

Indicadores de alerta temprana

**Natalia A. Ossana
Bettina L. Eissa**

Indicadores de alerta temprana

Natalia A. Ossana y Bettina L. Eissa

Resumen

Cuando se enfrentan a un estresor ambiental, los animales pueden responder de distinta manera. Dentro de estas respuestas se encuentran las que se conocen como "respuesta temprana", las cuales pueden servir como indicadores para monitorear contaminantes ambientales, ya sea algún tóxico o un ambiente perturbado.

Este capítulo desarrolla ejemplos de aplicación utilizando peces dulceacuícolas, tales como: a) comportamentales (modificaciones de la conducta natatoria); b) bioquímicos (actividad de enzimas de biotransformación y detoxificantes tales como la glutatión-S-transferasa (GST) y el contenido de Glutathion (GSH); c) fisiológicos: alteraciones en la asimilación, excreción, metabolismo. Este tipo de indicadores permite registrar daños en los organismos como modificaciones de la conducta natatoria, en la actividad de enzimas o en el metabolismo energético. Cuando los animales están sometidos a una situación de estrés ambiental, cuantificar estos parámetros sirve como indicador de alerta temprana.

Palabras clave: Indicadores tempranos, biomarcadores, peces, contaminación acuática

Abstract

Animals under environment stressors can response in a different way. These responses include those known as "early response." In this chapter, we will give examples of this type of response which can serve as early warning indicators to monitor environmental pollutants, whether it is a toxic or a polluted environment.

This chapter will develop examples of the application of early alert/warning indicators in freshwater fishes, such as: a) Behavioral: modifications of swimming behavior. b) Biochemical: studies of the biotransformation and detoxifier enzymes activities such as glutathione-S-transferase (GST) and Glutathione content (GSH). c) Physiological: alteration in the assimilation, excretion and metabolic rates. These types of indicators allow registering damage as well as changes in swimming behavior, in enzymes or energy content and its distribution in the organism. When animals are in contact with a pollutant, quantifying these parameters is useful as early warning indicators.

Keywords: Early signals, biomarkers, fishes, water pollution.

Introducción

Los bioindicadores son indicadores naturales y se utilizan para evaluar la salud del medio ambiente y también son una herramienta importante para detectar cambios en él, ya sean positivos o negativos (Parmar *et al.*, 2016). Pueden ser distintos tipos de organismos (bacterias, plancton, plantas y animales) que brindan información sobre la calidad y características biogeográficas y ecológicas de un ambiente, o de una parte de él, y que exhiben diversos grados de complejidad estructural. Inicialmente, se utilizaron especies o sus asociaciones como indicadores y, posteriormente, comenzaron a emplearse también atributos correspondientes a otros niveles de organización del ecosistema, como poblaciones, comunidades, etc., lo que resultó particularmente útil en estudios de contaminación. Esta cualidad orientada hacia los efectos de los estresores, es particularmente apta para el estudio en ecosistemas afectados por contaminantes antropogénicos.

Además de utilizar la presencia de organismos como indicadores, se pueden utilizar las respuestas de los individuos ante distintos tipos de estresores. Esas respuestas permiten cuantificar el grado de estrés que tiene un organismo y se denominan "biomarcadores". Estos se definen como cambios observables y/o mensurables a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico y/o comportamental que revelan la exposición presente o pasada de un individuo a un contaminante (Depledge, 1994; Porta, 1996). Los biomarcadores son parámetros que contribuyen al conocimiento de las condiciones en las que vive 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. Como los organismos rara vez son afectados por un solo contaminante, es necesario considerar otros efectos como los aditivos, sinérgicos y, aun los antagonicos.

Como se mencionó en capítulos anteriores los *bioindicadores* proporcionan información cualitativa de la salud del ambiente a través de la presencia o ausencia o mediante cambios en la abundancia de una especie. En cambio, los *biomarcadores*, están asociados a la exposición de un estresor ambiental y dado que esos cambios pueden medirse, permiten evaluar de manera cuantitativa la intensidad de un disturbio (González Zuarth *et al.*, 2014).

Tanto los bioindicadores como los biomarcadores son actualmente utilizados y promovidos por varias organizaciones, como un medio para realizar una vigilancia biológica (biomonitoreo) y evaluar posibles efectos sobre el ambiente, las especies biológicas y los seres humanos (Fig. 1).

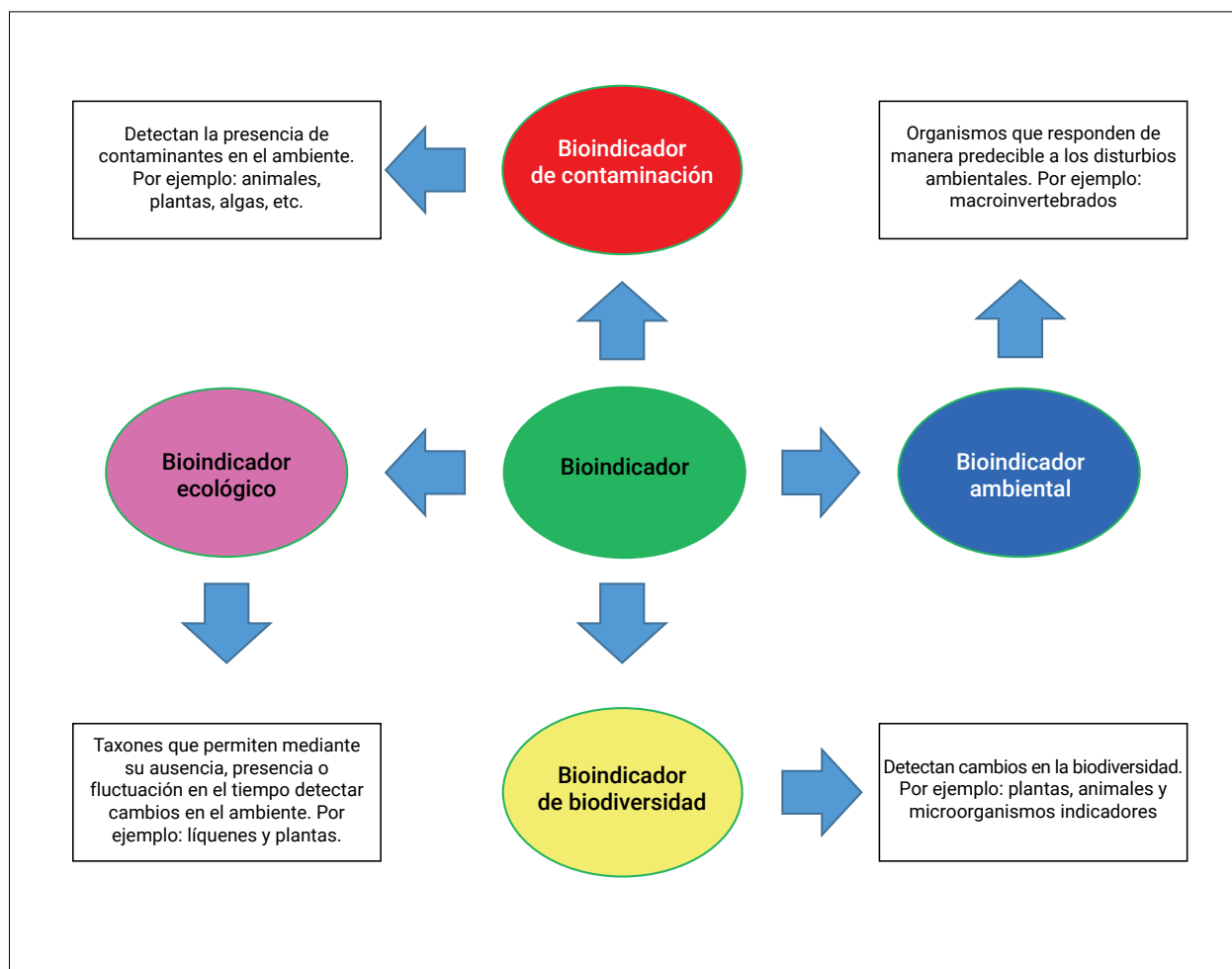


Figura 1: Sub-tipos de bioindicadores (extraído de Parmar *et al.*, 2016).

Ventajas de los bioindicadores de alerta temprana

Las ventajas asociadas con el uso de bioindicadores son las siguientes (Parmar *et al.*, 2016; González Zuarth *et al.*, 2014):

- Pueden determinarse los impactos sobre la biota.
- Pueden monitorearse los impactos sinérgicos, aditivos y antagónicos de varios contaminantes, ya que en la naturaleza un individuo rara vez se ve afectado por un solo contaminante.
- Pueden ser utilizados tanto para el diagnóstico en etapa temprana, así como para monitorear los efectos nocivos de las toxinas para las plantas y los animales.
- La información que brindan no se limita al momento del muestreo, pues son de carácter integrador de los perfiles físico-químicos pasados y presentes.
- Son una alternativa económicamente viable en comparación con otros sistemas de medición especializados ya

que no se requiere de equipamiento costoso que además demande un largo período de entrenamiento para su uso.

Los peces como bioindicadores

El uso de organismos indicadores de contaminación requiere conocer las tolerancias ecológicas y los requerimientos de las especies, así como sus adaptaciones. Las investigaciones sobre organismos indicadores de contaminación comprenden el estudio en el laboratorio, para establecer los límites de tolerancia de una especie a una sustancia o a una mezcla de ellas mediante ensayos de toxicidad; y también la observación y el análisis de las características ambientales de los sitios en los cuales se detectan o habitan con más frecuencia. Los organismos más utilizados como indicadores de contaminación acuática son algas, bacterias, protozoos, macroinvertebrados y peces.

En el esquema de la Fig. 2 se representan las respuestas biológicas (tempranas o tardías) en función de la relevancia ecológica. Los animales que presentan bajo nivel de complejidad responden relativamente rápido al estrés, lo

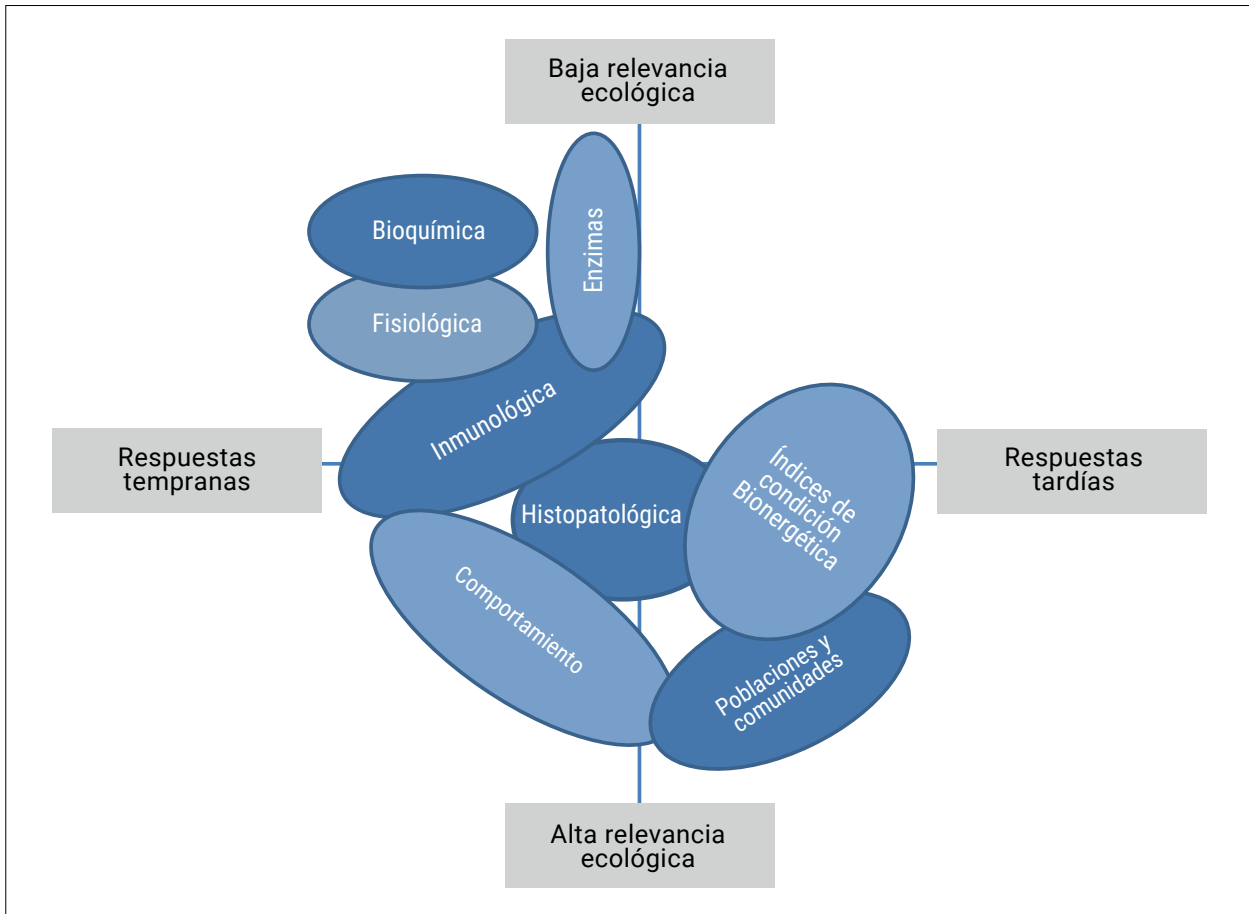


Figura 2. Niveles de respuestas biológicas en peces (adaptado de Adams, 1990).

que tendrá una alta importancia toxicológica; mientras que los organismos con un nivel de complejidad mayor, ya sea a nivel de población o comunidad, responden lentamente y si bien tienen bajo significado ecotoxicológico esa respuesta tiene mayor relevancia desde el punto de vista ecológico (Adams, 1990). Como se observa en la figura, las respuestas que serán "señales de alerta temprana" serán aquellas que aparezcan de manera rápida frente a la exposición a un contaminante, como las comportamentales, fisiológicas y bioquímicas. Mientras que los cambios histológicos y bioenergéticos requieren exposiciones más prolongadas en el tiempo.

Los peces fueron uno de los primeros organismos en ser utilizados en los protocolos de monitoreo ecotoxicológico acuático y aún siguen siendo seleccionados como especies centinela en diversos bioensayos de toxicidad. Esto último está motivado porque representan diferentes niveles dentro de la trama trófica y tienen una alta diversidad morfológica, fisiológica y ecológica. En particular, cabe destacar que los teleosteos ocupan gran variedad de nichos ecológicos tanto en aguas continentales como marinas.

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, se llama *homeostasis*. Los peces deben hacer frente de manera constante a cambios que ocurren en el ambiente, por ejemplo: temperatura, velocidad del agua, carga de sedimentos, falta de oxígeno, disponibilidad de alimentos, etc. Estos factores, individualmente o en conjunto, pueden imponer una condición de estrés a los sistemas fisiológicos y provocar un desequilibrio homeostático, dando como resultado una reducción en el crecimiento y reproducción, susceptibilidad a enfermedades y capacidad reducida para tolerar nuevos cambios; esto puede verse incrementado frente a la exposición a un contaminante.

Los peces, cuando se enfrentan a un factor de estrés ambiental, pueden responder de distinta manera. Beitinger & McCauley (1990) definieron varias categorías de respuesta:

1. *Sin respuesta*: El estímulo no es percibido o es nuevo para ese organismo, el cambio es demasiado grande y/o demasiado rápido y no hay alternativas disponibles para contrarrestarlo. Se produce un desequilibrio homeostático que si no se puede contrarrestar llevaría a la muerte del organismo.

2. *Reacciones comportamentales*: Comprende la primera línea de defensa ante estímulos ambientales. Son las primeras reacciones que ocurren, el organismo evita el estrés huyendo de esa condición desfavorable. Este punto es importante en la selección de hábitat.

3. *Respuestas fisiológicas*: Se producen cambios internos en diversos procesos fisiológicos, incluida la capacidad de aclimatación. Se producen ajustes en las tasas fisiológicas que pueden llevar a cambios en la homeostasis para contrarrestar el efecto causado por la exposición.

4. *Respuestas bioquímicas*: Síntesis de moléculas en respuesta al cambio ambiental.

Estas categorías se clasifican acorde al tiempo requerido de aparición. Para un organismo, los cambios bioquímicos no son sencillos, es más simple alejarse del factor de estrés ambiental (respuestas de huida) que reorganizar las funciones bioquímicas de la célula.

Ejemplos de aplicación

En el Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA) se han realizado bioensayos con peces de agua dulce, a campo y laboratorio, con el objeto de detectar indicadores de alerta temprana. En ese sentido, los puntos finales a evaluar han sido comportamentales, fisiológicos, histológicos, morfológicos, genotóxicos, determinaciones de actividades enzimáticas y no enzimáticas en distintos órganos blanco, etc.

En este capítulo se mostrarán algunos resultados de aquellos puntos finales que se consideran indicadores de alerta temprana, como: a) comportamentales b) bioquímicos y c) fisiológicos.

A) Biomarcadores comportamentales

El comportamiento sirve como un nexo entre procesos fisiológicos y ecológicos. Es un parámetro ideal para estudiar los efectos adversos de los contaminantes en ambientes naturales o en condiciones de laboratorio (Gilmour *et al.*, 2005).

Diseño experimental utilizado

Los bioensayos realizados en el PRODEA comprendieron un período de aclimatación y uno de exposición a un tóxico, en este caso un metal pesado, el Cadmio (Cd) y un contaminante de preocupación emergente, el Ibuprofeno (un analgésico). Además, también se evaluaron esas respuestas luego de exposiciones a muestras ambientales

del río Luján y Reconquista (Eissa *et al.*, 2009b; Castañé *et al.*, 2013; Ferro, 2017).

En estos bioensayos se realizaron controles con agua potable o agua moderadamente dura (MHW), con los cuales se contrastaron y validaron las respuestas obtenidas en los animales expuestos.

Tóxicos utilizados

El *ibuprofeno* es uno de los analgésicos no esteroideos que se encuentra en mayor frecuencia en cuerpos de agua superficiales (Salibián, 2014). De los fármacos administrados por vía oral, entre el 30 y el 90% de las dosis son excretados en la orina como sustancias activas, así muchas de estas drogas y/o sus metabolitos llegan a las cloacas. El vertido de estos efluentes en los cursos de agua resulta en una exposición crónica de los organismos acuáticos a estos compuestos con impactos desconocidos sobre ellos (Elorriaga *et al.*, 2013; Valdés *et al.*, 2014).

El Cadmio (Cd) se utilizó como tóxico de referencia. Se trata de un metal no ferroso que llega al ambiente a partir de la galvanización, producción de baterías, fabricación de estabilizadores de cloruro de polivinilo, pigmentos y esmaltes, celdas fotoeléctricas, cables eléctricos, acumuladores, fusibles, laminados de vapor y soldadura, aleaciones, combustión de diesel y petróleo, fertilizantes fosfatados, pesticidas, desechos de fundiciones y refinamiento de metales no ferrosos (Cobre, Níquel y Zinc) y petróleo (Bandara, 2010). Se ha demostrado su efecto teratogénico, embriotóxico, carcinogénico y nefrotóxico en invertebrados, vertebrados e incluso los seres humanos (Ossana *et al.*, 2009).

Parámetros comportamentales evaluados

Para los estudios comportamentales se utilizaron diversos *softwares*, como Virtual Fish y Jonas, que fueron diseñados especialmente para estos trabajos, y el comercial LoliTrack V3 (Loligo Systems). La utilización de estas herramientas permitió saber la localización espacial de los individuos dentro del acuario, segundo a segundo; se pudo así calcular un índice de actividad natatoria y la velocidad de nado, así como también la aceleración, la distancia total recorrida y el tiempo activo o inactivo (Eissa *et al.*, 2009a, 2009b; Eissa, 2009; Ferro, 2017) (ver Fig. 3).

Se diseñó un Índice de Actividad Natatoria (Ia), el que permitió evaluar los cambios en la actividad independientemente de la variabilidad entre individuos (Eissa, 2009) resultando cercano a 1 en los individuos control. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

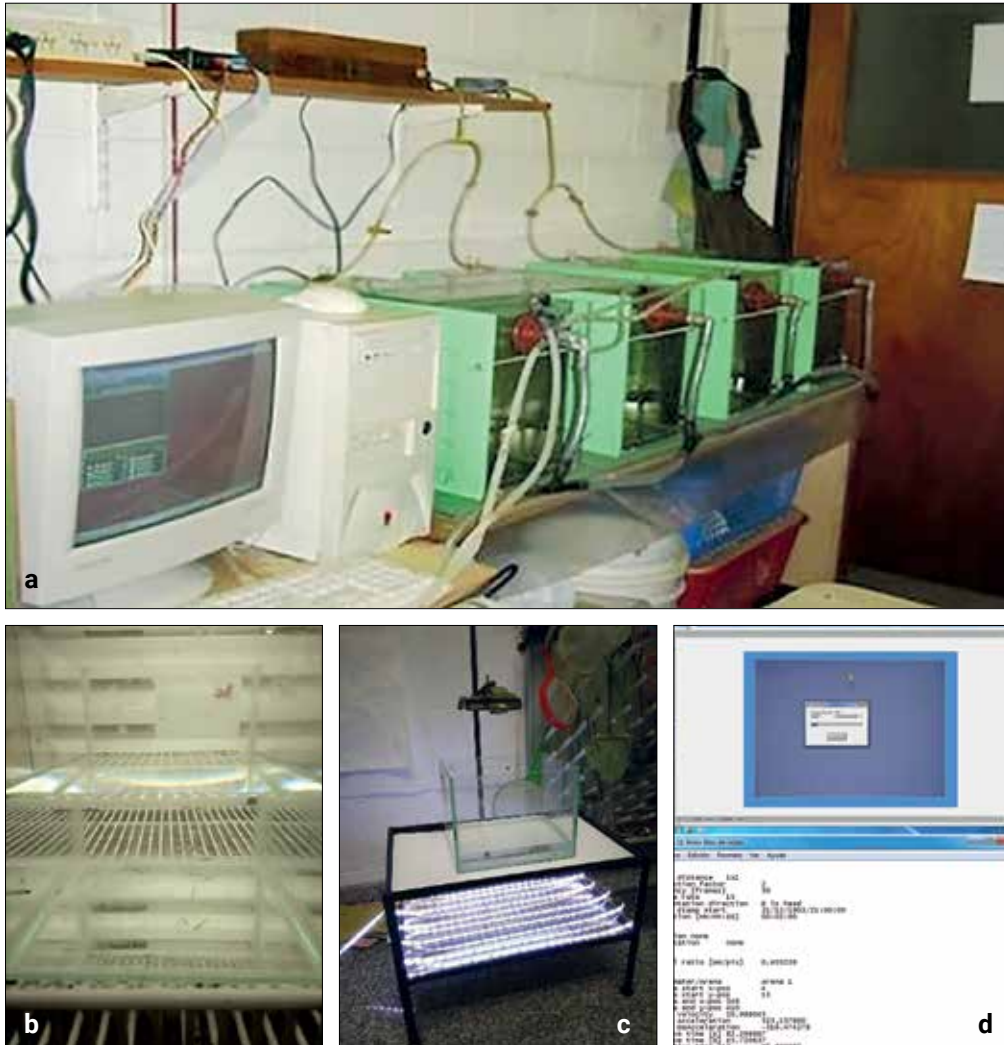


Figura 3: a) Peceras experimentales conectadas a una computadora con los softwares Virtual Fish y Jonás, b) Pecera utilizada con el software LoliTrack (Etapa de aclimatación), c) Etapa de Exposición y filmación, d) Planilla de datos y obtención de resultados.

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

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 $I_a < 1$.

Resultados obtenidos

Exposición a Cadmio

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos en *Cyprinus carpio* (la carpa común), *Australoeris facetum* (chanchita) y *Astyanax fasciatus* (mojarrita), en condiciones control y

expuestos a tres concentraciones subletales de Cadmio evaluados con Virtual Fish y Jonás.

Como se observa de los datos presentados en esta Tabla 1, para la carpa común y la chanchita el Índice (I_a) aumentó en todas las concentraciones de Cadmio ensayadas. Esto indica que se redujo significativamente la actividad de natación. En cambio, para la mojarrita (*A. fasciatus*) solo hubo cambios en la velocidad de nado, la cual aumentó significativamente respecto del control, mientras que en las otras especies solo aumentó para la concentración de 0.6 mg Cd/L.

Las especies analizadas mostraron diferentes respuestas frente al contaminante; fueron más sensibles *Astyanax fasciatus* y *Cyprinus carpio*. Esta conclusión resulta muy interesante a la hora de seleccionar una especie bioindicadora teniendo en cuenta que ambas pueden compartir el hábitat y estar expuestas al mismo contaminante.

Tabla 1: Actividad natatoria y velocidad de nado en *Cyprinus carpio*, *Australoerus facetum* y *Astyanax fasciatus*, controles y expuestos a tres concentraciones de Cadmio (Cd).

	Índice de Actividad natatoria (Ia)				Velocidad de nado (cm/s)			
	Control	0,6 mg Cd/L	0,5 mg Cd/L	0,3 mg Cd/L	Control	0,6 mg Cd/L	0,5 mg Cd/L	0,3 mg Cd/L
<i>Cyprinus carpio</i>	0,820 ± 0,080	1,029 ± 0,102 *	1,550 ± 0,600*	2,850 ± 1,400 *	8,47 ± 0,02	21,32 ± 0,24 *	7,20 ± 0,01	5,90 ± 0,07
<i>Australoerus facetum</i>	1,060 ± 0,120	4,050 ± 2,810 *	0,895 ± 0,107 *	3,354 ± 2,303 *	5,74 ± 0,12	9,22 ± 0,22 *	7,90 ± 0,01	5,90 ± 0,30
<i>Astyanax fasciatus</i>	1,120 ± 0,160	1,078 ± 0,134	1,153 ± 0,202	1,198 ± 0,272	7,34 ± 0,05	17,61 ± 0,08 *	13,10 ± 0,21 *	12,00 ± 0,10 *

*diferencias significativas respecto del control p<0.05 (Test de t)

Exposición a agua proveniente del río Reconquista

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos de la exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* (madrecita de agua) al agua del río Reconquista aguas arriba de la ciudad de Moreno, empleando el programa LoliTrack. En tanto, en la Tabla 3 se presentan los resultados de la exposición a tres muestras con diferentes niveles de contaminación del río Luján utilizando como organismo *test* juveniles de *Cyprinus carpio*.

En *C. decemmaculatus* se observó un aumento significativo de la velocidad y aceleración de nado, y una disminución del tiempo activo (Tabla 2). Estos resultados pueden interpretarse de la siguiente manera: los peces se mueven menos, pero a mayor velocidad.

Los resultados obtenidos se vinculan con las observaciones de Drummond & Russom (1990) quienes definieron al nado hiper reactivo como una actividad locomotora espontánea, acelerada, donde los peces reaccionan de forma exagerada a los estímulos externos.

Resulta interesante que se pudieron observar alteraciones de casi todos los parámetros natatorios, aun en los ensayos realizados con agua de un sitio caracterizado

como de polución leve. Esto indica que la alteración de los parámetros natatorios resulta ser sensible y de rápida aparición, lo que la constituye en un excelente indicador de alerta temprana.

Exposición a agua proveniente del río Luján

Para el ensayo que se describe a continuación, se eligieron tres lugares correspondientes al curso medio del río Luján: un sitio con bajo impacto (M. J. García) aguas arriba de la localidad de Mercedes, otro con actividad industrial en la ciudad de Jáuregui y el tercero luego de que el río ya atravesara el ejido urbano de la Ciudad de Luján (en la intersección del río con la Ruta 6) (Fig. 4). En la Tabla 3 se muestran los resultados de la exposición a muestras de estos tres sitios. En los bioensayos conductuales el valor de la *Ia*, en el período Control, fue estable oscilando en torno a 1, en tanto que en el caso de los peces expuestos durante 4 días al agua proveniente del Río Luján se observó una elevación significativa del mismo en las muestras procedentes de Jáuregui y Ruta 6, respecto a los controles. Dichas respuestas, fueron indicativas de una depresión de la actividad de los peces. El Índice de Actividad natatoria (*Ia*) también resultó ser un buen indicador de alerta temprana para muestras ambientales del río Luján.

Tabla 2: Resultados obtenidos para *Cnesterodon decemmaculatus* controles y expuestos a una muestra ambiental del río Reconquista.

<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	Unidades	Control	Río Reconquista
velocidad media	mm/s	17,66 ± 0,88	29,08 ± 0,91*
aceleración media	mm/s ²	176,77 ± 8,75	312,33 ± 5,77*
tiempo activo	s	103,86 ± 6,26	67,55 ± 3,48*
distancia recorrida	mm	1931,43 ± 177,62	2069,37 ± 152,30

*diferencias significativas respecto del control p<0.05 (Test de t)

Tabla 3: Actividad natatoria en *Cyprinus carpio* controles y expuestos a muestras ambientales del río Luján.

<i>Cyprinus carpio</i>	Índice de Actividad natatoria					
	Control	M.J.Garcia	Control	Jáuregui	Control	Ruta 6
Invierno 2005	1,14 ± 0,22	1,07 ± 0,14	1,01 ± 0,06	1,06 ± 0,13*	1,02 ± 0,06	1,42 ± 0,47*
Verano 2006	1,01 ± 0,72	1,07 ± 0,12	1,03 ± 0,11	1,07 ± 0,14	1,02 ± 0,08	2,04 ± 0,79*

*diferencias significativas respecto del control $p < 0.05$ (ANOVA y Tuckey)

Exposición a Ibuprofeno

En la tabla 4 se muestran los resultados de la exposición de machos y hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* a 100 µg/L de Ibuprofeno (concentración nominal). Estos resultados se obtuvieron con el software LolyTrack luego de realizar filmaciones individuales de 6 minutos cada una.

Los parámetros natatorios de las hembras no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (controles vs. expuestos) pero si se observó que las hembras que fueron expuestas a este

analgésico tienden a tener valores entre un 5 y un 10% menores que sus controles. En el caso de los machos las diferencias en la velocidad son significativas, desarrollando una velocidad media 50% mayor que la de los machos control (Ferro, 2017) (Tabla 4).

B) Biomarcadores bioquímicos

Hay muchos parámetros de biomarcadores bioquímicos que han sido ampliamente investigados. Algunos son enzimáticos o de biotransformación involucrados en la

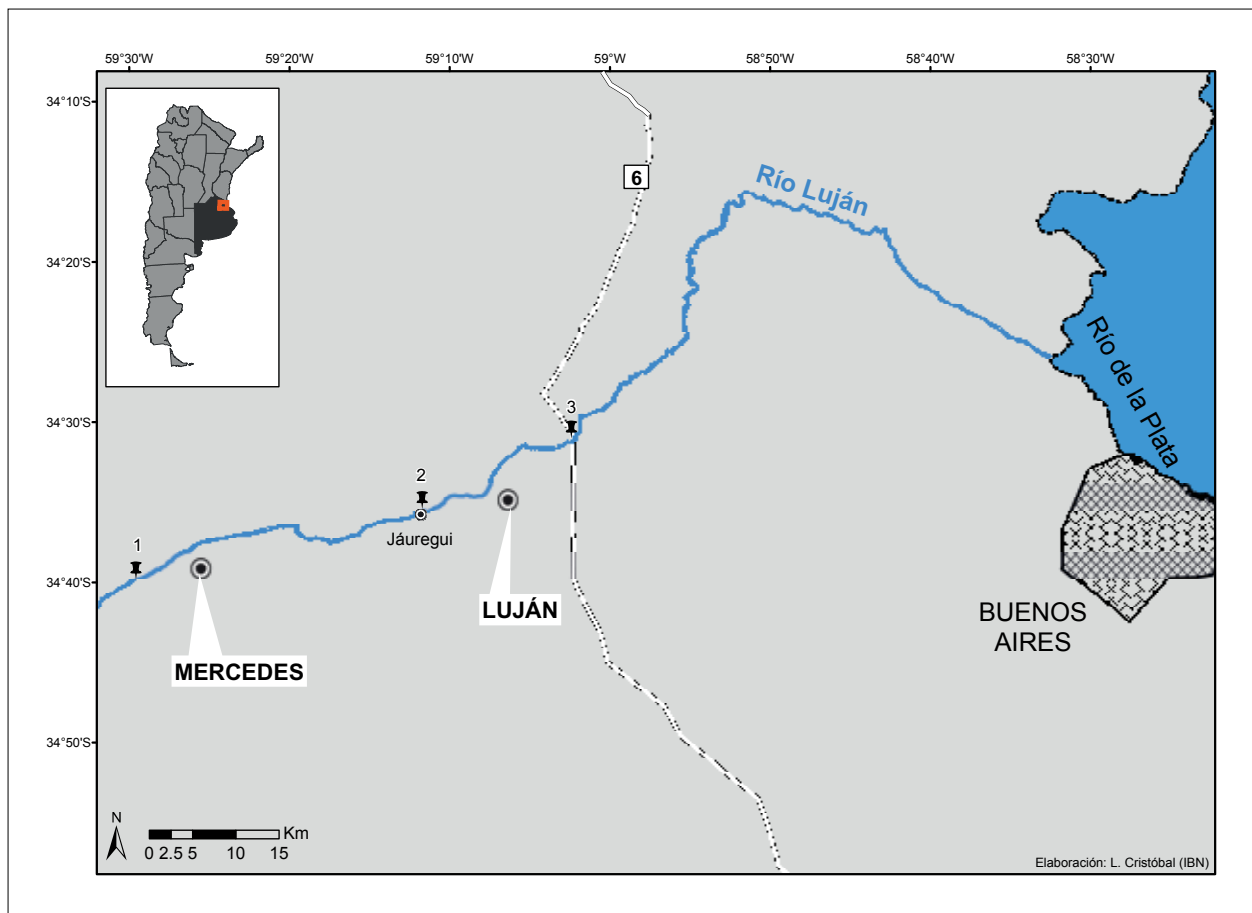


Figura 4: Mapa señalando los sitios de muestreo en el río Luján donde se colectaron las muestras de agua 1) M. J. García, 2) Jáuregui y 3) intersección con Ruta 6.

Tabla 4: Biomarcadores comportamentales en *Cnesterodon decemmaculatus* controles y expuestos a Ibuprofeno.

	Sexo (n)	Longitud [mm]	Velocidad [mm/s]	Aceleración [mm/s ²]	Actividad [s]	Distancia [n° de cuerpos]
AP	Hembras (16)	21,5±0,9	19±2 ^a	194±16	112±07	110±15
	Machos (15)	20,6±0,5	21±1 ^a	211±25	110±10	125±23
IBU	Hembras (16)	19,5±1,0	18±2 ^b	176±15 ^a	100±08	104±19 ^b
	Machos (13)	20,6±0,4	29±3 ^{ab}	273±52 ^a	113±08	155±15 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0.05$ (Test de Mann Whitney)

detoxificación de xenobióticos o sus metabolitos, otros son biomarcadores de estrés oxidativo. Por ejemplo, la actividad de acetilcolinesterasa cerebral (AChE) se utiliza como biomarcador de exposición a agroquímicos, ya que se inhibe en presencia de pesticidas. La catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) son enzimas que eliminan al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual es muy reactivo y potencialmente deletéreo para los sistemas biológicos, ya que oxida lípidos, proteínas y al ADN. La SOD convierte al $\cdot\text{OH}$ en peróxido (H_2O_2) y la CAT convierte el peróxido en dos moléculas de agua (Di Giulio & Hinton, 2008).

Este tipo de biomarcadores ha sido empleado para analizar el efecto del Cd y de una muestra ambiental del río Reconquista sobre el pez *Cnesterodon decemmaculatus*. También se realizaron ensayos de simulación con un pulso de contaminación por Cadmio. A la muestra ambiental tomada del río Reconquista se le adicionó el metal pesado y se expusieron animales a esas muestras. Para los estudios bioquímicos, una vez finalizado el período de exposición de 96 h, los animales fueron sacrificados y disecados para la determinación de los

biomarcadores seleccionados sobre el cuerpo y la cabeza. En todos estos estudios se midió la actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST), una enzima de biotransformación que provee protección celular contra los efectos tóxicos de una amplia variedad de compuestos endógenos ambientales. Su rol principal es la detoxificación de productos de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. También se determinó el contenido de glutatión (GSH), un tripéptido involucrado en la protección celular, pero también en el metabolismo, biosíntesis, transporte y comunicación celular. Además, es un cofactor de otras enzimas como la Glutatión-S-transferasa (GST) (Ossana *et al.*, 2019; Ossana *et al.*, 2016; Di Giulio & Hinton, 2008; Hermes-Lima, 2004). Los valores de estos parámetros se expresaron en función del contenido de proteínas y se compararon con controles negativos mantenidos en agua reconstituida moderadamente dura (MHW).

Se desprende de los resultados presentados en esta Tabla 5 que hubo una disminución en la actividad de la GST y bajos niveles del contenido de GSH en los animales que fueron expuestos al Cd, al agua del río y al agua del río

Tabla 5: Biomarcadores bioquímicos en *Cnesterodon decemmaculatus*, expuestos durante 96 hs a Cadmio, a una muestra ambiental del río Reconquista, y esa muestra ambiental simulando un pulso de contaminación con Cadmio.

		Primavera			Otoño		
	GST (tronco)	GSH (tronco)	GSH (Cabeza)	GST (tronco)	GSH (tronco)	GSH (Cabeza)	
Control (MHW)	0,05 ± 0,002 (25)a	8,17 ± 0,49 (12)a	22,18 ± 2,81 (22)a	0,11 ± 0,007 (12)ab	13,09 ± 0,77 (12)a	15,05 ± 1,40 (13)a	
Río Reconquista	0,03 ± 0,003 (20)b	2,90 ± 0,43 (16)c	16,75 ± 1,49 (17)ab	0,11 ± 0,007 (18)ab	10,43 ± 0,38 (15)bc	14,43 ± 1,07 (15)a	
Río+ Cd 2 mg/L	0,05 ± 0,003 (19)a	5,45 ± 0,47 (13)b	13,41 ± 0,67 (16)b	0,14 ± 0,01 (20)a	11,04 ± 0,36 (17)c	9,45 ± 0,38 (18)b	
Cd 2 mg/L	0,05 ± 0,004 (13)a	6,24 ± 0,64 (7)b	13,33 ± 0,95 (14)b	0,10 ± 0,01 (17)b	9,13 ± 0,42 (13)b	16,25 ± 1,08 (14)a	

Letras distintas indican diferencias significativas, $p < 0.05$ (ANOVA y Tuckey)

MHW (Agua moderadamente dura, de sus siglas en inglés Moderated Hard Water)

Cd (Cadmio); GST= Glutatión-S-Transferasa ($\mu\text{moles CDNB conjugado} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg proteínas}^{-1}$); GSH= contenido de Glutatión ($\mu\text{moles de tioles ácidos solubles} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$).

con el pulso de contaminación, comparando con individuos controles. Estos biomarcadores se expresaron de manera temprana poniéndose en evidencia luego de 96 h de exposición. El GSH es un tripéptido que es abundante en el hígado de los individuos. Como se mencionó, es cofactor de otras enzimas como la GST y la GPx (glutación peroxidasa) y tiene capacidad antioxidante ya que tiene un grupo tiol (-SH) y es la cisteína el aminoácido que se oxida. La GSSG surge de la oxidación de dos moléculas de GSH. En células normales sin presión oxidativa la relación de estas moléculas es 100:1 (GSH:GSSG). Se cree que el GSH es la primera barrera de defensa contra la hepatotoxicidad producida por el Cadmio (Di Giulio & Hinton, 2008; Rani *et al.*, 2014).

C) Biomarcadores fisiológicos:

Los bioensayos que se realizaron para evaluar distintos aspectos del metabolismo se realizaron con *Cyprinus carpio* y *Cnesterodon decemmaculatus*, la primera es una especie cosmopolita de amplia distribución y la segunda una especie autóctona de los ecosistemas pampeanos. Dado que frente a una situación de estrés ambiental las variables metabólicas (tasa metabólica, ingesta, asimilación, producción de heces) se verán perturbadas, pueden ser utilizadas como biomarcadores que servirán como indicadores de alerta temprana. En este tipo de evaluaciones de parámetros metabólicos, diariamente se removían las sobras de alimento y las heces producidas, las cuales se filtraban, secaban y pesaban y, finalizado el período de exposición, los animales se colocaban dentro de respirómetros para determinar el consumo de oxígeno junto a la excreción de amonio (ver Fig. 5). De esta forma se calculó la ingesta, la producción de heces, la asimilación diaria y un índice integrador denominado Campo de Crecimiento, que en inglés se denomina *Scope for Growth* (SFG). Este índice tiene en cuenta todas

estas variables y permite determinar, comparando con los individuos controles, si los animales tienen energía para destinar al crecimiento, desarrollo y reproducción. El SFG aporta información sobre el manejo y distribución de la energía que hace el organismo frente a una situación de estrés. Se calcula como la energía incorporada a partir de la dieta, menos la energía consumida en el mantenimiento y crecimiento (Baudou *et al.*, 2019; Baudou *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2011a).

Los resultados de estos ensayos obtenidos luego de la exposición a muestras ambientales del río Reconquista y de la exposición a Cadmio se muestran en la Tabla 6.

Cómo puede observarse en la Fig. 5 y en los resultados presentados en la Tabla 6, los individuos expuestos a Cd, ingirieron menos alimento y también produjeron menos heces. Esa reducción fue estadísticamente significativa comparada con los individuos controles. Los valores en la asimilación fueron menores para los individuos expuestos, al tener una menor ingesta la asimilación también disminuyó. Los animales expuestos a Cd ven afectada su homeostasis metabólica, y la baja asimilación resulta de un efecto indirecto en el comportamiento alimenticio de los animales, con una marcada reducción en la ingesta de alimento diaria, con el consiguiente déficit en aporte energético/calórico.

La Tasa Metabólica Específica fue mayor en los individuos expuestos a Cd, lo que puede ser interpretado como una consecuencia de un aumento en la demanda de energía. Esto se observa tanto en *C. decemmaculatus* como en *C. carpio*.

El SFG integra respuestas en un único valor que refleja el estado de energía del animal. Es un biomarcador indirecto de los niveles de contaminación en el ambiente que afectan al mantenimiento del balance de energía

Tabla 6: Estudios del metabolismo en *Cnesterodon decemmaculatus* y *Cyprinus carpio* controles expuestos a distintas concentraciones de Cadmio y a una muestra del río Reconquista.

	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>						<i>Cyprinus carpio</i>	
	Control	0,45 mg/L Cd	Control	0,8 mg/L Cd	Control	Río Reconquista	Control	0,15 mg/L Cd
Ingesta (I)	250,7 ± 8,6	200,1 ± 12,1*	250,3 ± 7,3	186,6 ± 10,1*	254,8 ± 8,7	260,1 ± 12,7	1597,5 ± 41,1	1364,1 ± 84,6*
Heces (H)	65,4 ± 5,8	36,7 ± 0,5*	37,8 ± 5,8	22,5 ± 1,5*	66,1 ± 5,6	130,9 ± 12,1*	176,3 ± 17,6	84,6 ± 15,7*
Asimilación (A)	200,2 ± 8,9	150,7 ± 13,1*	217,8 ± 10,6	160,3 ± 12,9*	188,7 ± 9,6	129,1 ± 11,5*	1421,2 ± 41,4	1280,7 ± 47,2*
Tasa Metabólica Específica (TME)	100 ± 8	100 ± 14	100 ± 3	400 ± 8*	155,5 ± 10,1	68,6 ± 10,3*	345,7 ± 21,3	419,5 ± 17,3*
Campo de Crecimiento (SFG)	54,4 ± 8,6	-41,8 ± 8,4*	112,2 ± 27,8	-300,9 ± 80*	44,6 ± 8,6	14,0 ± 10,9*	459,1 ± 26,6	-166,1 ± 50,1*

I, H, A, TME, SFG ($J.g.PS^{-1}.día^{-1}$)

*diferencias significativas respecto del control $p < 0.05$ (Test de t)

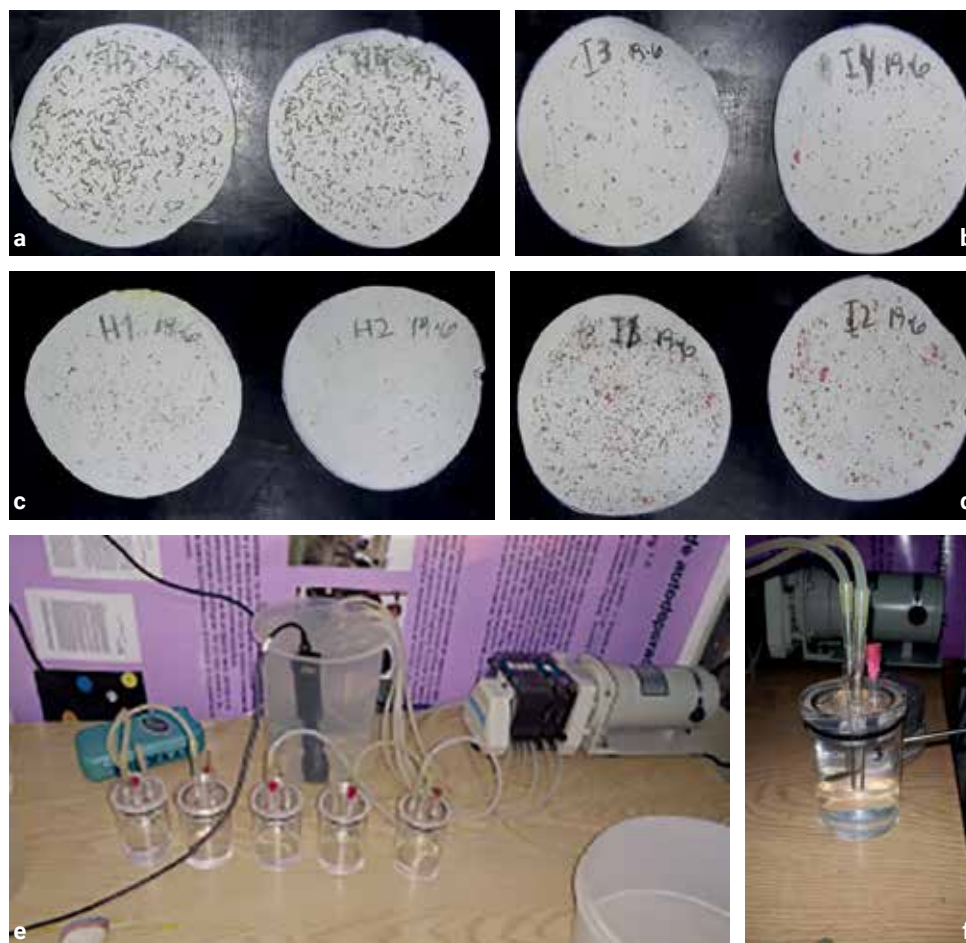


Figura 5: a) filtros con heces de *C. decemmaculatus* y b) filtros con restos de alimento, en los controles; *C. decemmaculatus* expuestos a Cadmio c) filtros con heces y d) filtros con restos de alimento e) y f) fotos de los respirometros de acrílico donde se colocaron los peces individualmente para determinar consumo de oxígeno.

(Widdows & Donkin, 1991; Baudou, 2019). Una disminución en el SFG es un claro indicador de una reducción aguda en la energía disponible para el crecimiento. Este parámetro es un buen indicador ecológico de alerta temprana para detectar contaminación por metales pesados como el Cd pero que también mostró una reducción significativa en animales expuestos a una muestra ambiental.

La mayoría de las respuestas observadas en los peces expuestos a Cadmio también se evidenciaron en los individuos expuestos a una muestra ambiental de la naciente del río Reconquista, sitio caracterizado como de contaminación leve. Salvo la ingesta, todos los demás parámetros fueron estadísticamente diferentes a los controles.

Discusión

El impacto de las actividades humanas tales como la fragmentación de los hábitats, la contaminación ambiental y la sobreexplotación de los recursos, junto a los efectos del cambio climático, han ocasionado alteraciones drásticas

sobre los ecosistemas en períodos cortos, lo que frecuentemente impide que los organismos se adapten a su nueva realidad y como consecuencia final se extingan. Esta problemática ha generado una búsqueda intensa de métodos precisos, económicos, fáciles de implementar y que permitan la detección temprana de disturbios ambientales (González Zuarth *et al.*, 2014). Los resultados aquí presentados, aplicación de indicadores de alerta temprana en peces dulceacuícolas, son obtenidos por métodos que cumplen con esas premisas: son precisos, económicos y relativamente fáciles de implementar.

Estos estudios han aportado información sobre la toxicidad del Cadmio (utilizado como toxico de referencia) y de distintas muestras ambientales sobre distintas especies de peces. Estos biomarcadores pueden ser utilizados en evaluaciones toxicológicas y ser incluidos en programas de monitoreo de ríos y arroyos. En este capítulo se han mostrado distintos ejemplos en varias especies de peces teleosteos, tanto introducidos como nativos, los cuales habitan los sitios en los cuales se tomaron las muestras de agua para los bioensayos. Estos biomarcadores se

podrían utilizar con otras especies de peces, con otros tóxicos o muestras ambientales, realizando los ajustes metodológicos necesarios.

Según Gopalakrishnan *et al.* (2008) una especie candidata en bioensayos de evaluación ecotoxicológica no solo debe ser sensible a los posibles contaminantes, sino que también debe ser relativamente fácil de recolectar del campo, de fácil mantenimiento, cultivo y crianza en condiciones de laboratorio. Las especies de peces utilizados por nosotros cumplen con esas premisas. La carpa común, *Cyprinus carpio*, es un teleosteo cosmopolita cuya utilización como especie *test* para la realización de bioensayos de toxicidad es aconsejada y promovida por los Organismos reguladores internacionales. La madre-cita de agua, *Cnesterodon decemmaculatus*, es una especie neotropical ampliamente distribuida en América Latina, que puebla densamente una gran variedad de cuerpos de agua de América del Sur, incluido el tramo medio del río Reconquista. Además, es una de las especies de peces recomendadas para su uso en ensayos de monitoreo estandarizados según las normas IRAM (2008) y de fácil cría y cultivo en laboratorio (Ferrari *et al.*, 2017).

Los puntos finales de los estudios comportamentales integran procesos bioquímicos, celulares y neuronales. Debido a que sirven como el enlace entre las respuestas fisiológicas y los procesos ecológicos, pueden ser útiles para evaluar de manera temprana el estrés provocado por contaminantes ambientales (Scott & Sloman, 2004). La alteración de los patrones de comportamiento normales causada por la exposición a contaminantes puede influir en aquellos comportamientos complejos que ocurren en la naturaleza, provocando graves riesgos para el éxito de las poblaciones de peces y pueden conducir a cambios en la biodiversidad (entre otras consecuencias ecológicas).

Los estudios de parámetros comportamentales se pueden realizar de manera sencilla y existen varios *softwares* de uso gratuito que pueden utilizarse. En la Argentina hay varios grupos de investigación que han llevado adelante este tipo de estudio con peces. Bonifacio *et al.* (2016), de la Universidad de Córdoba, utilizaron el programa ANY-Maze® Stoelting Co. En la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires se realizan estudios comportamentales con *Gambusia holbrooki* donde evalúan la actividad natatoria a partir de filmaciones con el *software* Ethovision XT 12.0 (Meijide *et al.*, 2018). Cazenave *et al.* (2008), de la Universidad Nacional del Litoral, estudiaron la velocidad media y el porcentaje de movimiento de *Jenynsia multidentata* por exposición a microcistina-RR (MC-RR).

En cuanto a los biomarcadores bioquímicos, son ampliamente utilizados en la Argentina y el mundo, en peces y otros organismos acuáticos. En las revisiones de Lushchak (2011, 2016) se observan la gran variedad de estudios

utilizando peces. En la Argentina son importantes los trabajos realizados por Ballesteros *et al.* (2017) y Maggioni *et al.* (2012) sobre el río Suquía en la Provincia de Córdoba. De la Universidad Nacional del Litoral los estudios de Cazenave *et al.* (2009 y 2014), y de la Universidad del Comahue los trabajos con anfibios de Ferrari *et al.* (2011b) y Liendro *et al.* (2015), por mencionar solo algunos investigadores y algunas de sus contribuciones.

Los biomarcadores fisiológicos tienen una respuesta rápida y también son parámetros relativamente fáciles de determinar, aunque laboriosos, ya que requieren conocer el peso del alimento que los animales van a ingerir y todos los días filtrar el alimento sobrante y las heces, pero son bastante económicos ya que requieren papel de filtro y una bomba para filtrar el agua.

Los recipientes para realizar el consumo de oxígeno dependerán del tamaño de la especie en cuestión. El SFG es un índice que integra muchos parámetros del metabolismo y permite conocer el estado energético del animal. 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.

Los investigadores arriba mencionados trabajan con estos indicadores de alerta temprana en especies dulceacuícolas. Los mismos integran grupos de investigación en distintas instituciones del país. Con lo cual se reafirma la idea de que los bioensayos con los indicadores tempranos descritos en este trabajo son fácilmente reproducibles con el equipamiento con el que normalmente se cuenta en institutos y universidades nacionales.

Ciertamente, la contaminación en ecosistemas acuáticos a menudo se pone de manifiesto con concentraciones de los tóxicos muy por debajo de aquellas que causan mortalidad (Reynders *et al.*, 2006). En este contexto conviene considerar que los *test* de letalidad aguda ignoran lo que se ha denominado "muerte ecológica" (Tortorelli *et al.*, 1990) que puede ocurrir después de exposiciones crónicas a concentraciones subtóxicas de contaminante. Aun si los animales son dañados levemente, ellos pueden verse afectados en su adaptación y sobrevivencia en un entorno ecológico modificado por el xenobiótico¹.

¹ Sustancias extrañas que pueden ser introducidas por el ser humano en un ecosistema acuático en forma deliberada o accidental provocando un deterioro de la calidad del agua con perjuicio para la vida acuática (Rand, 1995).

De esta manera, al tener dañadas directa o indirectamente algunas de sus funciones fisiológicas básicas, un pez corre el riesgo de ser fácilmente depredado, ser menos eficiente en la provisión de su alimento, reducir su potencial reproductivo, limitar su capacidad de migración y distribución en el ambiente, etc. Es por eso que resulta de suma importancia detectar biomarcadores de alerta temprana que nos den señales de alerta del estrés para la especie en estudio.

Conclusión

La implementación de bioindicadores y biomarcadores en programas de monitoreo ambiental de cuerpos de agua dulceacuicola puede resultar muy útil como una herramienta de evaluación primaria y es de suma importancia que sean consideradas principalmente por aquellos organismos y entes gubernamentales, organismos de gestión, ONGs., etc. que gestionan políticas públicas referidas a la utilización, cuidado y saneamiento de este recurso.

Bibliografía:

- Adams, S.M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating effects of stress on fish. *American Fish Society* 8: 1-8.
- Ballesteros, M.L., N.G. Riveti, D.O. Morillo, L. Bertrams, M.V. Amé & M.A. Bistoni. 2017. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminations. *Science of the Total Environment* 595: 711-722.
- Bandara, J.M.R.S., H.V.P. Wijewardena, J. Liyanegge, M.A. Upul, & J.M.U.A. Bandara. 2010. Chronic renal failure in Sri Lanka caused by elevated dietary cadmium: Trojan horse of the green revolution. *Toxicology Letters* 198 (1): 33-39.
- Baudou, F.G. 2019. *Evaluación de efectos ecofisiológicos y ecotoxicológicos en *Cnesterodon decemmaculatus* bajo condiciones de estrés ambiental* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Baudou, F.G., N.A. Ossana, P.M. Castañé, M.M. Mastrángelo, A.A. Gonzalez Nuñez, M.J. Palacio & L. Ferrari. 2019. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment* 650: 1779-1786.
- Baudou, F.G., N.A. Ossana, P.M. Castañé, M.M. Mastrángelo & L. Ferrari. 2017. Cadmium effects on some energy metabolism variable in *Cnesterodon decemmaculatus* adults. *Ecotoxicology* 26 (9): 1250-1258.
- Beitinger, T.L. & R.W. McCauley. 1990. Whole-Animal Physiological Processes for the Assessment of Stress in Fishes. *Journal of Great Lakes Research* 16: 542-575.
- Bonifacio, A.F., J. Cazenave, C. Bacchetta, M.L. Ballesteros, M.A. Bistoni, M.V. Ame, L. Bertrand & A.C. Hued. 2016. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators* 67: 88-97.
- Castañé, P.M., B.L., Eissa & N.A. Ossana. 2013. Respuesta de biomarcadores bioquímicos, morfológicos y comportamentales de la carpa común, *Cyprinus carpio*, por exposición a muestras ambientales. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 8 (1): 41-47.
- Cazenave, J., C. Bachetta, A. Rossi, A. Ale, M. Campana & M.J. Parma. 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological Indicators* 38: 104-112.
- Cazenave, J., C. Bachetta, M.J. Parma, P.A. Scarabotti & D.A. Wunderlin. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus*

- lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado river basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution* 157: 3025-3033.
- Cazenave, J., M.L. Nores, M. Miceli, M.P. Díaz, D.A. Wunderlin & M.A. Bistoni. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research* 42: 1299-1307.
- Depledge, M.H. 1994. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C. (Eds.): *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (pp. 271-295). Boca Raton: Lewis Publisher.
- DiGiulio, R.T. & D.E. Hinton (Eds.) 2008. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Drummond, R.A. & C.L. Russom. 1990. Behavioral toxicity syndromes: a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile Fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 37-46.
- Eissa, B.L., N.A. Ossana, A. Salibián, L. Ferrari & H.R. Perez. 2009a. Cambios en la velocidad de nado como indicador del efecto tóxico del cadmio, en *Astyanax fasciatus* y *Australoheros facetum*. *Biología Acuática* 26: 83-90.
- Eissa, B.L., N.A. Ossana, L. Ferrari & A. Salibián. 2009b. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 58 (4): 1032-1039.
- Eissa, B.L. 2009. *Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al cadmio en peces pampeanos* (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Elorriaga Y, D.J. Marino, P. Carriquiriborde & A.E. Ronco. 2013. Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1): 397-400.
- Ferrari L., J. Ficella, M. Mastrángelo, M. Palacio, A. Somma & L. Trípoli. 2017. *Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio*. Luján, Buenos Aires, Argentina: EdUnLu.
- Ferrari, L., B.L. Eissa & A. Salibián. 2011a. Energy balance of juvenile *Cyprinus carpio* after a short-term exposure to sublethal waterborne cadmium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 853-862.
- Ferrari, A., C. Lascano, A.M. Pechen de D'Angelo & A. Venturino. 2011b. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)* 153: 34-39.
- Ferro, J.P. 2017. *Estudio del comportamiento de peces como método para evaluar toxicidad ambiental* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Luján.
- Gilmour, K.M., R.W. Wilson & K.A. Sloman. 2005. The integration of behavior into comparative physiology. *Physiological and Biochemical Zoology* 78: 669-678.
- González Zuarth, C.A., A. Vallarino, J.C. Pérez Jiménez & A.M. Low Pfeng (Eds.). 2014. *Bioindicadores: Guardianes de nuestro futuro ambiental*. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Gopalakrishnan S., H. Thilagam & P. Vivek Reja. 2008. Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermiotoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. *Chemosphere*, 71: 515-528.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* Hoboken: John Wiley & Sons, pp: 319-368.
- IRAM. 2008. Calidad Ambiental Calidad de agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. IRAM 29112/2008.
- Liendro, N., A. Ferrari, M. Mardirosian, C.I. Lascano & A. Venturino. 2015. Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39: 525-535.
- Lushchak, V.I. 2011. Review. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101: 13-30.
- Lushchak, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42: 711-747.
- Maggioni, T., A.C. Hued, M.V. Monferrán, R.I. Bonansea, L.N. Galanti & M.V. Amé. 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquia river (Córdoba, Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 337-357.
- Meijide FJ, P. Prietoc, L.S. Dorelleb, P.A. Babayd & F.B. Lo Nostro. 2018. Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety behaviours of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15: 646-655.
- Ossana, N.A., B.L. Eissa & A. Salibián. 2009. Short communication: cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Environmental and Health*, 3 (3): 302-309.

Ossana, N.A., F.G. Baudou, P.M. Castañé, L. Tripoli, S. Soloneski & L. Ferrari. 2019. Histological, genotoxic and biochemical effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): early response bioassays to assess the impact of receiving waters. *Journal of Toxicology*, 2019: 1-13.

Ossana, N.A., B.L. Eissa, F.G. Baudou, P.M. Castañé, S. Soloneski & L. Ferrari. 2016. Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 133: 73-81.

Parmar, T.K., D. Rawtani & Y.K. Agrawal. 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Sciences*, 9 (2): 110-118.

Porta, A. 1996. Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 30: 67-79.

Rand, G. 1995. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Washington DC: Taylor and Francis.

Rani, A., A. Kumas, A. Lal & M. Pant. 2014. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research*, 24: 378-399.

Reynders, H, K. Van Campenhout, L. Bervoets, W.M. De Coen & R. Blust. 2006. Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1558-1567.

Salibián A. 2014. Los fármacos como contaminantes emergentes de los ambientes acuáticos. *Revista Farmacéutica*, 156 (1/2): 76-92.

Scott, G.R. & K.A Sloman. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68: 369-392.

Tortorelli, M.C., D.A. Hernández, G. Rey Vazquez & A. Salibián. 1990. Effects of Paraquat on mortality and cardiorespiratory function of catfish fry *Plecostomus commersoni*. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 19: 523-529.

Valdés ME, M.V. Amé, M.A. Bistoni & D.A Wunderlin. 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of The Total Environment*, 472: 389-396.

Widdows, J. & P. Donkin. 1991. Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 69-75.

