russom (1989) estudiaron sobre *Pimephales prometas* la toxicidad comportamental debido a la exposición a un gran número de xenobióticos, clasificando los síntomas en tres clases de *síndromes*:

- I) de *hipoactividad*: se reduce la actividad locomotora espontánea y la respuesta frente a un estímulo externo es pequeña o inexistente, batido opercular rápido y corto;

- II) de *hiperactividad*: la actividad aumenta y se aprecia un aumento en la respuesta frente a un estímulo, el batido opercular es amplio;
- III) de *deformidad física*: la actividad está usualmente deprimida, existe una sobreactividad frente a un estímulo; se observan además espasmos, convulsiones, escoliosis/lordosis y hemorragia.

En nuestro caso, el efecto de la exposición al Cadmio durante 4 días se manifestó principalmente en síntomas que correspondieron secuencialmente a los dos primeros tipos. En ningún caso se observó el síndrome de deformidad.

En cuanto a *Cyprinus carpio*, se observa que hubo diferencias con el Control durante la Exposición y la Recuperación, sin diferencias significativas entre Exposición y Recuperación, indicando que no fue suficiente el tiempo de depuración (que en nuestro diseño tuvo una duración de 7 días) y que la misma requeriría un tiempo más prolongado, ya que los valores presentaron una tendencia a retornar a los niveles basales. Matz y col (2007) expusieron larvas de *Danio rerio* a concentraciones de Cd entre 0.02 y 14 mg Cd.L⁻¹ y midieron concentración interna del metal; observaron que luego de 24 horas de pasar los peces a medios limpios no se observaban disminuciones significativas en los niveles de Cadmio. Otros estudios llevados a cabo en *Cyprinus carpio* sugieren que la reducción en el Cadmio acumulado está asociada a la reducción del contenido del metal en el músculo y que los cambios en el contenido de riñones e hígado es más lento. Esto estaría asociado al proceso de depuración en el que el Cd es transferido desde el músculo hacia el hígado y el riñón para su excreción (de Conto Cinier y col, 1999).

Por otra parte, no se puede descartar que el metal haya provocado daños morfológicos los que secundariamente podrían haber afectado aspectos funcionales básicos de los peces, tales como el balance iónico y la respiración; en nuestro caso confirmamos esta posibilidad con los cambios observados de la estructura microscópica (microscopía electrónica de barrido) de las branquias de carpas expuestas a Cadmio (ver más adelante).

Con respecto a *Astyanax fasciatus* se observó que el Índice aumentó considerablemente en todas las concentraciones durante la Exposición y la Recuperación en relación al registrado durante el período Control. Esto sugiere un efecto acumulativo del tóxico, demostrando que esta especie es bastante sensible al contaminante y que la extensión del período de Recuperación también resultó insuficiente para esta especie.

En *Australoheros facetum* en 0.3 y 0.6 mg Cd.L⁻¹ se registró un aumento importante del I_a, el efecto contrario se observó a 0.5 mg Cd.L⁻¹. Tampoco en esta especie se constató una Recuperación total a pesar de haberse observado una tendencia a retornar a los valores del período Control.

En suma, concluimos que, en nuestras condiciones experimentales, las especies analizadas mostraron poseer diferente sensibilidad frente al contaminante, siendo ésta mayor en la mojarra y la carpa; además se halló que la depuración del metal no se completó en los tiempos de Recuperación de nuestros ensayos lo que podría atribuirse a las concentraciones utilizadas en los mismos y sugiriendo tiempos de acumulación y depuración asimétricos.

En relación a lo antedicho, cabe señalar que en un trabajo de Baker y Montgomery (2001) sobre juveniles de *Galaxias fasciatus* expuestos al Cadmio en concentraciones menores a las nuestras, determinaron que para restaurar la alteración del sistema olfatorio dañado por el metal fueron requeridos tiempos de recuperación más prolongados (14 días). Neuman y col (1991) observaron en *Ictalurus nebulosus* que entre 3 y 7 días luego de exposiciones a Cd (entre 25 y 750 µg.L⁻¹) el sistema de electro-orientación de los peces retornaba a valores normales. de Conto Cinier y col (1999) observaron en carpas que luego de una exposición de 127 días a 53 y 443 µg.L⁻¹ de Cd, en el período de recuperación (de 43 días) la desaparición del metal es rápida e inmediata en músculo, mientras que no disminuyen los niveles presentes en hígado y riñón.

Al igual que el Cobre y el Mercurio, el Cadmio también causa la muerte celular en el epitelio olfativo. En este contexto podemos citar el trabajo de Bettini y

col (2006) quienes observaron en *Tilapia mariae* una regeneración completa del tejido olfativo luego de 10 días posteriores a una exposición a Cobre de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$.

b) Efectos sobre las Preferencias espaciales.

En cuanto a la Preferencia Altitudinal (Figuras 15, 16 y 17) pudo observarse que el Cd provocó en las tres especies cambios significativos. Los Controles Permanentes (que permiten establecer los comportamientos basales o de referencia para cada especie) mostraron en el caso de *C. carpio* una preferencia por el fondo del acuario (Figura 15.a), permaneciendo la mayor parte del tiempo en la franja D, mientras que en los peces que fueron expuestos al metal se perdió esa preferencia. A las concentraciones más bajas los animales permanecen un 74% del tiempo en las capas superficiales, mientras que a las dos concentraciones más altas la respuesta es polarizada, repartiéndose entre la superficie (franja A) y el fondo (franja D). Estos resultados sugieren que el Cd daña el sentido de orientación espacial de los peces y el epitelio branquial; este último efecto puede explicar el hecho de que deben permanecer más tiempo en la superficie para compensar el deterioro de sus órganos de captación de oxígeno.

En *Cichlasoma dimerus* expuestos a 100 mg.L^{-1} de (CdCl_2) , Hirt y Domitrovic (2002) observaron las branquias cubiertas de mucus y movimientos de sofocación. Shah (2002) informó que en *Cyprinion watsoni* expuesto a Cobre un aumento en la actividad y la respiración, asociando ambos fenómenos a un aumento en la actividad metabólica lo que puede requerir altos niveles de oxígeno ambiental, provocando así un incremento secundario en la tasa respiratoria.

A. facetum, al igual que las carpas, también mostró preferencia por el fondo del acuario. Pero este comportamiento se vió afectado por el Cd: los animales se desplazaron hacia la superficie del acuario (Figura 16), retornando a la franja D más profunda en el período de Recuperación.

En *A. fasciatus*, por último, se evidenció otro comportamiento, mientras que los Controles Permanentes se localizaron indistintamente en la superficie o el fondo del acuario, los peces expuestos presentaron tres respuestas diferentes: a) a 0.3 mg Cd.L^{-1} los animales se ubicaron en el fondo del acuario, b) a 0.5 mg.L^{-1}

presentaron el mismo patrón que en el Control y c) a 0.6 mg.L^{-1} los peces se desplazaron hacia la superficie (Figura 17).

El conjunto de estos resultados puede tener una implicancia ecotoxicológica relevante ya que sugieren que la presencia prolongada de un contaminante en concentraciones subletales en un ambiente donde cohabiten las tres especies (como en la llanura pampeana), podría provocar en el tiempo efectos diferenciales en la estructura de la comunidad. Estas consecuencias pueden ser más complejas si se incluye en el análisis otros parámetros poblacionales de cada especie (por ejemplo: estructura etaria, proporción de sexos, relaciones tróficas, ritmos circadianos, etc) (Henry y Atchinson, 1991).

En lo referente a la Preferencia Lateral, en *A. facetum* no se encontraron diferencias significativas entre los Controles Permanentes y los peces Expuestos al metal. Por el contrario, hubo diferencias en *C. carpio* y *A. fasciatus*. Las carpas CoP mostraron una distribución diferente de la de los grupos Expuestos; las primeras, durante la mayor parte del tiempo se ubicaron en los laterales del acuario mientras que los expuestos se distribuyeron en forma uniforme, sin ubicaciones claramente dominantes.

Los Controles Permanentes de las mojarras se localizaron en la franja 1 del acuario, y expuestos al Cd solo mostraron diferencias significativas en soluciones de 0.6 mg Cd.L^{-1} ; allí los animales presentaron una tendencia a permanecer en la franja 5 (más alejada del sitio de goteo). Interpretamos este comportamiento como una evidencia que en *A. fasciatus*, el Cd afectó su sentido de orientación siendo importante destacar que evitaron la zona de goteo.

En cuanto a este “rechazo” al sitio de goteo hay evidencias de que esta respuesta podría ser de diferente magnitud según el metal presente en el medio y que estaría involucrando alteraciones en el sistema olfativo de los peces (Svecevicus, 1999). Baker y Montgomery (2001) estudiando las deficiencias sensitivas en *Galaxias fasciatus*, encontraron que el Cadmio es un inhibidor del

sistema olfatorio y de la línea lateral, siendo este último importante para la evasión y detección de predadores así como sensor de corrientes.

Se puede concluir que la actividad natatoria es un parámetro apto como biomarcador de exposición y efecto, con respuestas que se ponen de manifiesto de manera temprana. Es importante resaltar, que los cambios en las preferencias analizadas se detectaron luego de la Exposición al Cadmio de manera inmediata. En cambio, las recuperaciones fueron menos rápidas y en nuestros tiempos experimentales a veces no se alcanzó una reversibilidad completa a los niveles basales.

c) Efectos sobre la velocidad de nado.

El estudio de la capacidad de natación en peces puede dividirse en tres categorías: a) *nado sostenido*: ocurre a bajas velocidades y utiliza primariamente las fibras del músculo rojo y energía derivada de metabolismo aeróbico; b) *nado prolongado*: cubre el espectro de velocidades entre el nado sostenido y el rápido, utiliza tanto fibras musculares rojas (metabolismo aeróbico) como blancas (metabolismo anaeróbico); c) *nado rápido*: utiliza fibras musculares blancas para alcanzar altas velocidades por 15-20 segundos (Santos y col, 2008). El nado prolongado es el más utilizado en laboratorio y se lo describe con valores conocidos como *Velocidad crítica*.

Los estudios referentes a la locomoción de especies de la ictiofauna de nuestro país no son muchos. Merecen citarse, de manera destacada, los trabajos de Trenti y col. (1999) que determinaron en *Corydoras paleatus*, *Jenynsia lineata* y *Cnesterodon decemmaculatus* la capacidad de natación, sobre la base del tiempo de fatiga o de arrastre, concluyendo que *J. lineata* es la mas veloz; Gómez y Ferriz (2002) estudiaron en *Poecilia reticulata* la capacidad de natación en relación al sexo, la talla y morfología hallando diferencias entre los sexos. El mismo grupo de investigadores Gómez y col (2003) encontró para *A. facetum* una relación positiva y significativa entre la longitud estándar o el peso corporal y el tiempo de arrastre (definido como el tiempo necesario para que un individuo sea arrastrado por una

corriente de velocidad constante). Los autores concluyeron que *A. facetum* es un especialista para maniobrar en ambientes estructuralmente complejos con cierta capacidad de aceleración. Posteriormente Gómez y González Naya (2005b) hallaron para *A. facetum* una velocidad de natación que para ejemplares de tamaño comparable a los nuestros osciló alrededor de $15.5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Nuestros datos para el mismo parámetro si bien son comparables con aquellos fueron menores. En cambio, otros valores del mismo parámetro (González Naya y col, 2005a) determinados en *Gambusia cf affinis* son comparables con los de las tres especies estudiadas por nosotros.

En nuestro caso, en las tres especies (Tablas 23, 24 y 25) se observó un aumento la velocidad de natación en el período de exposición al metal. En las carpas y las mojarra los valores mostraron un retorno casi total e inmediato a los valores basales en la Recuperación; en cambio en las chanchitas no se observó esa respuesta. Esto nos indicó que hay un comportamiento diferencial de este parámetro entre las tres especies estudiadas cuya interpretación global no es fácil; una de las causas podría estar asociada a la morfología corporal de las tres especies de peces. Según Webb (1984) la morfología se relaciona con su forma de natación; evidencias similares asociando las *performances* natatorias y aspectos morfológicos fueron reportadas para varias especies de nuestra ictiofauna (Gómez y Freís, 2002; Gómez y col, 2003, González Naya y col, 2005).

Efectos del Cadmio sobre la estructura de las branquias:

Las branquias de los peces constituyen el sitio de vinculación del medio interno y el ambiente (Maina, 1998). El epitelio de las branquias es el sitio de intercambio de gases, regulación iónica, balance ácido-base y excreción de nitrógeno, los tres últimos procesos son controlados por fenómenos de transporte pasivo y activo de varios solutos a través del epitelio de las branquias a nivel celular, las que influyen en los sistemas de regulación iónica (Evans y col, 2005).

El Cadmio se absorbe y acumula en las branquias y como otros metales pesados produce en los peces sofocamiento debido a los precipitados de

mucoproteínas que provoca sobre el epitelio branquial, interfiriendo en procesos fisiológicos fundamentales radicados en ese órgano.

La bibliografía es abundante en lo referente a los efectos del Cadmio sobre la estructura y función branquial. Espina y col. (2000), estudiaron el efecto de concentraciones de Cadmio similares a las ensayadas en este estudio sobre juveniles de la carpa herbívora *Ctenopharygodon idella* encontrando evidencias que permitirían sugerir que las alteraciones ocurridas se producen como efectos secundarios de eventos fisiológicos y morfológicos asociados a una mayor demanda de oxígeno por el deterioro que se produce en las branquias. Hirt y Domitrovic (2002) realizaron ensayos agudos de exposición a CdCl_2 en *Cichlasoma dimerus* observando en los peces expuestos durante 20 horas a 100 mg.L^{-1} una pérdida en la estructura de las laminillas y capilar, con necrosis severa; luego de 96 horas hubo hipertrofia epitelial en los filamentos branquiales y de células de cloruro en las laminillas.

Domitrovic (1997) observó en *Aequidens portalegrensis* expuesto a sulfato de cobre: a) luego de 40 horas, hiperplasia e hipertrofia epitelial, fusión laminillar y de filamentos, b) a las 96 horas esas anomalías fueron más graves y, c) en el período de recuperación las branquias recobraron su morfología normal aunque se mantuvo la hiperplasia epitelial. Por otra parte Kumari y Kumar (1997) estudiaron los efectos sobre las branquias de aguas poluídas observando fusión de lamelas secundarias, inflamación de los filamentos y atrofia lamelar. También podemos citar el trabajo de Erkmen y Kolonkaya (2000) quienes expusieron ejemplares del teleósteo *Capoeta tinca* a agua proveniente de dos ríos de Turquía, observando fusión lamelar e hiperplasia. Cabe mencionar que es llamativa la semejanza de los efectos de los metales sobre las branquias de peces. Por ahora se puede afirmar que las lesiones histopatológicas en las branquias son no específicas y cada una puede ser detectada aún bajo distintas condiciones experimentales de exposición.

Nuestras observaciones del estado de las branquias de las tres especies estudiadas por Microscopía Electrónica de Barrido sustentan lo sugerido por numerosos autores y confirmados por los resultados de determinaciones

fisiológicas. Se observó claramente el deterioro de las branquias de los peces expuestos al Cadmio, especialmente en las células de las lamelas primarias y secundarias que se encontraron dañadas, desprendidas y edematizadas. Se apreció también una fusión de las lamelas secundarias adyacentes (Figuras 16 a 21). Es evidente que el estado de las branquias principalmente en lo referente al cambio morfológico de las lamelas secundarias debe disminuir la eficiencia respiratoria y el grado de su deterioro condicionará la reversibilidad de las alteraciones. En el período de recuperación se observó una restauración estructural parcial de las branquias aunque con una persistencia de las lesiones moderadas como hiperplasia e hipertrofia de las laminillas. Recientemente se ha informado acerca de esta misma respuesta en las branquias de *Pimephales promelas* expuesto a Cu subletal (Tate-Boldt y Kolok, 2008).

En la siguiente Tabla se resumen las patologías observadas al MEB en las branquias de nuestros peces:

Especie	Exposición	Recuperación
<i>Cyprinus carpio</i>	Lamelas primarias y secundarias edematizadas. Deformación estructural. Fusión de lamelas secundarias.	Células epiteliales hipertróficas. No se observa fusión de lamelas
<i>Australoheros facetum</i>	Edema y fusión de lamelas.	Se restablecen los límites celulares.
<i>Astyanax fasciatus</i>	Lamelas primarias y secundarias edematizadas. Gran cantidad de mucus sobre los filamentos. Límites celulares difusos.	Desaparecen el mucus y los edemas. Células normales con límites definidos.

Tabla 33: Resumen de anomalías branquiales observadas en *C. carpio*, *A. facetum* y *A. fasciatus* observadas al microscopio electrónico de barrido luego de su exposición a 0.3 y 0.5 mg Cd.L⁻¹; en la última columna se indican los cambios luego de la transferencia de los peces a medios limpios.

Otros autores como Battaglini y col. (1993) describieron cambios morfológicos similares a los nuestros; Gargiulo y col (1996) observaron en *Carassius auratus* expuestos a 9.7 mg Cd.L^{-1} en medio alcalino que luego de 7 días una importante acumulación de mucus, estando el epitelio respiratorio claramente separado del capilar pilar. También apreciaron un vaciamiento inicial de células mucosas seguido de una buena recuperación luego de 7 días. Estas mismas respuestas histopatológicas fueron observadas en numerosas especies.

Es posible que dichos cambios pudieran no ser específicos ya que las branquias de los peces expuestos a otros metales como Cromo y Cobre muestran imágenes de alteraciones estructurales comparables a las observadas por nosotros (Stouthart y col., 1995; Mazon y col., 2002). Cerqueira y Fernández (2002) demostraron en *Prochilodus scofra* que dichos daños pueden ser reversibles. Palaniappan y col (2008) estudiaron el efecto de $15.5 \text{ mg Pb.L}^{-1}$ en *Catla catla* y observaron hipertrofia e hiperplasia celular, alteraciones en la superficie lamelar y fusión de lamelas.

Efectos del Cadmio sobre biomarcadores fisiológicos:

En los sistemas vivos, el crecimiento implica un balance neto de energía entre la energía incorporada con el alimento, la energía utilizada en los procesos metabólicos y la pérdida en la producción de heces y excretas. Por lo tanto, como el crecimiento es la resultante de un conjunto integrado de diferentes procesos fisiológicos (digestión, asimilación, respiración y excreción), cualquier sustancia que interfiera en ellos, traducirá su efecto en la alteración del crecimiento.

En nuestros peces expuestos a las concentraciones más altas de Cadmio (0.60 y 2.00 mg.L^{-1}) se observó una disminución en la ingesta de alimento de aproximadamente un 50 % (Figuras 25 y 26); también se registró una producción significativa en la producción de heces (Figuras 29 y 30). Ambos comportamientos se vieron acompañados por un aumento en la eficiencia de asimilación y en la asimilación neta (Figuras 31, 32, 33 y 34). Espina y col (1986) observaron en un

ensayo de exposición crónico de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) a un detergente (alquil aril sulfonato de sodio) un aumento en el consumo de alimento y en la asimilación si bien los valores obtenidos fueron inferiores a los de los controles. Ellos concluyeron que el detergente adherido a las partículas de alimento alteraría la permeabilidad del epitelio del intestino.

Moza y col. (1995) expusieron peces a tres concentraciones de Cadmio (0.05, 0.15 y 0.30 mg.L⁻¹) y evaluaron su impacto en la ingesta, en la utilización del alimento y en la digestibilidad. Observaron: una disminución en la captación de alimento y en la eficiencia de uso del mismo; una pérdida de apetito y una disminución en la tasa de crecimiento (a la más alta concentración del metal). Dichos autores concluyeron que frente a una intoxicación los peces responden mejorando la utilización del material ingerido, disminuyendo la eficiencia de conversión de alimento y en el caso de exposiciones crónicas también pueden afectar la digestión.

Otros estudios muestran que peces alimentados con dietas conteniendo metales diferentes del Cadmio (As, Cd, Cu, Pb y Zn) también reducen su ingesta, crecimiento y tasa de supervivencia. Couture y Rajender Kumar (2003) observaron una reducción del 25% en la tasa metabólica en la perca (*Perca flavescens*) expuestas a agua proveniente de lagos de Canadá contaminados con Cd.

En la Tasa metabólica (TM) observamos respuestas distintas; mientras que en la concentración más baja (0.20 mg Cd.L⁻¹) la TM aumentó, en las dos más altas (0.60 y 2.00 mg Cd.L⁻¹) disminuyó significativamente (Tabla 28). Un comportamiento similar se observó en la Eficiencia de Extracción de Oxígeno (Tabla 29). Allin y Wilson (1999) observaron en juveniles de *Oncophrynchus mykiss* expuestos a concentraciones subletales de aluminio una reducción en la ingesta de alimento pero no hallaron diferencias significativas entre tratados y controles respecto a la Tasa metabólica. Por el contrario Pistole y col (2008) observaron una reducción de la TM de entre 30 y 60 % por exposición de *Pimephales promelas* a 1, 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹ de Cd; resultados similares fueron

reportados para la exposición al Cu subletal de *Cyprinus carpio* (De Boeck y col, 2006)

El Cociente amonio se analizó únicamente para las dos concentraciones más bajas (0.20 y 0.30 mg Cd.L⁻¹) observándose un aumento en ambos casos (Tabla 30).

El Campo de Crecimiento es un indicador directo de la calidad del ambiente en relación al mantenimiento de un balance energético positivo y en consecuencia sobre la capacidad de supervivencia, el crecimiento y la reproducción de los animales (Widdows y Donkin, 1991). Hay varios factores que lo influyen tales como la disponibilidad y calidad del alimento, la temperatura y la presencia de contaminantes. En nuestro caso, se observó su disminución significativa en las dos concentraciones estudiadas, lo que fue coherente con los cambios registrados en los parámetros que lo determinan, señalando que el tóxico es un factor perturbador del balance energético global de los peces.

Discusión final:

Las características fisicoquímicas y biológicas de los ambientes acuáticos son extremadamente diversas y variables. De allí que no es fácil establecer criterios generales para definir niveles de concentración máximos permisibles para tóxicos, como criterio para la protección de la biota acuática. En el caso particular del Cadmio es importante considerar, además de su concentración total, otras propiedades como la dureza de los medios en los que se halla disuelto que es un parámetro químico crítico determinante de la calidad toxicológica. La dureza es relevante, ya que aumentos de la concentración de los dos iones involucrados en ella (Calcio y Magnesio) disminuyen la captación del metal a través de las branquias de los peces (WHO, 1992; Hollis y col, 2000) Por esa razón, los niveles guía para protección de la vida acuática (agua dulce superficial) suelen ser variables.

Se demostró que las especies nativas son aptas para su utilización en diversos bioensayos de toxicidad brindando resultados confiables; por ello,

podrían ser incorporados a la batería de *tests* de evaluación de calidad ecotoxicológica de cuerpos de agua continentales. Además, los resultados obtenidos permitieron establecer diferencias de sensibilidad entre las especies.

Se concluye que los parámetros estudiados pueden ser utilizados como Biomarcadores de efecto subletal de los peces cuando se los expone a tóxicos. La alteración de estos parámetros son de gran importancia ecológica para los peces debido a que pueden ver su *fitness* perturbado.

Anexo I

Estudio Preliminar de Aplicación **Efectos de muestras del agua del Río Luján sobre la natación de *Cyprinus carpio***

Introducción

Los ríos y arroyos son cursos de agua que fluyen a lo largo de un lecho (de tierra, arena, etc) en dirección hacia el mar (Haslam, 1990). Son sistemas abiertos cuyos componentes son cambiantes a lo largo del tiempo y de su curso, sometidos a la influencia de las condiciones climatológicas y características geológicas de la cuenca. En 1980 Robin Vannote y col. propusieron el concepto de *Río Continuo*, el cual integra características físicas y biológicas de sistemas lóticos. Desde las cabeceras hacia la desembocadura, las variables físicas y químicas de un río presentan un gradiente continuo que incluye, por ejemplo, ancho, profundidad, velocidad, caudal, temperatura y composición química. Este gradiente determina una serie de respuestas en las poblaciones que habitan en ellos en un continuo proceso de ajustes a patrones bien definidos de carga, transporte, utilización y almacenamiento de materia orgánica a lo largo del río. Si bien el modelo fue desarrollado para ríos no alterados podría también aplicarse a cuerpos de agua afectados por perturbaciones tales como enriquecimiento de nutrientes o polución orgánica.

En general, los ríos pampeanos se originan en depresiones poco profundas en la llanura, sus cabeceras están faltas de vegetación o son de baja diversidad y su fuente primaria de agua es la subterránea.

Los ríos y canales urbanos del Gran Buenos Aires en particular registran a veces situaciones de contaminación con cantidades de xenobióticos de distinto carácter, que pueden llegar a afectar severamente los diferentes usos del agua.

Características físicas generales del Río Luján.

El Río Luján pertenece a la denominada pampa húmeda y por sus características geológicas a la llanura Chaco Pampeana.

Según la antigua clasificación de Thornthwaite (1948) esta zona pertenece, por el índice hídrico, al clima templado húmedo a subhúmedo, con una influencia importante de los frentes fríos y tropicales procedentes, los primeros, del océano Pacífico y de la zona ecuatorial los segundos.

Geológicamente, la cuenca del Río Luján está dentro de la Región Natural denominada Pampa Ondulada con una caracterización de un relieve suavemente ondulado, producto del drenaje existente, generado por una cantidad de lluvias superiores a los 1000 milímetros anuales (Cappannini, 1961; Sala, 1972). Esta característica también explica la acentuada susceptibilidad del río a la erosión que en muchos casos determina el ancho de su valle aluvial. Los sedimentos superficiales están formados por un potente estrato de loess, cuya granulometría decrece de SO a NO. El horizonte superficial, si no está erosionado, alcanza un espesor de unos treinta centímetros y tiene una textura franco limosa y una estructura granular, estando bien provisto de materia orgánica.

La cuenca del Río Luján cubre 2690 Km² y el río, de 128 Km de extensión, corre en dirección SO a NO, con un valle aluvial sumamente amplio. Nace en el Partido de Suipacha y desemboca en el Estuario del Plata; la cuenca se distribuye en los partidos de Suipacha, Mercedes, Luján, San Andrés de Giles, Pilar y Escobar. Su caudal proviene principalmente del drenaje de los excedentes hídricos provenientes de las importantes precipitaciones que a lo largo de todo el año caen en su amplia cuenca y de los afloramientos de la freática. Las mareas normales del Océano Atlántico afectan en muy escasa medida su altura. Las Sudestadas afectan en mayor medida al cauce superior del río Luján, penetrando el agua del Estuario del Plata hasta la altura de la Ruta Nacional N° 9. A la altura de la localidad de Jáuregui, el río se halla embalsado por un aprovechamiento hidroeléctrico privado que ha producido una elevación del pelo de agua en ocho metros y una cola de remanso que llega hasta una distancia de quince kilómetros del cierre. Un aprovechamiento de menor magnitud con fines recreativos se encuentra en la ciudad de Luján.

Uso de la tierra de la cuenca del Río Luján

Guichón y col (1999) han definido para esta cuenca las siguientes categorías:

1. Rural

- 1.1- Ganadero: actividad ganadera extensiva
- 1.2- Ganadera agrícola: actividad ganadera extensiva en pastizales naturales, incluyendo algunas parcelas agrícolas.
- 1.3- Agrícola ganadero: predomina la actividad agrícola e incluye algunas parcelas ganaderas.
- 1.4- Agrícola intensivo: fruticultura, horticultura y floricultura.
- 1.5- Forestal: plantaciones de *Eucaliptus sp* y *Populus sp*.

2. Urbano

- 2.1- Urbano: ciudades, pueblos, áreas suburbanas.
- 2.2- Periurbano: zonas mixtas con asentamientos humanos, espacios y parcelas abandonadas con escaso uso.
- 2.3- Residencial: casas, quintas, clubes.
- 2.4- Servicios: aeródromos, parques y recreos.
- 2.5- Industrial.

Impacto de la contaminación en la calidad de agua del río.

Como se acaba de indicar, la zona ha sido y es utilizada para explotación agrícola-ganadera; sin embargo, con el crecimiento de las ciudades se ha incrementado también la actividad industrial, especialmente en la subcuenca inferior que está constituida por los arroyos y tierras que drenan en el tramo del río más cercano a la desembocadura (Giorgi, 2000).

La cuenca del río Luján presenta un estado ecológico variable con un deterioro paulatino hacia la desembocadura, concentrado en dos tramos. En el primero (entre Mercedes y Luján) debido a la contaminación orgánica y a una moderada influencia de la actividad agropecuaria que aporta nutrientes, y en otro (aguas abajo de Pilar) debido al vertido de residuos urbanos e industriales. El tramo entre Luján y Pilar está muy

eutroficado, presentando productividades altas y esporádicos episodios de anoxia asociados a las fluctuaciones anuales de temperatura y carga orgánica (Momo y col, 2003). En el tramo inferior hay una marcada discontinuidad dada por el ingreso de aguas provenientes del Paraná de las Palmas, luego de la confluencia con el Canal Gobernador Arias.

Objetivos:

Encarar un estudio preliminar y parcial de aproximación para aplicar algunas de las técnicas desarrolladas en este trabajo al estudio del impacto en *Cyprinus carpio* de un medio natural contaminado (agua del Río Luján) sobre la magnitud de algunos biomarcadores conductuales y la estructura microscópica de las branquias. Asimismo, explorar la existencia de una correlación entre los parámetros fisicoquímicos y los parámetros comportamentales de los peces.

También se compararán los resultados de los diferentes sitios del río muestreados y las posibles variaciones atribuibles a las estaciones climáticas.

Materiales y Métodos

Organismos Test:

Se utilizaron juveniles de *Cyprinus carpio* (carpa común).

Diseño experimental:

Las condiciones ambientales fueron las descritas en el capítulo Materiales y Métodos (página 60).

Para la exposición, se tomaron muestras de agua de tres sitios del Río Luján, uno –aguas arriba- de bajo impacto antrópico (MJ García), otro intermedio, industrial (Jáuregui) y el tercero, aguas abajo, luego de alcanzar la periferia Oeste del Partido, a la altura del cruce con la Ruta Provincial N° 6 (Figura 42). El primero fue considerado como sitio de referencia mientras que los resultados obtenidos en el segundo y tercero fueron considerados para determinar los efectos globales y combinados de los efluentes volcados al río en los tramos que median entre cada sitio de muestreo. Las distancias

aproximadas entre dichos sitios son las siguientes: MJ García-Jauregui, 35-40 Km y Jáuregui-Cruce con Ruta Nº 6, 15-20 Km.

Se realizaron tres muestreos: invierno y primavera de 2005 y verano de 2006.



Figura 41: Mapa de la Cuenca del Río Luján y ubicación de las estaciones de muestreo. 1: MJ García; 2: El Timón y 3: Ruta 6.

Los ensayos de toxicidad de las muestras se desarrollaron a lo largo de tres períodos sucesivos (Figura 42):

- a) *Aclimatación* [A] en agua potable (AP),
- b) *Control* [C] en AP;
- c) *Exposición* [E], en la que el AP fue reemplazado por agua procedente del río.

A diferencia de los protocolos anteriores, en este Estudio se omitió el período de Recuperación.

a) *Aclimatación* [A]

Este período se extendió durante 7 días. Durante el mismo los animales en AP fueron alimentados *ad libitum* (ver Materiales y Métodos, página 60).

b) *Control* [C]

Los peces continuaron en AP por 4 días. Durante este período y los subsiguientes los animales fueron alimentados diariamente con una cantidad de alimento equivalente al 2% de su peso corporal.

c) *Exposición* [E]

El AP fue reemplazada por la muestra de agua del Río Luján durante 5 días.

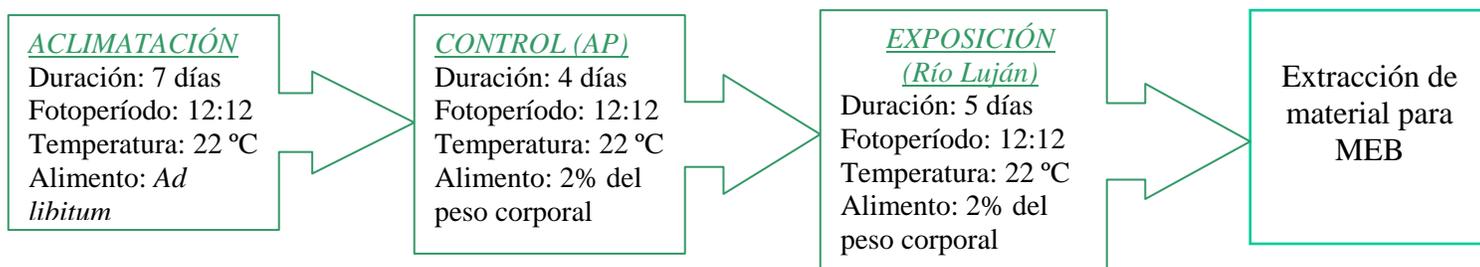


Figura 42.: Diseño experimental utilizado para los bioensayos conductuales y morfológicos de toxicidad de muestras del agua del Río Luján.

Parámetros evaluados:

Se determinó el perfil Físicoquímico de las muestras (1), se registraron parámetros Comportamentales (2) y Morfológicos (3) de los peces.

1) **Físicoquímicos:** sobre alícuotas de los medios (Controles en AP y muestras de agua del río) tomadas durante los ensayos.

2) **Comportamentales:** durante 4 horas (de 10 a 14 hs) se registraron diariamente los siguientes parámetros:

2.a) *Actividad natatoria* (I_a)

2.b) *Preferencias espaciales:*

2.b.1. *Preferencia Altitudinal*

2.b.2. Preferencia Lateral

En todos los casos se siguió el procedimiento indicado en las páginas 64 y 65 (Materiales y Métodos). La expresión de los resultados y el análisis de la significatividad estadística de las diferencias de cada parámetro comportamental se realizó conforme a lo descrito en páginas 75 y 76.

3) Morfológicos: *Microscopía electrónica de branquias (MEB)*:

Luego del período de exposición los animales fueron sacrificados y sus branquias se fijaron conforme a lo descrito en el Anexo II para su estudio al microscopio electrónico de barrido. Sólo se procesaron los peces del muestreo de invierno 2005.

Resultados

1- Parámetros fisicoquímicos de los medios de ensayo:

a) Muestreo de Invierno 2005

En la Tabla 33.a se presentan los valores de algunos parámetros fisicoquímicos de muestras tomadas de los acuarios, (Controles de AP y agua del río).

Parámetros	Control	M.J.García	El Timón	Ruta 6
pH	8.3 – 8.8 (24)	8.6 ± 4.10^{-3} (24)	8.6 ± 9.10^{-3} (8)	8.6 ± 9.10^{-2} (8)
OD (mg.L ⁻¹)	6.8 – 7.9 (12)	7.3 ± 0.3 (4)	6.9 ± 0.3 (4)	6.9 ± 0.3 (4)
Dureza (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	75.9 – 82.3 (12)	216.5 ± 0.9 (4)	163.6 ± 0.9 (4)	163.6 ± 0.9 (4)
Conductividad (μS.s ⁻¹)	724 - 774 (12)	1906 ± 18.1 (4)	1553 ± 21.3 (4)	1553 ± 21.3 (4)
Cd (mg.L ⁻¹)*		< 0.02(8)	< 0.02(8)	< 0.02(8)
Cr (mg.L ⁻¹)*		< 0.05(8)	< 0.05(8)	< 0.05(8)
Pb (mg.L ⁻¹)*		< 0.10(8)	< 0.10(8)	< 0.10(8)

Tabla 33.a: Parámetros fisicoquímicos de los medios: Controles (AP); Exposición (agua del río). Medias ± ESM. * Mediciones realizadas en el CIDEPINT-CIC. Entre paréntesis número de determinaciones.

En la Tabla 33.b se hallan otras mediciones químicas realizadas sobre las muestras del río (complementarias de las indicadas en la Tabla 33.a).

Parámetros	M.J.García	El Timón	Ruta 6
Cloruros	371	268	285
Sólidos disueltos totales	2152	1870	1939
Nitratos	1.4	0.7	0.6
Hierro (1.37)	1.06	0.3	0.03
Manganeso (0.8)	0.25	0.07	0.01
Plomo ($1.3 \cdot 10^{-4}$)	<0.03	0.02	0.03
Cobre (0.1)	0.01	0.004	0.005
Zinc (0.05)	0.03	0.007	0.008
Cadmio ($5.0 \cdot 10^{-3}$)	<0.003	<0.002	0.002
Mercurio ($2.9 \cdot 10^{-5}$)	<0.3	<0.001	0.001
Cromo ($2.5 \cdot 10^{-3}$)	0.02	<0.02	<0.02

Tabla 33.b: Parámetros químicos del agua del río Luján (muestreo de invierno 2005). Entre paréntesis, Niveles Guía de Agua Ambiente para la protección de la biota acuática. Datos en mg.L^{-1} .

b) Muestreo de Primavera 2005

En la Tabla 34.a se presentan los valores de algunos de los parámetros fisicoquímicos de muestras tomadas de los acuarios. En este muestreo no se tomaron muestras en Ruta 6.

Parámetros	Control	M.J.García	El Timón
pH	8.5 – 8.8 (24)	$8.5 \pm 0.6(8)$	$8.6 \pm 0.1(8)$
OD (mg.L^{-1})	7.1 – 7.9 (8)	$7.2 \pm 0.2(4)$	$8.1 \pm 0.2(4)$
Dureza ($\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$)	75.9 – 76.8 (8)	$141.9 \pm 22.1(4)$	$153.5 \pm 0.8(4)$
Conductividad ($\mu\text{S}.\text{s}^{-1}$)	744 – 746 (8)	$1262 \pm 106.0(4)$	$1488 \pm 30.4(4)$
Cd (mg.L^{-1})*		< 0.02(8)	< 0.02(8)
Cr (mg.L^{-1})*		< 0.05(8)	< 0.05(8)
Pb (mg.L^{-1})*		< 0.10(8)	< 0.10(8)

Tabla 34.a: Parámetros fisicoquímicos de los medios: Controles (AP); Exposición (agua del río). Medias \pm ESM. * Mediciones realizadas en el CIDEPINT-CIC. Entre paréntesis número de determinaciones.

Algunas mediciones químicas complementarias realizadas sobre muestras de los dos sitios están en la Tabla 34.b fueron realizadas sobre las muestras tomadas en los sitios de muestreo.

Parámetros	M.J.García	El Timón
Cloruros	405.6	379.7
Sólidos totales	2580	2130
Nitratos	2.0	12.0
Hierro (1.37)	<0.01	<0.01
Manganeso (0.8)	0.24	0.025
Plomo ($1.3 \cdot 10^{-4}$)	0.031	0.022
Cobre (0.1)	0.009	0.007
Zinc (0.05)	<0.005	0.017
Cadmio ($5.0 \cdot 10^{-3}$)	0.003	<0.002
Mercurio ($2.9 \cdot 10^{-5}$)	<0.001	<0.001
Cromo ($2.5 \cdot 10^{-3}$)	<0.02	<0.02

Tabla 34.b: Parámetros químicos del agua del río Luján (muestreo de primavera 2005). Entre paréntesis, Niveles Guía de Agua Ambiente para la protección de la biota acuática. Datos en mg.L^{-1} .

c) Muestras de Verano

En la Tabla 35.a se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos de muestras tomadas de los acuarios.

Parámetros	Control	M.J.García	El Timón	Ruta 6
pH	8.5 – 9.4 (24)	$8.8 \pm 0.1(8)$	$8.9 \pm 0.1(8)$	$8.6 \pm 0.1(8)$
OD (mg.L^{-1})	7.2 – 8.6 (12)	$7.2 \pm 0.1(4)$	$7.17 \pm 0.1(4)$	$7.9 \pm 0.4(4)$
Dureza ($\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$)	75.9 – 76.8 (12)	$141.9 \pm 22.1(4)$	$94.3 \pm 1.5(4)$	$153.5 \pm 0.8(4)$
Conductividad ($\mu\text{S}.\text{s}^{-1}$)	761 – 840 (12)	$1122 \pm 12.4(4)$	$904.2 \pm 4.4(4)$	$967 \pm 2.0(4)$
Cd (mg.L^{-1})*		< 0.02(8)	< 0.02(8)	<0.02(8)
Cr (mg.L^{-1})*		< 0.05(8)	< 0.05(8)	<0.05(8)
Pb (mg.L^{-1})*		< 0.10(8)	< 0.10(8)	<0.10(8)

Tabla 35.a: Parámetros fisicoquímicos de los medios en cada período experimental: Controles (AP); Exposición (agua del río). Medias \pm ESM. * Mediciones realizadas en el CIDEPINT-CIC. Entre paréntesis número de determinaciones.

Las siguientes determinaciones químicas complementarias fueron realizadas sobre las muestras de agua del río utilizadas en los bioensayos.

Parámetros	M.J.García	El Timón	Ruta 6
Cloruros	206.4	46.1	53.4
Sólidos totales	1210	600	NM
Nitratos	1.45	1.97	NM
Hierro (1.37)	0.01	0.05	NM
Manganeso (0.8)	<0.005	0.018	0.042
Plomo ($1.3 \cdot 10^{-4}$)	<0.02	<0.02	<0.02
Cobre (0.1)	<0.01	<0.01	<0.01
Zinc (0.05)	0.05	<0.01	-----
Cadmio ($5.0 \cdot 10^{-3}$)	<0.002	<0.002	NM
Cromo ($2.5 \cdot 10^{-3}$)	0.006	<0.006	<0.006

Tabla 35.b: Parámetros químicos del agua tomada en M.J.García, El Timón y Ruta 6 (muestreo de verano 2006). Entre paréntesis, Niveles Guía de Agua Ambiente para la protección de la biota acuática. Datos en mg.L^{-1} .

2- Parámetros comportamentales

Los resultados se expresaron como promedios (para actividad natatoria) y como porcentajes medios (para preferencias) \pm ESM.

2.a) Actividad natatoria

En la Tabla 36 se presentan los *Indices de Actividad Relativa* para los los tres sitios estudiados en el muestreo de Invierno 2005.

Estación	Control	Exposición	P
M.J.García	1.144 ± 0.224	1.072 ± 0.143	NS
El Timón	1.008 ± 0.050	1.059 ± 0.135	<0.05
Ruta 6	1.018 ± 0.063	1.418 ± 0.471	<0.05

Tabla 36: Índice de Actividad Relativa (I_a) para *C.carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Invierno 2005). Medias \pm ESM. Control (N=16); Exposición (N=20).

Solamente se encontraron aumentos significativos del Índice entre el período Control y el de Exposición para El Timón y Ruta 6.

Estación	Control	Exposición	P
M.J.García	1.004 ± 0.023	3.333 ± 1.077	<0.05
El Timón	1.017 ± 0.035	1.108 ± 0.078	NS

Tabla 37: Índice de Actividad Relativa (I_a) para *C.carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Primavera 2005). Medias ± ESM. Control (N=16); Exposición (N=20).

En el *muestreo de Primavera 2005* se observó una elevación significativa del I_a en la muestra de M.J.García: el I_a aumentó durante la Exposición al agua del río.

Estación	Control	Exposición	P
M.J.García	1.009 ± 0.718	1.067 ± 0.120	NS
El Timón	1.028 ± 0.109	1.067 ± 0.143	NS
Ruta 6	1.018 ± 0.084	2.039 ± 0.786	<0.05

Tabla 38: Índice de Actividad Relativa (I_a) para *C.carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Verano 2006). Medias ± ESM. Control (N=16); Exposición (N=20).

En las muestras de *Verano 2006* también hubo una diferencia significativa en el I_a entre el Control y el agua proveniente de Ruta 6.

En la tabla 39 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el Índice de actividad para las tres estaciones climáticas y los tres sitios muestreados en el río. En todos los casos positivos (indicados con S) ocurrió una depresión significativa de la actividad natatoria de los peces.

	Invierno	Primavera	Verano
M.J.García	NS	S	NS
El Timón	S	NS	NS
Ruta 6	S	**	S

Tabla 39: Resumen de los cambios registrados en el I_a de *C.carpio* luego de su exposición a muestras del río Luján. S: cambio significativo; **No determinado.

2.b) Preferencias espaciales

2.b.1) Preferencia Altitudinal

En la Tabla 40 se presentan los resultados correspondientes a las Preferencias Altitudinales y la significatividad estadística de las diferencias registradas en las muestras de los tres sitios analizados durante el *Muestreo de Invierno 2005*.

Capa	M.J.García		El Timón		Ruta 6	
	Control	Exposición	Control	Exposición	Control	Exposición
A	13.9 ± 2.3	9.0 ± 1.5	22.7 ± 2.3*	9.2 ± 2.1	11.5 ± 4.5	16.7 ± 5.5
B	16.9 ± 1.4	5.5 ± 0.9	10.4 ± 1.1	23.5 ± 8.8	16.4 ± 4.4	16.7 ± 6.9
C	25.9 ± 4.3*	16.3 ± 3.5*	19.5 ± 3.8	23.7 ± 5.1	22.9 ± 4.9	18.4 ± 5.8
D	43.3 ± 5.4*	69.1 ± 2.1*	47.3 ± 2.6*	43.6 ± 9.7*	49.2 ± 12.8*	48.1 ± 13.9

Tabla 40: Preferencias altitudinales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras de agua del río Luján (Muestreo de Invierno 2005). Frecuencia porcentual, medias ± ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las capas de cada período. A: capa superficial, B y C: capas intermedias, D: capa profunda. Control (N=16); Exposición (N=20).

Se observó que los animales Expuestos a la muestra de M.J. García tuvieron una clara preferencia por el fondo del acuario por desplazamiento desde las capas A y B. En cambio, en los animales expuestos a agua de El Timón y de Ruta 6 no se apreciaron cambios importantes en el perfil de su distribución altitudinal.

En la Tabla 41 se exponen las Preferencias Altitudinales y la significatividad estadística de los datos experimentales de dos sitios analizados durante el *Muestreo de Primavera 2005*. Se presentan los registros de las localizaciones en cada período (Control y Exposición).

Capa	M.J.García		El Timón	
	Control	Exposición	Control	Exposición
A	33.9±13.8	33.3±7.7	33.8±9.5	36.4±9.3
B	10.5±5.2	10.3±4.6	11.5±1.8	9.9±1.6
C	14.2±5.8	19.9±7.4	19.3±9.3	18.4±9.4
D	41.2±11.7	36.4±6.2	36.3±12.3	35.3±12.8

Tabla 41: Preferencias altitudinales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras de agua del río Luján (Muestreo de Primavera 2005). Frecuencia porcentual, medias ± ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las capas de cada período. A: capa superficial, B y C: capas intermedias, D: capa profunda. Control (N=16); Exposición (N=20).

No se hallaron diferencias significativas en ninguno de los casos; los peces presentaron en ambos períodos experimentales la misma tendencia a permanecer la mayor parte del tiempo distribuidos por igual entre las capas superficial y profunda de los acuarios.

En la Tabla 42 se presenta la información referida a las Preferencias Altitudinales de las carpas expuestas a muestras de tres sitios del río, correspondientes al *Muestreo de Verano 2006*.

Capa	M.J.García		El Timón		Ruta 6	
	Control	Exposición	Control	Exposición	Control	Exposición
A	11.0 ± 5.5	27.6 ± 8.9	36.5 ± 11.1	35.0 ± 8.3	38.9 ± 18.5	27.6 ± 8.9
B	8.6 ± 5.7	17.6 ± 6.6	8.5 ± 1.2	12.7 ± 1.5	11.7 ± 4.8	17.7 ± 6.6
C	24.1 ± 7.4	21.3 ± 4.6	19.7 ± 8.7	21.2 ± 8.3	26.8 ± 8.6	21.4 ± 4.6
D	49.9 ± 9.4*	33.3 ± 10.4	35.1 ± 13.3	30.9 ± 9.3	22.4 ± 7.7	33.3 ± 10.4

Tabla 42: Preferencias altitudinales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras de agua del río Luján (Muestreo de Verano 2006). Frecuencia porcentual, medias ± ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las capas de cada período. A: capa superficial, B y C: capas intermedias, D: capa profunda. Control (N=16); Exposición (N=20).

Se observa en el 50% de las veces los animales Control de M.J.García se hallaron en la capa profunda; esto se reduce a 33% en la Exposición donde los peces migran a las capas superiores. En El Timón y Ruta 6 no se registraron diferencias ni entre las muestras ni entre la posición de los animales en cada caso.

En la tabla 43 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la Preferencia Altitudinal para las tres estaciones climáticas y los tres sitios de muestreo en el río:

	Invierno	Primavera	Verano
M.J.García	S	NS	S
El Timón	NS	NS	NS
Ruta 6	NS	**	NS

Tabla 43: Resumen de los cambios registrados en la Preferencia Altitudinal de *Cyprinus carpio* luego de su exposición a muestras del río Luján. S: cambio significativo; **No determinado.

2.b.2) Preferencia Lateral

Las Preferencias Laterales y la significatividad estadística de los datos experimentales del impacto de las muestras de los tres sitios del río durante el *Muestreo de Invierno 2005* se pueden apreciar en la Tabla 44. Se presentan los registros de las veces de sus localizaciones en cada sitio y período (Control y Exposición).

Franja	M.J.García		El Timón		Ruta 6	
	Control	Exposición	Control	Exposición	Control	Exposición
1	10.3±0.8	14.9±2.5	25.6±3.6	34.7±4.8*	37.7±4.6*	40.4±11.9*
2	13.1±3.9	22.6±2.3*	21.7±4.4	14.3±2.1	10.5±4.2	7.0±1.5
3	21.6±5.4	21.2±0.2*	12.7±2.6	13.5±2.1	4.6±1.4	7.2±3.2
4	25.6±5.5*	22.9±0.8*	18.9±2.6	15.8±1.5	12.8±4.6	8.7±2.7
5	29.4±6.0*	18.2±0.6	20.8±4.8	28.6±8.4	35.1±4.8*	36.5±10.5

Tabla 44: Preferencias laterales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Invierno 2005). Frecuencia porcentual medias \pm ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las franjas de cada período. Control (N=16); Exposición (N=20).

En este *Muestreo de invierno 2005* se observa en los animales Control de M.J.García una clara tendencia a permanecer en las franjas 3 - 5, mientras que los peces expuestos al agua del río se han desplazado a las franjas medias (2, 3 y 4) de los acuarios. Durante la exposición de los animales al agua de El Timón y Ruta 6 no hubieron cambios en la frecuencia de su localización respecto de los Controles.

En la Tabla 45 se representan las Preferencias Laterales y la significatividad estadística de los datos experimentales de los sitios del río muestreados durante el *Muestreo de Primavera 2005*.

Franja	M.J.García		El Timón	
	Control	Exposición	Control	Exposición
1	9.5±4.7	3.3±6.7	17.3±5.1	17.4±6.6
2	7.9±4.5	8.9±3.7	13.5±3.6	8.7±3.5
3	9.7±5.3	17.4±10.3	19.8±12.6	17.4±10.3
4	5.4±4.1	9.8±2.9	6.3±3.8	9.8±2.8
5	67.2±16.0*	46.7±13.5*	42.9±18.9	46.7±13.4*

Tabla 45: Preferencias laterales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Primavera 2005). Frecuencia porcentual medias \pm ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las franjas de cada período. Control (N=16); Exposición (N=20).

En este muestreo se observó que los peces incubados en muestras de agua de M.J.García, mostraron una preferencia por la franja 5 aunque con una frecuencia de presencia menor que los controles. Con la muestra de El Timón se observó un patrón de distribución con una tendencia a permanecer en la franja 5 muy similar a los Controles.

En la Tabla 46 se representan las Preferencias Laterales y la significatividad estadística de los datos experimentales de las tres muestras analizadas durante el *Muestreo de Verano 2006*.

Franja	M.J.García		El Timón		Ruta 6	
	Control	Exposición	Control	Exposición	Control	Exposición
1	35.6±1.8*	22.6±0.4*	28.9±7.9	34.6±7.3*	22.2±9.3	41.9±8.5*
2	15.1±1.9	17.7±0.6	14.3±4.3	9.60±3.7	21.2±4.5	14.7±4.3
3	17.6±2.6	19.7±0.4	9.20±1.6	8.64±3.8	17.7±2.9	14.7±2.2
4	16.4±1.7	19.7±0.7	11.6±2.0	8.42±1.4	15.3±2.1	11.0±2.5
5	16.2±1.8	20.3±1.3	35.8±12.4	38.6±6.6*	24.5±5.3	17.5±3.7

Tabla 46: Preferencias laterales de *Cyprinus carpio* expuesto a muestras del río Luján (Muestreo de Verano 2006). Frecuencia porcentual medias \pm ESM. * Indica diferencias estadísticas entre las franjas de cada período. Control (N=16); Exposición (N=20).

En el período Control de los ensayos de las tres estaciones se observó una distribución aleatoria de los animales con 50-65 % de las veces en las franjas 1 y 5. En el período de exposición al agua de M.J.García se mantuvo la misma tendencia que en el Control, en agua de El Timón los animales exhiben una tendencia por

ubicarse en los extremos del acuario; en la muestra de Ruta 6 se ubicaron la mayor parte del tiempo, de forma significativa, en la franja 1.

En la tabla 47 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en las Preferencias laterales para las tres estaciones climáticas y los tres sitios muestreados en el río Luján:

	Invierno	Primavera	Verano
M.J.García	S	NS	NS
El Timón	S	S	S
Ruta 6	S	**	S

Tabla 47: Resumen de los cambios registrados en la Preferencia Lateral de *Cyprinus carpio* luego de su exposición a muestras del río Luján. S: cambio significativo; **No determinado.

3- Parámetros morfológicos (Muestreo de Invierno 2005):

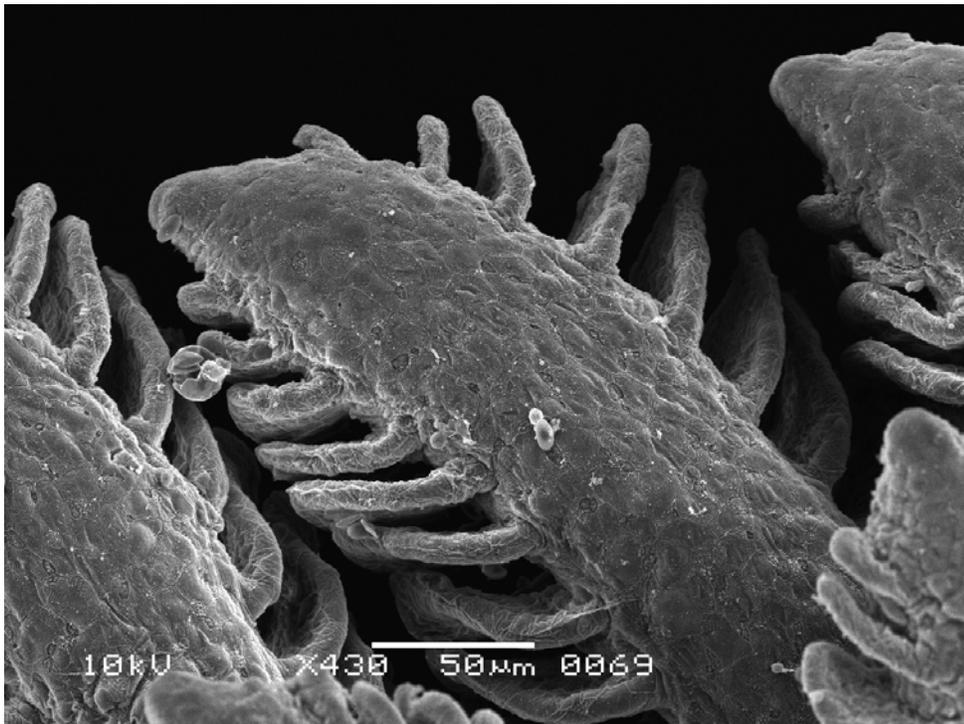
En la Figura 43 se observan los *filamentos branquiales* de los animales expuestos a agua proveniente de M.J.García. En ellos se aprecian las *lamelas secundarias* dispuestas bilateralmente en las *lamelas primarias* y éstas, a su vez, dispuestas perpendicularmente a lo largo del *arco branquial*. En B y C se observa con mayor detalle la *lamela secundaria* con sus límites celulares y sin signos de hipertrofia e hiperplasia.

En la Figura 44 se observa detalle de los *filamentos branquiales* y de las *lamelas secundarias* de los animales expuestos a agua proveniente de El Timón (Muestreo de Invierno). Los filamentos branquiales se observan bien definidos y sin fusiones. En el detalle de las *lamelas secundarias* no se observan con nitidez los límites celulares tal vez debido a una hipertrofia celular.

En la Figura 45 se observa detalle de *filamentos branquiales* y de las *lamelas secundarias* de las carpas expuestas a agua proveniente de Ruta 6. Los filamentos branquiales se observan ligeramente fusionados. En el detalle de las *lamelas secundarias* no se observan con nitidez los límites celulares tal vez debido a una hipertrofia celular.



A



B

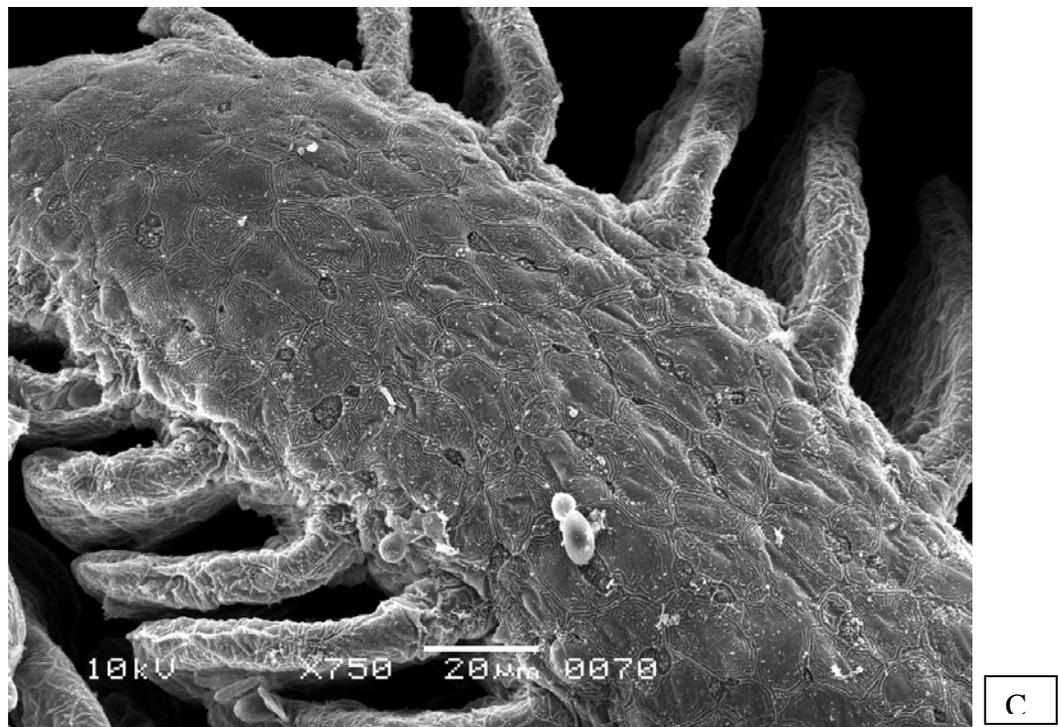
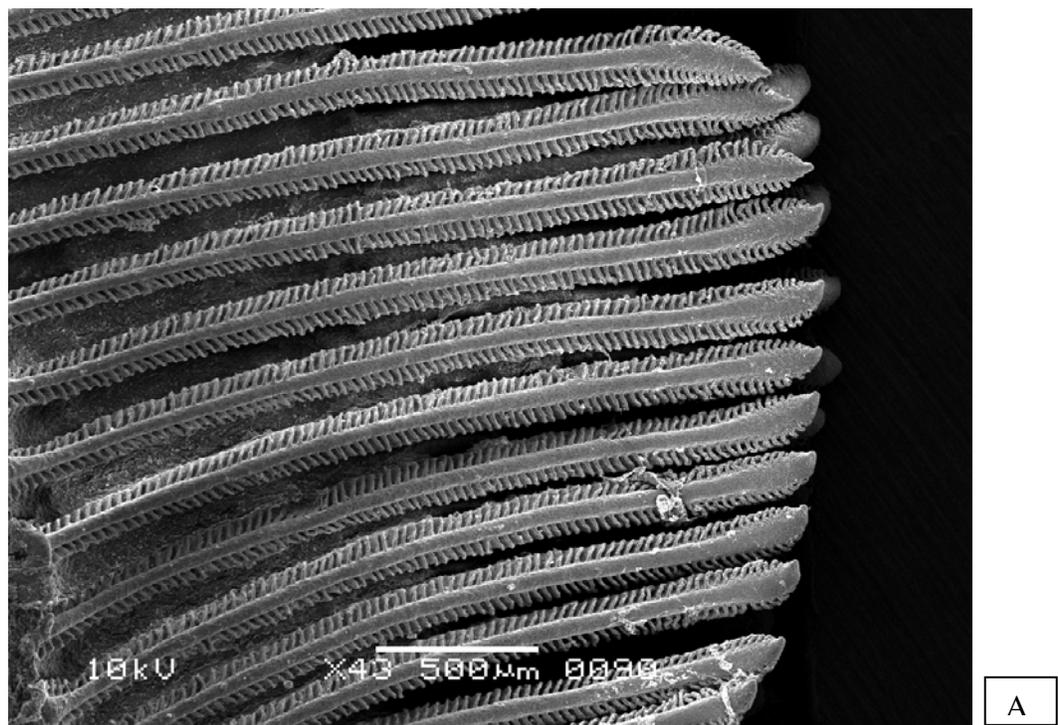
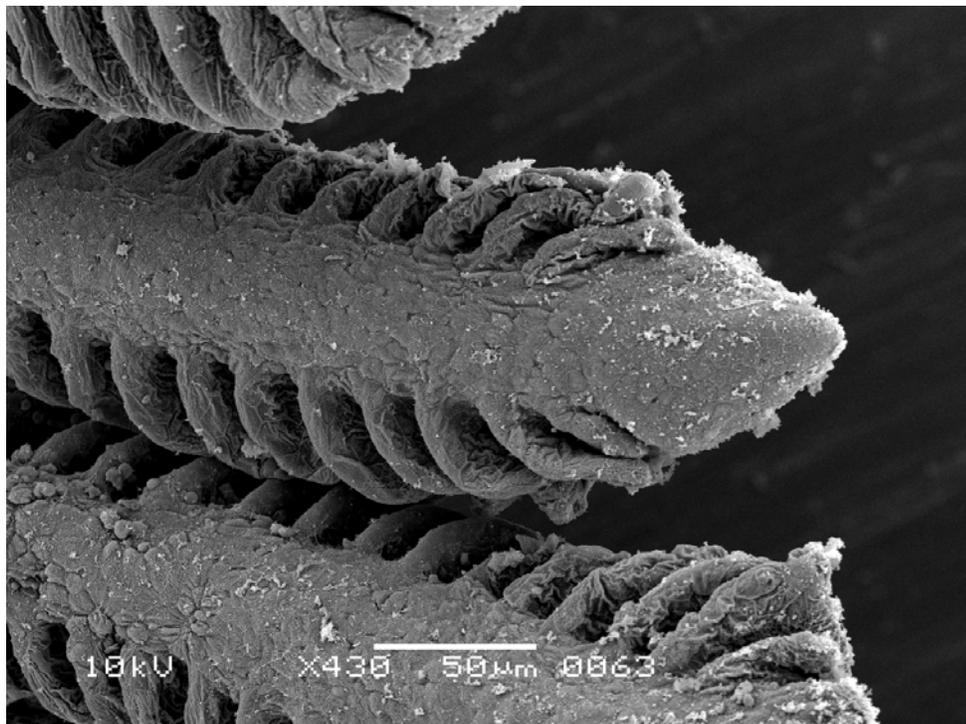
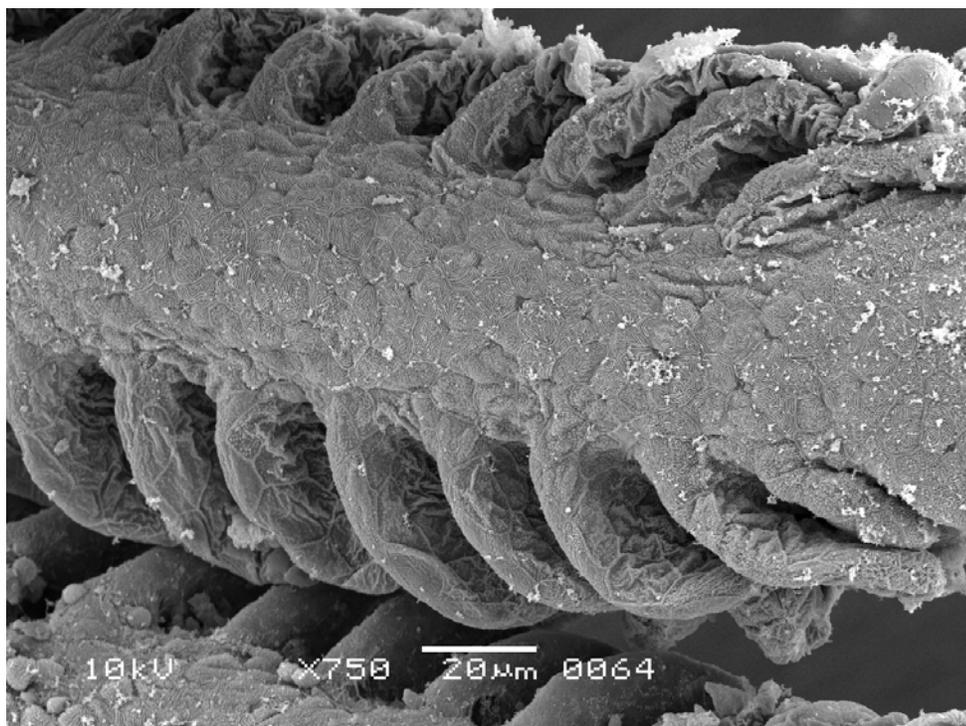


Figura 43: Imágenes al MEB de los arcos branquiales (A) y detalles de lamelas secundarias (B y C) de *Cyprinus carpio* en un individuo Expuesto a agua proveniente de M.J.García (muestreo de Invierno 2005). Aumentos: 43, 430 y 750X respectivamente; barras: 20-50-500 μ m.



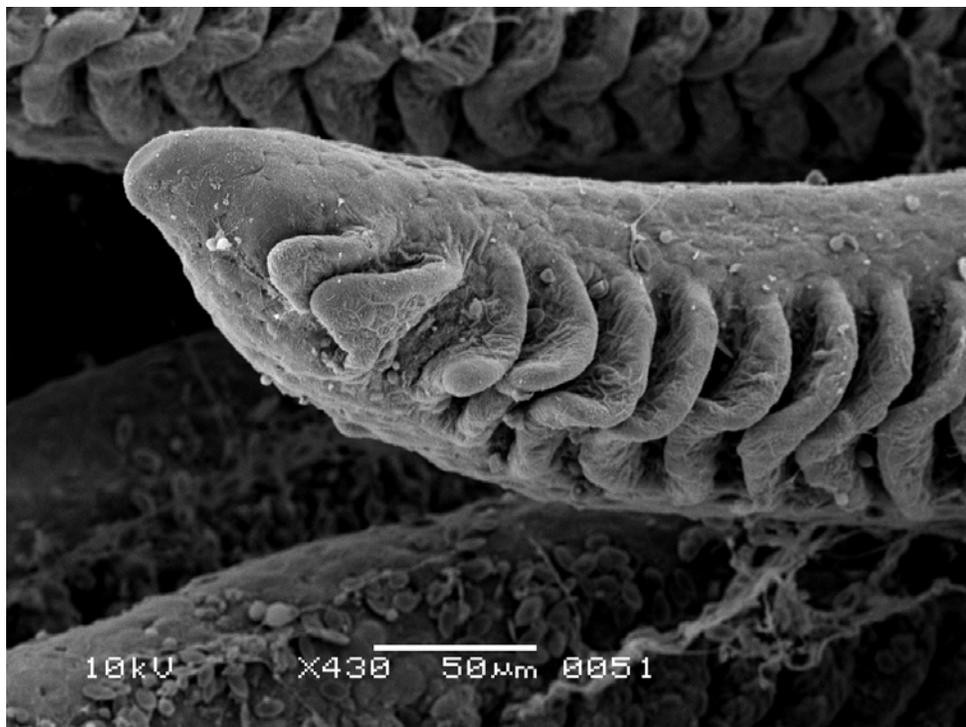
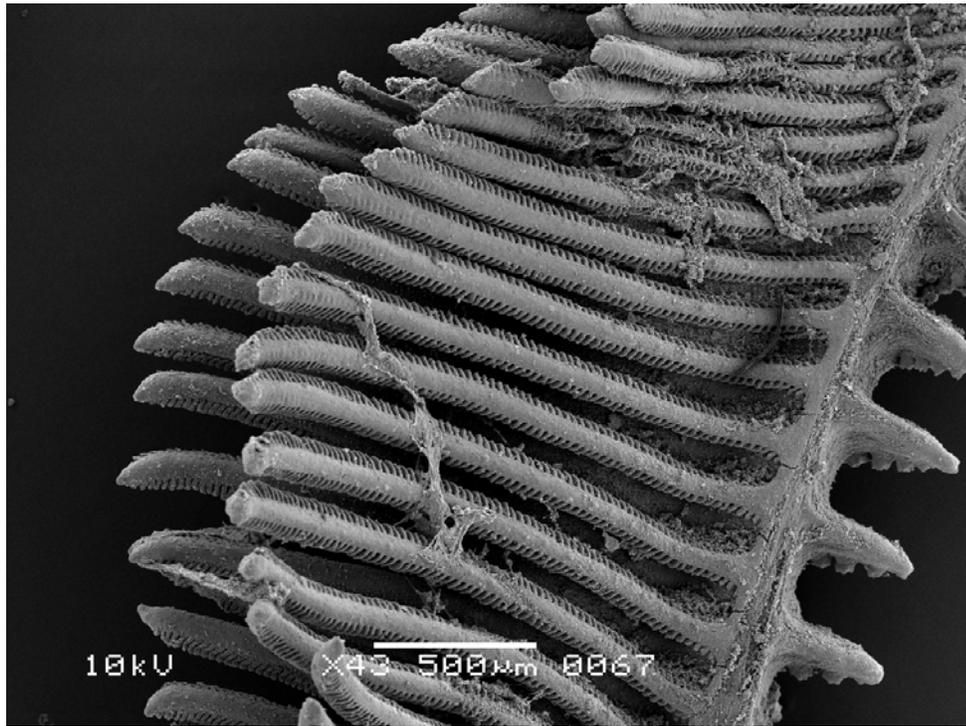


B



C

Figura 44. Imágenes al MEB de los filamentos branquiales (A) y detalles de lamelas secundarias (B y C) de *Cyprinus carpio* en un individuo Expuesto a agua proveniente de El Timón (Muestreo de Invierno 2005). Aumentos: 43, 430 y 750X respectivamente; barras: 20-50-500 μm .



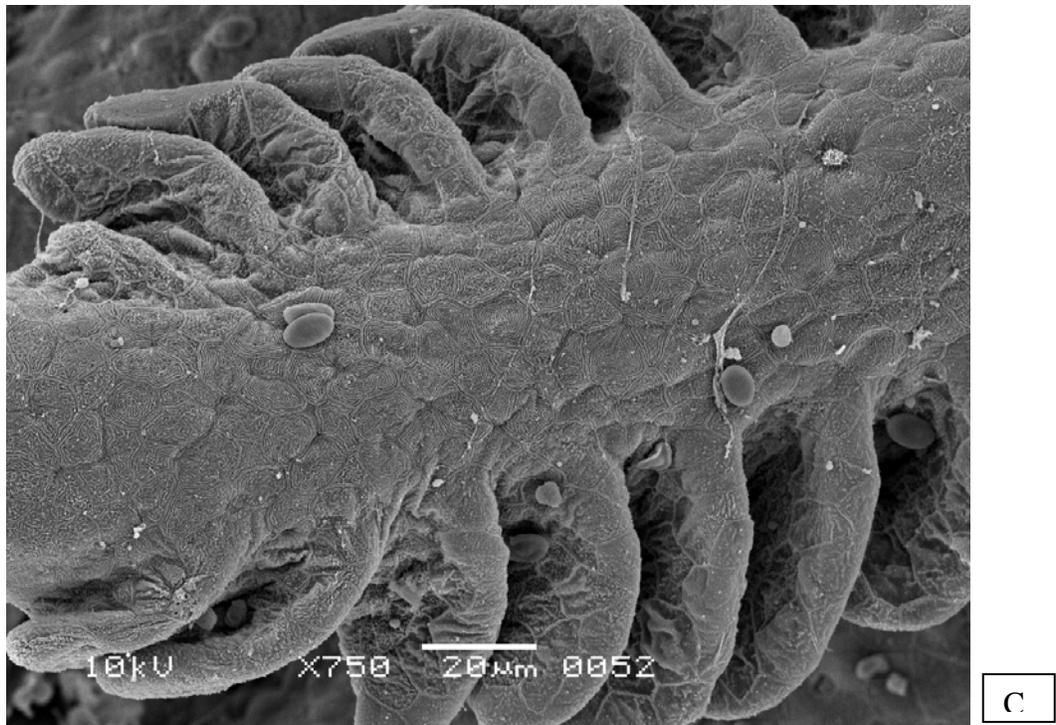


Figura 45. Imágenes al MEB de los arcos branquiales (A) y detalles de lamelas secundarias (B y C) de *Cyprinus carpio* en un individuo Expuesto a agua proveniente de Ruta 6 (muestreo de Invierno 2005). Aumentos: 43, 430 y 750X respectivamente; barras: 20-50-500 μm .

Discusión

La degradación de la calidad del ecosistema acuático resulta en alteraciones de sus propiedades físico-químicas y cambios en la comunidad biológica. Estas alteraciones tienen repercusión sobre toda la biota.

Algunas sustancias pueden ser muy tóxicas en forma aislada pero su efecto tóxico puede estar mitigado o aumentado dando origen a acciones antagónicas o sinérgicas cuando se encuentra formando parte de un efluente debido a la interacción con otros compuestos (Günes y col, 2007).

Actualmente no se han publicado muchos trabajos sobre el efecto de una mezcla natural de xenobióticos como lo es el agua proveniente de un Río contaminado sobre parámetros comportamentales. Los cambios en la actividad natatoria de organismos acuáticos está siendo utilizada en forma creciente en estudios ecotoxicológicos debido a que se trata de un parámetro integrador.

Petrauskiene (2003) estudió el efecto sobre la movilidad, la alimentación y el escape en sanguijuelas expuestas a agua proveniente de un lago (utilizada para la refrigeración de una planta nuclear), de un río de Lituania y a una mezcla de metales pesados observando un incremento en la actividad en sanguijuelas jóvenes expuestas a los tres medios.

Gerhardt y col (2002) estudiaron el efecto sobre peces y crustáceos de una serie de diluciones de agua proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales, observando cambios en la actividad natatoria y en movimientos ventilatorios de los peces.

En nuestros bioensayos conductuales con agua proveniente del Río Luján observamos para el Índice de actividad relativo (Tabla 39) una elevación significativa en las muestras procedentes de Ruta 6. Con las otras muestras se observó una alteración en el mismo sentido en la actividad sólo en una de las estaciones del año estudiadas (Primavera en el caso de M.J.García e Invierno en el caso de El Timón). Es llamativo que dichas alteraciones, en todos los casos de su registro, fueron indicativos de una depresión de la actividad de los peces.

En las Preferencias Altitudinales (Tabla 43) los resultados obtenidos muestran un efecto limitado a las muestras de agua procedente de M.J.García (se observan cambios significativos en invierno y verano).

El estudio de las Preferencias Laterales (Tabla 47) sugiere que es un parámetro comportamental más sensible a la exposición al agua del río ya que hubo cambios significativos prácticamente en todas las estaciones y para los tres sitios muestreados.

Estas alteraciones pueden correlacionarse con las concentraciones de los aniones y cationes determinados en el agua. En la Tabla 48 se detállale perfil químico más relevante desde el punto de vista ecotoxicológico. Como puede apreciarse, el factor que aparece como generalizados en todas las muestras del río, es la mezcla compleja de metales pesados y algunos aniones. Cabe señalar que las concentraciones de esos componentes no alcanzó niveles de letalidad ya que en ningún caso se registró mortalidad de los peces. No obstante, se detectaron efectos subletales puestos de manifiesto por alteraciones en los parámetros conductuales evaluados.

Muestreo	M.J.García	El Timón	Ruta 6
Invierno 2005:			
Concentración superior*	Cl – NO ₃ – Cr	Cl – NO ₃ – Pb	Cl – NO ₃ – Pb
Presencia	Cd – Cr – Pb -Hg	Cd – Cr - Hg	Cd – Cr
Primavera 2005:			
Concentración superior*	Cl – NO ₃ – Pb	Cl – NO ₃ – Pb	-----
Presencia	Hg – Cr – Cd – Cu - Zn	Hg – Cr – Cd – Cu - Zn	-----
Verano 2006:			
Concentración superior*	Cr – Cl – NO ₃	NO ₃	
Presencia	Cd – Pb – Cu - Zn	Cr – Cd – Pb – Cu - Zn	Cr – Pb – Cu

Tabla 48: Esquema del perfil químico de las muestras de agua del río Luján utilizadas en los bioensayos de toxicidad para juveniles de *Cyprinus carpio*. *En base a los límites estipulados por la Subsecretaría de Recursos Hídricos.

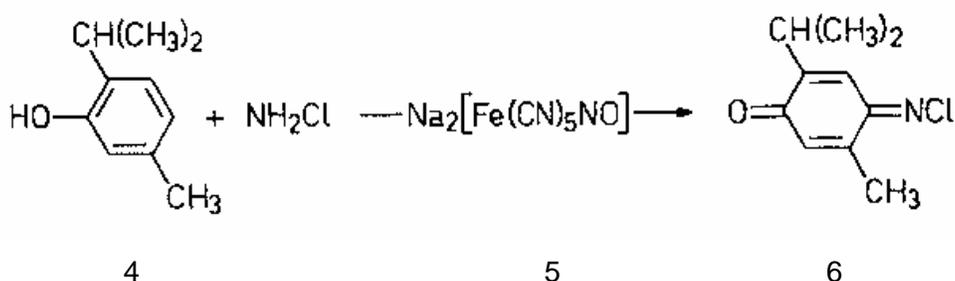
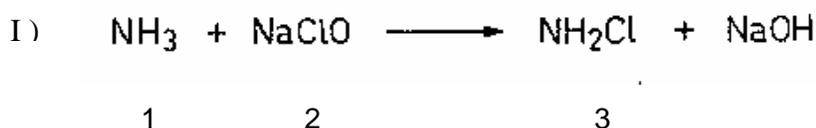
En la microscopía de branquias se observó en los animales expuestos a agua proveniente de El Timón (Figura 44) una leve hipertrofia celular caracterizada por una reducción en la visualización de los límites celulares. Esta misma patología se apreció en las branquias de animales expuestos a agua de Ruta 6 (Figura 45). En ellas también hay una ligera fusión de los filamentos branquiales.

Las imágenes de animales expuestos a agua de M.J.García son comparables con las de animales control.

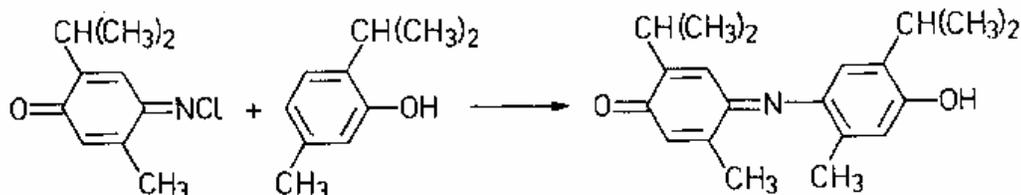
Anexo II
Métodos analíticos

a) Concentración de amonio.

Se determinó mediante el método colorimétrico de azul 2,2-isopropil-5,5-metil-indofenol o reacción de Berthelot's, utilizando el *kit* de reactivos Merck Spectroquant 1.14752. El mismo consiste en una reacción en medio alcalino ($\text{pH} \cong 13$), ajustado con NaOH. En este medio el NH_4^+ reacciona e inicia la siguiente serie de reacciones:



En la fase final de la reacción, la quinona-monoimina reacciona con otro timol:



- 1: Amoníaco
- 2: Hipoclorito de sodio
- 3: Monocloroamina
- 4: 2,2-isopropil-5,5-metil-indofenol
- 5: Pentacianonitrosilferrato (III) disódico
- 6: n-cloro-2-isopropil-5-metilquinona mono-imina

b) Oxígeno disuelto (Método iodométrico de Winkler).

Los iones manganeso (II) reaccionan en medio alcalino con el oxígeno disuelto, oxidando los hidróxidos de manganeso formados a valencias mayores (III). En medio fuertemente ácido los iones manganeso (III), oxidan el yoduro a I₂ en cantidad equivalente al oxígeno disuelto; éste último se titula con solución de tiosulfato de sodio (y el Mn vuelve a su estado divalente).

La botella de medición se llena cuidadosamente hasta rebalsar evitando la formación de burbujas. Se agregan 0.5 ml de MnSO₄ y 0.5 ml de NaOH, se agita y se deja reposar 1 minuto. Posteriormente se agrega 0.5 ml de H₂SO₄ concentrado y se agita nuevamente. Se toma un volumen de 20 ml y se trasvasa a un erlenmeyer. Se agrega una gota de almidón y se homogeneiza. La solución desarrolla una coloración violácea, proporcional al contenido de oxígeno. Se titula con Na₂S₂O₃ (0.01N) hasta que vira de azul a incoloro. La concentración de oxígeno de la muestra (en mg.L⁻¹) se determina según la siguiente fórmula:

$$O_2 = \frac{Vg * Nv * 8 * 1000}{50.00 * (Vfrasco - 2) / Vfrasco}$$

Vg= volumen gastado

Nv= normalidad de la solución tituladora

La precisión de este método se estima en ± 50 mg/L

c) Dureza.

Se entiende por dureza total del agua a la suma de las concentraciones individuales, de los iones alcalinotérreos, principalmente a la suma de los iones Ca y Mg expresadas como CaCO₃. Se determina por volumetría con solución de EDTA 0.01M. Se colocan 25 ml de la muestra se le agregan 25 ml de H₂O destilada, 2 ml del buffer y 1 gota de solución de Negro de Eriocromo T (NET), la solución se torna de color rosa-violáceo. Titular con agitación continua hasta alcanzar color azul. Las últimas gotas se agregan a intervalos de 3 a 5 segundos y se completa la valoración en no mas de 5 minutos.

Cálculo de la dureza:

$$\text{Dureza total (mg de CaCO}_3\text{/L)} = \frac{A * B * 1000}{\text{ml muestra}}$$

Donde:

A= ml usados de solución de EDTA para la muestra (lectura en la bureta)

B= mg de CaCO₃ equivalentes a 1 ml de solución de EDTA.

Buffer: Se disuelven 16,9 g de NH₄Cl analítico en 143 ml de NH₄OH (NH₃) concentrado en un matraz 250 ml. Disolver 1.179 g de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) disódico dihidratado grado analítico y 0,644 g de MgCl₂.6H₂O en 50 ml de H₂O bidestilada, esta solución se agrega a la anterior y se lleva a volumen con agua bidestilada. Verificar que el pH esté en el rango de 10,0 ± 0,1.

Indicador NET: Se disuelven 0,14 de Negro de Eriocromo T en 25 ml (28,25 g) de trietanolamina y se lleva a 30 ml.

Solución titulante de EDTA 0,01 M: Se pesan 3,723 g de EDTA disódico dihidratado y se lleva a 1 L con H₂O bidestilada.

d) Alcalinidad.

Es común expresar la concentración de carbonatos y la suma de carbonatos y bicarbonatos en términos de alcalinidad de carbonatos y alcalinidad total respectivamente. Es la capacidad de neutralizar ácidos. La valoración acidimétrica se efectúa con ácido clorhídrico (0.02N) frente a fenoftaleína (hasta pH 8.3). Continúa agregándose ácido hasta pH 4.2, momento en que todo el bicarbonato originalmente presente en la muestra y el proveniente del carbonato, pasan a dióxido de carbono más agua con el consecuente viraje del indicador naranja de metilo.

$$\text{Alcalinidad total (meq/L)} = \frac{T * N_v * 1000}{V_m}$$

T= Volumen total empleado

Nv= Normalidad valorada del ácido

Vm= Volumen de muestra

e) Amonio (para parámetros fisicoquímicos).

El amonio reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino para dar azul de indofenol, reacción catalizada por nitroprusiato. La intensidad del color resultante es proporcional a la concentración de amonio presente y es medida espectrofotométricamente a 635 nm.

Se colocaron 50 ml de la muestra y se le agregan 2 ml de fenol-nitroprusiano y 2 ml de hipoclorito alcalino. Se mezcla y se deja en un baño a 25°C durante 1 hora, preferentemente en oscuridad. En forma paralela se realiza un blanco de reactivos, utilizando 50 ml de agua destilada y una curva de patrones por diluciones convenientes de la solución patrón de NH_4^+ . Se leen las absorbancias del color resultante en un espectrofotómetro a 635 nm (Wetzel, 1995).

f) Nitratos.

Los nitratos reaccionan con un reactivo compuesto por ácido sulfanílico y dicloruro de N-1-naftil etilendiamina formando un azo compuesto de color violeta-rojizo /reacción de Griess).

Se agregó cantidad en exceso del reactivo y se lo disolvió (20-35 °C) en presencia de 5 ml H_2SO_4 96%. Se agregaron 1,5 ml de la muestra y se mezcló inmediatamente. Se repitió el mismo procedimiento para una muestra patrón de 50 mg/L N-NO_3^- . Luego de 10 minutos se leyeron las absorbancias a 515 nm contra blanco de reactivos. Los resultados se expresaron como mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$.

g) Cloruros.

A 5 ml de las muestras se les agregó 6 gotas del reactivo $(\text{NO}_3)_2\text{Ag}$ y luego se adicionaron 6 gotas del reactivo tiocianato de mercurio (II) mezclando bien. Las muestras se midieron contra blanco de reactivos a 450 nm. Las concentraciones de cloruro se expresaron como mg $\cdot \text{L}^{-1}$.

h) Metales pesados.

Sobre las muestras acidificadas a $\text{pH} \leq 2$ y conservadas en frío se determinó el contenido de metales pesados disueltos espectrofotometría de absorción atómica (Shimadzu AA 650) equipado con horno de grafito acoplado.

Fijación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Las branquias se fijan en glutaraldehído 2,5% durante 2 horas y se lavaron en Buffer fosfato al 0,1% y se procede a la deshidratación de los tejidos por pasaje en las siguientes series de deshidratación:

- 1) Alcohol 70° = 24 hs.
- 2) Alcohol 90° = 2 hs.
- 3) Alcohol 96° = 2 hs.
- 4) Alcohol 100° -acetona (3:1) = 3 hs.
- 5) Alcohol 100° -acetona (1:1) = 2 hs.
- 6) Alcohol 100° -acetona (1:3) = 2 hs.
- 7) Acetona pura = 3 hs.

Luego de la deshidratación los tejidos se desecaron con la técnica del Punto Crítico y se revistieron con oro-paladio. Se montaron en tacos de bronce hasta su observación.

Anexo III
Registros múltiples de los síndromes de toxicidad
Material Fílmico

Referencias Bibliográficas

- Adams SM (1990) Status and use of biological indicators for evaluating effects of stress on fish. Amer Fish Soc 8: 1-8
- AGOSBA; ILPLA y SHN. 1997. *Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena)*. Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata. Anexos I y II. Secretaría de Obras Públicas, Dirección Nacional de Gestión de los Recursos Hídricos, Buenos Aires. Argentina.
- AGOSBA, OSN y SIHN. 1992/94. *Río de la Plata-Calidad de las aguas-Franja costera sur (San Isidro-Magdalena)*. Informe de Avance. Argentina.
- Alcaraz G, Espina S (1997) The scope for growth of juvenile Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* exposed to nitrite. Comp Biochem Physiol 116: 85-88
- Allin CJ, Wilson RW (1999) Behavioural and metabolic effects of chronic exposure to sublethal cadmium in acidic soft water in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J Fish Aquat Sci 56: 670-673
- Almeida JA, Novelli ELB, Dal Pai Silva M, Alves Junior R (2001) Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environ Pollut 114: 169-175
- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo Cadmium contamination. Environ Internat 27: 673-679
- Almirón AE, Gómez SE, Toresani NI (1992) Situación ambiental de la Pcia. de Buenos Aires, A. Recursos y rasgos naturales en la evaluación ambiental Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires (CIC), Año II, N 12:1-29
- Alves LC, Glover CN, Wood CM (2006) Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (2006). Arch Environ Contam Toxicol 51: 615-625
- Alsina MG, Herrero AC (2000) Relevamiento de industrias en la Cuenca del río Reconquista y georreferenciación de las de tercera categoría según nivel de complejidad ambiental (Ley 11.459). Relación entre actividad industrial y grado de contaminación de la cuenca. Actas Simposio Latinoamericano de Percepción Remota 867-878
- APHA - American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed., Washington DC
- Anitha Kumari S, Sree Ram Kumar N (1997) Histopathological alterations induced by aquatic pollutants in *Channa punctatus* from Hussainsagar lake (AP). J Environ Biol 18: 11-16
- Arriberé MA, Ribeiro Guevara S, Sánchez RS, Gil MI, Román Ross G, Daurade LE, Fajon V, Horvat, M, Alcalde R, Kestelman AJ (2003) Heavy metals in the vicinity of a chlor-alkali factory in the upper Negro River ecosystem, Northern Patagonia, Argentina. Sci Total Environ 301: 187-203

- Baker CF, Montgomery JC (2001) Sensory deficits induced by cadmium in banded kokopu, *Galaxias fasciatus*, juveniles. *Environmental Biology of Fishes* 62: 455-464
- Baran EJ (1995) *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill. España
- Battaglini P, Andreozzi R, Antonucci R, Arcamone N, De Girolamo P, Ferrara L, Gargiulo G (1993) The effects of Cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus* L.: metal uptake and histochemical changes. *Comp Biochem Physiol* 104C: 239-247
- Beitinger TL (1990) Behavioral reactions for the assessment of stress in fish. *J. Great Lakes Res* 16: 495-528
- Bentley PJ (1991) Accumulation of Cadmium by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influx from environmental solutions. *Comp Biochem Physiol* 99C: 527-529
- Bettini S, Ciani F, Franceschini V (2006) Recovery of the olfactory receptor neurons in the African *Tilapia mariae* following exposure to low copper level. *Aquat Toxicol* 76 (3-4): 321-328
- Beyers DW, Rice JA, Clements WH, Henry CJ (1999) Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 814-822
- Bhattacharya P, Caesson M, Bundschuh J, Sracek O, Fagerberg J, Jacks G, Martin RA, Storniolo AR, Thir JM (2006) Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. *Sci Total Environ*
- Birge WJ, Hoyt RD, Black JA, Kercher MD, Robison WA (1993) Effects of chemical stresses on behavior of larval and juveniles fishes and amphibians. *Am Fish Soc Symp* 14: 55-65
- Blier PU, Pelletier D, Dutil JD (1997) Does aerobic capacity set a limit on fish growth rate? *Rev Fish Sci* 5: 323-340
- Bouraoui Z, Banni M, Ghedira J, Clerandeanu C, Guerbej H, Narbonne JF, Boussetta H (2008) Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol Biochem* 34: 201-207
- Borthagaray JM, Prini RF, Igarzábal de Nistal MA, San Román E, Tudino M (2001) Diagnóstico ambiental del area metropolitana de Buenos Aires. Sistema de Información Ambiental. Ediciones de la Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo, UBA. Argentina
- Bulus Rossini GD, Ronco AE (2004) Sensibilidad de *Cichlasoma fascetum* (Ciclidae, Piisces) a metales pesados. En: *Toxicología y Química Ambiental. Contribuciones para un desarrollo Sustentable* (Herkovits J.Ed), 8-10
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN (2003) Micronuclei induction in *Rana catesbiana* tadpoles by pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Gen Molec Biol* 26: 99-103
- Cappannini DA, Dominguez O (1961) Los principales ambientes geodafológicos de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires. INTA. Revista IDIA N°163

- Castañé PM, Topalián ML, Cordero RR, Salibián A (2003) Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev Toxicol* 20:13-18
- Cazenave J, Nores ML, Miceli M, Díaz MP, Wunderlin DA, Bistoni MA (2008) Changes in the swimming activity and glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Wat Res* 42: 1299-1307
- Cerqueira CC, Fernandes M (2002) Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and a Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol Environ Safe* 52:83-91
- Chakraborty SC, Ross LG, Ross B (1992) The effect of photoperiod on the resting metabolism of carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol* 101A: 77-82
- Cherian MG (1995) Metallothionein and its interactions with metals. En: Goyer RA y Cherian MG (Eds) *Toxicology of metals. Biochemical aspects*. Springer-Verlag, Berlin
- Colombo JC, Bilos C, Rodriguez Presa MJ, Schroeder F (1994) Contaminación química en el Río de la Plata: evaluación del impacto de efluentes urbano-industriales mediante monitoreo electrónico, químico y biológico. *Ger Amb* 6: 420-451
- Colombo JC, Barreda A, Bilos C, Capelletti N, Demichelis S, Lombardi P, Migoya MC, Skorupka C, Suárez G (2005) Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soil and biota. *Environ Pollut* 134: 277-289
- Comisión Administradora del Río de la Plata (CARP) (1989) *Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata – Informe de Avance* (1989).
- Costa JL, Massone H, Martínez D, Suero EE, Vidal CM, Bedmar F (2002) Nitrate contamination of a rural aquifer and accumulation in the insaturated zone. *Agric water Manag* 57: 33-47
- Couture P, Rajotte JW (2003) Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. *J Environ Monit* 5: 216-221
- Damásio JB, Barata C, Munné A, Ginebreda A, Guasch H, Sabater S, Caixach J, Porte C (2006) Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66: 1206-1216
- Davies PH, Gorman WC, Carlson CA, Brinkman SF (1993) Effect of hardness on bioavailability and toxicity of Cadmium to rainbow trout. *Chem Spec Bioav* 5:67-77
- De Boeck G, De Smet H, Blust R (1995) The effect of sublethal levels of Copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat Toxicol* 32: 127-141
- De Boeck G, van der Ven K, Hattink J, Blust R (2006) Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal Copper exposure. *Aquat Toxicol* 80: 92-100

- de Conto Cinier C, Petit-Ramel M, Faure R, Garin D, Bouvet Y (1999) Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp Biochem Physiol C122*: 345-352
- De Filippis LF, Pallaghy CK (1994) Heavy metals: sources and biological effects. En: Rai LC, Gaur JP, Soeder CJ (Eds). *Advances in Limnology Series : Algae and water pollution, Cap 2*, pp 31-77
- de Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canadá). *Aquat Toxicol* 50: 51-71
- de la Torre F, Ferrari L, Salibián (2000) A. Long-term in situ water toxicity bioassays in the Reconquista river (Argentina) with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water Air Soil Pollut* 121: 205-215
- de la Torre FR, Ferrari L, Salibián A (2001) Freshwater pollution biomarker: comparative responses of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp Biochem Physiol*
- Dell’Omo G (2002) *Behavioural ecotoxicology* – Wiley and Sons Pub. New York
- Depledge MH (1994) The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. En MC Fossi y C Leonzio (eds). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Ratón
- Diaz Báez MC, Sobrero MC, Pica Granados Y (2004) Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. En: Gabriela Castillo (ed) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. IDRC-IMTA, México
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Santore RC Paquin P (2000) The biotic ligand model. A computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. *International Copper Association Ltd*. New York
- Domitrovic HA (1997) Toxicidad y respuesta histopatológica en *Aequidens portalegrensis* (PISCES, Cichlidae) expuestos a sulfato de cobre en ensayos de toxicidad aguda y en ensayos subletales. *Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad nacional del Nordeste, Tomo II*: 25-28
- Doving KB (1991) Assessment of animal behavior as method to indicate environmental toxicity. *Comp Biochem Physiol* 100C, No: 247-252
- Drummond RA, Russom CL, Geiger DL, DeFoe DL (1986) Behavioral and morphological changes in *Fathead minnows* (*Pimephales promelas*) as diagnostic endpoints for screening chemicals according to mode of action. *Aquat Toxicol* 9: 415-435
- Drummond RA, Russom CI (1990) Behavioral toxicity syndromes: a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 9: 37-46
- Duffus JM (1983) *Toxicología ambiental*. Ed. Omega, Barcelona

- Eisler R (1985) Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review, Washington DC, US. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service (Biological Report, No 85)
- Eissa BL, Salibián A, Muscatello JR (2000) Etotoxicología acuática experimental: efectos del cadmio sobre la actividad natatoria de *Cyprinus carpio*. Rev Brasil Toxicol 13 (Suplemento): 56
- Elliot JM, Davidson W (1975) Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. Oecología 19: 195-201
- Erickson RJ, Nichols JW, Cook PM, Ankley GT (2008) Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems. En: Di Giulio RT, Hinton DE. The toxicology of fishes. CRC Press, Boca Ratón, FL. Pp: 9-54
- Erkmen B, Kolonkaya D (2000) Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. Bull Environ Contam Toxicol 64: 418-425
- Espina S., Díaz F., Rosas C. y Rosas 1. (1986). Influencia del detergente en el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico. Cienc. Ambient. 2, 25-37.
- Espina S, Salibián A, Díaz F (2000) Influence of Cadmium on the Respiratory Function of the Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*. Water Air Soil Pollut 119: 1-4
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol Revs 85: 97-177
- Fangué NA, Mandić M, Richards JG, Schulte PM (2008) Swimming performance and energetics as a function of temperature in killifish *Fundulus heteroclitus*. Physiol Biochem Zool 81: 389-401
- Faucher K, Fichet D, Miramand P, Lagardere JP (2006) Impact of acute cadmium exposure on the trunk lateral line neuromast and consequences on the "C-Start" response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). Aquat Toxicol 76: 278-294
- Fernandez MN, Perna-Martins SA (2000) Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus CF. plecostomus* (Loricariidae). Rev Brasil Biol 61: 69-78
- Fernandes D, Bebianno MJ, Porte C (2008) Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. Sci Total Environ 391: 159-167
- Ferrari L, Salibián A (1999). Effect of cadmium on the epidermic structure of *Bufo arenarum* tadpoles: influence of the chemical composition of the incubation media. Arch Physiol Biochem 107: 91-96
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. Sci Total Environ 317:207-233
- Flik G, Van de Winkel JGJ, Part P, Wendelaar Bonga SE, Lock RAC (1987) Calmodulin mediated Cadmium inhibition of phosphodiesterase activity. Arch Toxicol 59: 352-359
- Foulkes EC (1986) Cadmium. Springer-Verlag

- Foulkes EC (2000) Transport of toxic heavy metals across cell membranes. Proc Soc Exp Bio Med 223: 234-240
- Gargiulo G, de Girolamo P, Ferrara L, Soppelsa G, Andreozzi G, Antonucci R, Battaglini P (1992) Action of cadmium on the gills of *Carassius auratus L.* in the presence of catabolic NH₄. Arch Environ Contam Toxicol 30: 235-240
- George SG, Hodgson PA, Tytler P, Todd K (1996) Inductibility of metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in larvae of a marine teleost, the turbot (*Scophthalmus maximus*). Fundam Appl Toxicol 33: 91-99
- Gerhardt A, Janssens de Bisthoven L, Mo Z, Wang C, Yang M, Wang Z (2002) short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. Chem 47: 35-47
- Gilmour KM, Wilson RW, Sloman KA (2005) The integration of behaviour into comparative physiology. Physiological and Biochemical Zoology 78: 669-678
- Giorgi A (2000) Costo de la contaminación del Río Luján. UNLu Ciencia 2: 42-47
- Goering PL, Waalkes MP, Klaassen CD (1995) Toxicology of cadmium. In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 115. Toxicology of Metals – Biochemical Aspects (R. A. Goyer and M. G. Cherian, Eds.), pp. 189–214. Springer-Verlag, Berlin.
- Gómez SE, Ferriz RA (2002) Capacidad de natación en *Poecilia reticulata* (Pises: Cyprinodontiformes) Rev Mus Argentino Cienc Nat 4: 181-185
- Gómez S, González Naya J, Giusto A (2003) Velocidad de natación de un especialista en maniobra, *Cichlasoma facetum* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae) en condiciones experimentales. Rev Mus Arg Cienc Nat 5: 87-92
- Gómez SE, González Naya J (2005) Nuevos datos experimentales sobre la velocidad de natación de *Cichlasoma facetum* (Pises, Cichlidae). Rev Asoc Colomb Ictiol 8: 19-23
- González Naya MJ, Gómez SE, Ramírez L (2005b) Capacidad de natación en *Gymnogeophagus maridionalis* (Pisces, Cichlidae). Biol Acuát N°22: 163-167
- González Naya MJ, Gómez SE, Ramírez L (2005a) Notas experimentales sobre *Gambusia cf affinis* (Osteichthyes: Poeciliidae) en Argentina. Biol Acuát N°22: 157-162
- Grue CE, Gardner SC, Gubert PL (2002) On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife. En: Behavioural ecotoxicology. Dell’Omo G (Eds) – Wiley and Sons Pub. New York
- Guichón ML, Angelini ME, Benítez A, Serafini MC, Cassini MH (1999) Caracterización ambiental de la cuenca del Río Luján aplicando sistemas de teledetección. Rev Teledet (España) 11: 5-12
- Gray MA, Teather KL, Metcalfe CD (1999) Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. Environ Toxicol Chem 18: 2587-2594.
- Grillitsch B, Vogl C, Wyttek R (1999) Qualification of spontaneous indirected locomotor behaviour of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of

- measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environ Toxicol Chem* 18: 2743-2750
- Hall Jr LW, Anderson RD (1995) The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Critical Reviews in Toxicology* 25: 281-346
 - Hahn ME, Hestermann EV (2008) Receptor-mediated mechanisms of toxicity. En: Di Giulio RT, Hinton DE. *The toxicology of fishes*. CRC Press, Boca Ratón, FL. Pp: 235-272
 - Hara TJ (2000) Chemoreception. En: *The laboratory fish*. Gary K. Ostrander (Eds) Academic Press Pp 471-479
 - Haslam SM (1990) What is pollution. En: *River Pollution: An ecological perspective*, Belhaven Press, London
 - Henry MG, Atchinson GJ (1991) Metal effects on fish behavior. Advances in determining the ecological significance of responses. In: Newman MC, McIntosh AW (Eds), *Metal Ecotoxicology. Concepts and applications*. Lewis Publishers. Michigan. Pp 131-143
 - Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2004) *Fisiología Animal*. Ed. Médica Panamericana. Madrid
 - Hirt LM, Domitrovic HA (2002) Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pises, Cichlidae) expuestos a cloruro de cadmio en ensayos agudos y subletales. *Rev Ictiol* 10: 17-32
 - Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebø S, Solhaug A, Tekpli X, Landvik NE, Huc L, Fardel O, Lagadic-Gossmann D (2007) Different mechanism involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa 1c1c7 cells. *Chemico Biological Interactions* 167: 41-55
 - Hollis L, Mc Geer JC, Gordon Mc Donald D, Wood CM (2000) Effects of long term sublethal Cd exposure in rainbow trout during soft water exposure: implications for biotic ligand modeling. *Aquat Toxicol* 51: 93-105
 - Hugget RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL (1992) *Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publ., Chelsea, USA
 - Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991) Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 305-312
 - Jobling M (1995) *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London
 - Kardong KV (1998) *Vertebrates: Comparative Anatomy, function, evolution*. McGraw-Hill. United States
 - Kasuba, V.; Rozgaj, J. (2000). Biological effects of cadmium. *Period. Biolog.* 102: 365-371
 - Kavitha P, Venkateswara Rao J (2006) Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pest Biochem Physiol* 87: 182-188

- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439-1452
- Kolok AS, Plaisance EP, Abdelghani A (1998) Individual variation in the swimming performance of fishes: an overlooked source of variation in toxicity studies. *Environ Toxicol Chem* 17 : 282-285
- Kolok AS (1999) Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates : a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and brief review of the recent fish literature. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 700-710
- Köck G, Hofer R (1998) Origin of Cadmium and Lead in clear softwater lakes of high-altitude and high-latitude, and their bioavailability and toxicity to fish. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B (Eds), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag, Basel. Pp 225-257
- Kruse E, Laurencena P, Varela L, Rojo A (2003) Agua subterránea en el Area metropolitana de Buenos Aires. En: Griselda Alsina (organizadora) *Las aguas bajan turbias en la región metropolitana del Gran Buenos Aires*. Universidad Nacional de General Sarmiento 29-41
- Kraal MH, Kraak MH, De Groot CJ, Davids C (1995) Uptake and tissue distribution and aqueous Cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 31: 179-183
- Kuczynski D (1994) Estudio ambiental de un curso de agua urbano altamente deteriorado por acción antropogénica (arroyo Morón, provincia de Buenos Aires, Argentina) *Revista de Ecología Médica y Salud Ambiental* 1: 1-14
- Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canadá). *Aquat Toxicol* 50:51-71
- Lagadic L, Caquet JC, Amiard, F, Ramade (eds) (1997) *Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson, Paris
- Larsson A, Bengtsson BE, Haux C (1981) Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal level of cadmium. *Aquatic Toxicology*. 1: 19-35
- Lin CM, Wei LY, Wang TC (2007) The delayed genotoxic effect of N-nitroso N-propoxur insecticide in mammalian cells. *Food Chem Toxicol*. 45 : 928-934.
- López HL, Miquelarena AM, Menni RC (2003 a) Lista comentada de los peces continentales de la Argentina. *ProBiota – Serie Técnica y Didáctica* N° 5.
- López HL, Menni RC, Baltistoni PA, Cuello MV (2003 b) Bibliografía de los peces de agua dulce de la Argentina. Suplemento 1996-2002. *ProBiota – Serie Técnica y Didáctica* N°7.
- López HL, Menni RC, Cuello MV, Ponte Gómez J (2005) Bibliografía de los peces de agua dulce de la Argentina. Suplemento 2003-2004. *ProBiota – Serie Técnica y Didáctica* N°7
- Maina JN (1998) *The gas exchangers. Structure, function and evolution of the respiratory processes*. Springer

- Marbán L, de López Camelo LG, Ratto S, Agostini A (1999) Contaminación con metales pesados en un suelo de la cuenca del río Reconquista. *Ecología Austral* 9 : 15-19
- Margalef R (1975) External factors and ecosystem stability. *Scweiz Z Hydrol* 37:102-117
- Margalef (1977) *Ecología*. Ediciones Omega
- Margalef (1991) *Teoría de los sistemas ecológicos*. Publicacions de la Universitat de Barcelona. Barcelona
- Market B (1998) Distribution and biogeochemistry of inorganic chemicals in the environment. En: Schüürmann G and Market B. *Ecotoxic*. John Wiley & Sons. Nueva York 165-222
- Matz CJ, Treble RG, Krone PH (2007) Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. *Ecotoxicol Environ Safety* 66: 44-48
- Mazón AF, Cerqueira CCC, Fernández MIJ (2002) Gill cellular changes induced by copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ Res* 88: 52-63
- Miller JT Jr (1994) *Ecología y Medio Ambiente*. Grupo Editorial Panamericana. México.
- Momo F, Ventura A, Maccor T (2003) Estado ecológico de la cuenca del Río Luján. En: *Las aguas bajan turbias en la Región Metropolitana del Gran Buenos Aires*. Griselda Alsina (Ed). Universidad Nacional de General Sarmiento.
- Montgomery DC, Peck EA (1982) *Introduction to Linear Regresión Análisis*. John Wiley & Sons, New York. Pp 181-215
- Moza U, De Silva SS, Mitchell BM (1995) Effect of sub-lethal concentrations of cadmium on food intake, growth and digestibility in the goldfish, *Carassius auratus*. *L. J Environ Biol* 16:253-64.
- Muramoto S (1981) Vertebral column damage and decrease of calcium concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environ Pollut* 24 : 125-133
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publ., New York, 1117pp
- Nelson JA, Gotwalt PS, Reidy SP, Webber DM (2002) Beyond Ucrit: matching swimming performance test to the physiological ecology of the animal, including a new fish "drag strip". *Comp Biochem Physiol* 133A: 289-302
- Neuman ISA, van Rossum C, Bretschneider F, Teunis PFM, Peters RC (1991) Biomonitoring: Cadmium deteriorates electro-orientation performance in catfish. *Comp Biochem Physiol* 100C: 259-262
- Newman MC, Clements WH (2008) *Ecotoxicology. A comprehensive treatment*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139

- Ollson PE, Larsson A, Haux C (1996) Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inductibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Mar Environ Res* 42: 41-44
- Ossana N (2005) Cambios en la actividad natatoria de peces como biomonitores de contaminación acuática. Tesis de Licenciatura. Hemeroteca FCEN-UBA.
- Palaniappan PLRM, Sabhanaya Kam S, Krishnakumar N, Vadivelu M (2008) Morphological changes due to lead exposure and influence of DMSA on the gill tissues of freshwater fish *Catla catla*. *Food Chem Toxicol* 46: 2440-2444
- Peláez del Hierro F, Veà Baró J (1997) Etología. Ediciones Pirámide. Madrid
- Pesce, S. F., Wunderlin, D. A (2000) Use of Water Quality Indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River. *Wat Res* 34: 2915 - 2926.
- Petrauskiene L (2003) Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environ Internat* 28: 729-736
- Pistole DH, Peles JD, Taylor K (2008) Influence of metal concentrations, percent salinity and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol* 148: 48-52
- Plant I (2001) Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp Biochem Physiol* 131A: 41-50
- Porta A (1996) Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 30:67-79
- Rand, M.G. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington DC.
- Rand, M.G.; Wells, P.G. y McCarty (1995). Introduction to aquatic toxicology. En: Rand, M.G. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington DC., 3-67
- Randall D, Burggren W, French K (2002) Eckert. *Animal Physiology. Mechanism and Adaptations*. WH Freeman and Company. New York
- Reynders H, Van Campenhout K, Bervoets L, De Coen WM, Blust R (2006) Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). *Environ Toxicol Chem* 25: 1558-1567
- Repetto M (1995) *Toxicología Avanzada*. Ediciones Diaz de Santos. Madrid
- Resgalla C, Brasil ES, Laitano KS, Reis Filho RW (2007) Physioecology of the mussel *Perna perna* (Mytilidae) in Southern Brazil. *Aquacult* 270: 464-474
- Rican O, Kullander S (2006) Character- and tree-based delimitation of species in the 'Cichlasoma' facetum group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *J Zool System Evolut Res* 44: 136-152
- Rice PJ, Drewes CD, Klubertanz TM, Bradbury SP, Coats JR (1996) Acute toxicity and behavioral effects of chlorpyrifos, permethrin, phenol, strychnine and 2,4-dinitrophenol to 30 day-old Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 16:696-704
- Ricklefs RE (1998) *Invitación a la Ecología. La economía de la naturaleza*. Ed. Médica Panamericana

- Ringuelet RA, Aramburu RH, Alonso de Aramburu A (1967) Los Peces de Agua Dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires
- Roesijadi G (1996) Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp Biochem Physiol.* 113C pp 117-123
- Sala, J.M. (1972). Contribución al estudio geohidrológico del N.E. de la provincia de Buenos Aires.-Consejo Federal de Inversiones - E.A.S.N.E. Cap VIII, 73-80.
- Saglio P, Bretaud S, Rivot E, Olsen KH (2003) Chemobehavioral changes induced by short –term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Arch. Environ Contam Toxicol* 45:515-524
- Santos HA, Pompeu PS, Vicentini GS, Martinez CB (2008) Swimming performance of the freshwater neotropical fish: *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803. *Brz J Biol* 68: 433-439
- Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, Canistro D, Brócoli M, Pozetti L, Affatato A, Valgimigli L, Cantelli Forti G, Pedulli GF, Biagi GL, Abdel-Rahman S, Paolini M (2006) Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed *in situ* to potable surface water. *Gen Toxicol Environ Mutag* 626:143-154
- Schelenk D, Handy R, Steinert S, Depledge MH, Benson W (2008) Biomarkers. En: Di Giulio RT, Hinton DE. *The toxicology of fishes.* CRC Press, Boca Ratón, FL. Pp: 683-731
- Schmidt K, Staaks GBO, Pflugmacher S, Steinberg CEW (2005) Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicol* 71: 49-59
- Scott GS, Sloman KA (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 38: 369-392
- Selye H (1956) *The Stress of Life.* McGraw-Hill Book Company, New York
- Shah SL (2002) Behavioral abnormalities of *Cyprinion watsoni* on exposure to copper and zinc. *Turk J Zool* 26: 137-140
- Shirer H, Cairns J, Waller W (1968) A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. *Water Res Bull* 4:27-43
- Siegel S, Castellan NJ (1998) *Estadística no paramétrica. Aplicada a Ciencias de la Conducta.* Editorial Trillas. Mexico
- Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Word CM, Mc Donald DG (2003) Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol* 65: 171-185
- Sloman KA, Wilson RW (2006) Anthropogenic impacts upon behaviour and physiology. En: Sloman KA, Wilson RW, Balshine S (Eds), *Behaviour and Physiology of Fish.* Academic Press. Pp 413-468
- Sloman KA (2007) Effects of trace metals on salmonid fish: the role of social hierarchies. *Appl Anim Behav Sci* 104: 326-345

- Smith EH, Bailey HC (1989) The application of avoidance/preference testing in aquatic toxicology. In: Cowgill UM, Williams LR (Eds), *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, Vol 12, ASTM, Philadelphia. Pp 34-45
- Smith CM, Wang X, Hu Howard, Kelsey KT (1995) A polymorphism in the δ -Aminolevulinic Acid Dehydratasa gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environmental Health Perspectives* 103: 248-253
- Smith R, Smith T (2001) *Ecology*. Addison Wesley.
- Smolders R, Bervotes L, De Boeck (2002) Integrated condition indices as measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 21:87-93
- Sprague JB (1987) Effects of Cadmium on freshwater fish. In: Nriagu JO, Sprague JB (Eds), *Cadmium in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons, New York Pp 139-169
- Stephenson M, Mackie GL (1989) A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium and carbonate concentrations on cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). *Aquat Toxicol* 15: 53-62
- Stouthart AJHX, Spanings FAT, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE (1995) Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, Volume 32, Issue 1, May 1995, Pages 31-42
- Strand A, Magnhagen C, Alanara A (2007) Effects of repeated disturbances on feed intake, growth rates and energy expenditures of juvenile perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 265: 163-168
- Svecevicus G (1999) Fish avoidance response to heavy metals and their mixtures. *Acta Zoológica Lituánica. Hydrobiología* 9:103- 113
- Tansley A (1935) The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology* 54: 720-727
- Tate-Boldt EK, Kolok AS (2008) Copper acclimation in juvenile fathead minnows: is a cycle of branchial damage and repair necessary. *Aquat Toxicol* 87: 13-18
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Pollut* 121: 307-320
- Thornthwaite, C. W. 1948. An approach toward a rational classification of climate. Reprinted from *The Geographical Review*, 38 (1): 55-94
- Topalián ML, Loez CR, Salibián A (1989) Metales pesados en el río de la Reconquista (Bs As). *Resúmenes XIV Reunión Argentina de Ecología*: 186.
- Topalián ML, Rovedatti MG, Castañé PM, Salibián A (1999) Pollution in a lowland river system. a case study: the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina). *Water, Air Soil Pollut* 114: 287-302.
- Tortorelli MC, Hernández DA, Rey Vazquez G, Salibián A (1990) Effects of Paraquat on mortality and cardiorespiratory function of catfish fry *Plecostomus commersoni*. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 523-529
- Trenti PS, Gómez SE, Ferriz RA (1999) Capacidad de natación en tres peces pampásicos. *APRONA* 13: 2-9

- Ueng, Y.F., Liu, C., Lai, C.F., Meng, L.M., Hung, Y.Y. and Ueng, T.H. (1996) Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in tilapia. *B. Environ. Contam. Tox.* 57: 125-131
- UNESCO-WWAP (2006) *El agua, una responsabilidad compartida* (ISBN UNESCO: 92-3-104006-5), Zaragoza, España (Versión digital disponible en <http://upo.unesco.org>)
- U.S. Dept. Of Health & Human Services-ASTDR (1993). Toxicological profile for Cadmium (TP-92/06). Atlanta GA
- US EPA (1985) Ambient water quality criteria for cadmium. EPA 440/5-84-032. National Technical Information Service, VA
- US EPA (2001) Update of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-8222-R-01-001-US EPA Office of water, Washington DC
- US EPA (2007) Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor. Risk Assessment Forum. EPA 120/R-07/001
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacology* 13: 57-149
- van Gestel CAM, Van Brummelen TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225
- Vannote RL, Wayne Minshal G, Cummins KW, Sedell JR, Cushing CE (1980) The River Continuum Concept. *Can J Fish Aquat Sci* 37: 130-137
- Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE (2007) Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneta (*Metynnis orinocensis*). *Environ Toxicol Pharmacol* 25: 365-372
- Verboost PM, Van Rooij J, Flik G, Loock RAC, Wandelaar Bonga SE (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J exp Biol* 145: 185-197
- Verboost PM, Flik G, Fenwick JC, Greco AM, Pang PKT, Wandelaar Bonga SE (1993) Branchial calcium uptake: possible mechanisms of control by stanniocalcin. *Fish Physiol Biochem* 11: 205-215
- Verrengia Guerrero NR, Kesten EM (1993) Levels of heavy metals in biota from La Plata River. *Environ Toxicol Wat Qual* 8: 335-344
- Vigliano FA, Aleman N, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Ultrastructural characterization of gills in juveniles Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anat Histol Embryol* 35: 76-83
- Villagra de Gamundi A, Seeligmann de Sosa Gómez C, Tracanna BC, Locascio de Mitrovich C (1993) Sobre la limnología fisicoquímica del río Salí y sus tributarios en áreas próximas al embalse El Cadillal (Tucumán, Argentina). *Miscelanea* 91: 5-18
- Villar C, Tudino M, Bonetto C, Stripeikis J, d'Huicque (1998) Heavy metal concentrations in lower Paraná and right margin of Río de la Plata rivers. *Verh Internat Verein Limnol* 26: 963-966

- Villar C, Stripeikis J, Cotautti D, D’Huicque L, Tudino M, Bonetto C (2001) Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the lower Paraná river and Río de la Plata Estuary. *Hydrobiol* 457: 225-233
- Vismara R (1992) *Ecología Aplicada*. Hoepli, Milano
- Vogl C, Grillitsch B, Wyttek R, Hunrich Spieser O, Scholz W (1999) Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. *Environ Toxicol Chem* 18, 2736-2742
- Waalkes MP (2000) Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79: 241-244
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2006) *Principles of ecotoxicology*. CRC Press. Boca ratón, FL
- Watson CF, Benson WH (1987) Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium. *Ecotoxicol Environ Safety* 14: 252-259
- Weaver VM, Schwartz BS, Jaar BG, Ahn KD, Todd AC, Lee SS, Kelsey KT, Silbergeld EK, Lustberg ME, Parsons PJ, Wen J, Lee BK (2005) Associations of Eric acid with polymorphisms in δ -aminolevulinic acid dehydratase, Vitamin D receptor and Nitric oxide syntase genes in Korean Lead Workers. *Environ Health Persa* 113
- Webb JF (2000) Mechanosensory lateral line: functional morphology and neuroanatomy. En: *The laboratory fish*. Ostrander GK (Ed) Academic Press, London
- Webb PW (1984) Form and function in fish swimming. *Sci Am* 251: 72-82
- Wendelaar Bonga SA (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591-625
- Wetzel RG, Likens GE (1995) *Limnological analyses*. Springer-Verlag, New Cork
- WHO (1992). *IPCS Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental aspects*, Geneva, World Health Organization.
- WHO (1993). *IPCS Environmental Health Criteria Series N° 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.*, Geneva , World Health Organization.
- Widdows J, Donkin P (1991) Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol C100*: 69-75
- Willmer P, Stone G, Johnston I (2000) *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Willmer, P., Stone, G. y Johnston, I. (2005). *Environmental physiology of animals*. 2nd edition. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Wilson RW, Bergman HL, Wood CM (1994) Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1: Acclimation specificity, resting physiology, feeding and growth. *Can J Fish Aquat Sci* 51:527-535
- Wilson RW, Bergman HL, Wood CM (1994) Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2: Gill morphology, swimming performance and aerobic scope. *Can J Fish Aquat Sci* 51:536-544

- Wirz MVMA, Saldiva PH, Freire-Maia DV (2005) Micronucleus test for monitoring genotoxicity of polluted river water in *Rana catesbiana* tadpoles. Bull Environ Contam Toxicol 75:1220-1227
- Wright DA, Welbourn PM (1994) Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. Environ. Rev. 2: 187-214
- Wu SM, Weng CF, Hwang JC, Huang CJ, Hwang PP (2000) Metallothionein induction in early larval stages of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Physiol Zool 5: 531-537
- Wu SM, Jong KJ, Lee YJ (2006) Relationships among metallothionein, Cadmium accumulation and Cadmium tolerance in three species of fish. Bull Environ Contam Toxicol 76: 595 – 600
- Yilmaz M, Gul A, Karakose E (2003) Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($CdCl_2 \cdot H_2O$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). Chemosphere 56: 375-380
- Zhdanova IV, Reeb SG (2006) Circadian rhythms in fish. En: Sloman KA, Wilson RW, Balshine S (Eds), Behaviour and Physiology of Fish. Academic Press. Pp 413-468
- Ziswiler V (1978) Zoología Especial. Vertebrados. Ediciones Omega, Barcelona