

## Biomarcadores etológicos no invasivos de estrés ambiental: estudio comparativo en dos teleosteos de ecosistemas de la región pampeana argentina

Eissa BL<sup>1 2\*</sup>, Ferrari L<sup>1 3</sup>, Osanna NA<sup>1</sup> y Salibian A<sup>1 3</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, (6700)-Luján. Argentina.

<sup>2</sup> CONICET.

<sup>3</sup> Comisión de Investigaciones Científicas, Pcia. de Buenos Aires, (1900)-La Plata. Argentina.

Recibido 1 de Agosto de 2005 / Aceptado 5 de Mayo de 2006

**Resumen:** Mediante un dispositivo de registro automático se estudió el efecto de la exposición a soluciones subletales de Cd<sup>2+</sup> (0.3 mg. L<sup>-1</sup>) sobre algunos parámetros etológicos de juveniles de *Cyprinus carpio* (carpa común) y de *Astyanax fasciatus* ("mojarra"). Se evaluó el efecto del metal sobre la actividad natatoria total y las preferencias altitudinales y laterales de los peces. Los tres parámetros se registraron simultáneamente mediante un dispositivo original. Se evaluaron los niveles "normales" o estándar de dichos parámetros (los peces en agua potable, control) y los alcanzados por los mismos individuos tras su exposición al tóxico de referencia (Cd). El metal provocó una depresión de la actividad natatoria total alcanzando una magnitud comparable en ambas especies. La preferencia altitudinal, también resultó modificada: *C. carpio* se halló con mayor frecuencia en la capa superior de los acuarios mientras que *A. fasciatus* se ubicó en las inferiores. En cuanto a la preferencia lateral, los individuos de ambas especies evitaron la franja vertical donde se producía el goteo de la solución de Cd; si bien esta respuesta espacial de los animales no siguió un patrón definido fue más marcada en las carpas. Todas las respuestas se pusieron de manifiesto inmediatamente después de haberse iniciado la exposición al Cd. El método resultó sensible y apto para el seguimiento de los parámetros etológicos seleccionados. Se concluye que la actividad natatoria y la ubicación espacial de las especies estudiadas, entre otros indicadores, pueden ser considerados como biomarcadores de toxicidad acuática.

**Palabras clave:** *Cyprinus carpio*, *Astyanax fasciatus*, ecotoxicología acuática, biomarcadores conductuales de toxicidad, cadmio subletal.

**Abstract:** Non invasive behavioural biomarkers of environmental stress: comparative study on two teleosts from ecosystems of the pampean region of Argentina. By means of an automatic recording device, the effects of the exposure to sublethal solutions of Cd<sup>2+</sup> (0.3 mg. L<sup>-1</sup>) on some ethological parameters of juvenile *Cyprinus carpio* (common carp) and *Astyanax fasciatus*. The effect of the metal was evaluated through three parameters: the total swimming activity and the spatial (lateral and altitudinal) preferences, relative to controls (fish kept in tap water); they were registered simultaneously by means of an original device. There were determined successively the "normal" or standard levels of those parameters in control fish and those reached by the same individuals after their exposure to the reference toxic (Cd).

In both species the metal caused a depression of the total swimming activity in a comparable magnitude. The altitudinal preference was also modified: *C. carpio* was found more frequently in the superior

layer of the aquaria while *A. fasciatus* was found in the inferior ones. For the lateral preference, the individuals of both species showed an avoidance behavior of the site of the aquaria where the Cd solutions was dripping. This response of the animals didn't follow a defined pattern, but was more marked in the carps. All the evaluated responses to the toxic were detected immediately after the beginning of the exposure to Cd. The method proved to be sensitive and apt for the monitoring of the measured behavioural parameters which makes it a promising tool for biomonitoring purposes. We concluded that the swimming activity and the spatial location preferences of the studied species, among other, may be considered as biomarkers of aquatic toxicity.

**Key words:** *Cyprinus carpio*, *Astyanax fasciatus*, aquatic ecotoxicology, behavioural biomarkers of toxicity, sublethal cadmium

### Introducción.

*Bioensayos de toxicidad acuática.*

El uso de organismos acuáticos como indicadores precoces de la calidad toxicológica de áreas acuáticas se ha acentuado en los últimos 35 años. Entre ellos, los peces fueron los primeros en ser utilizados en los protocolos de evaluación ecotoxicológica acuática y aun siguen siendo de elección como especies centinela en diversos bioensayos de toxicidad [1].

Cuando un contaminante alcanza el medio acuático pueden ponerse de manifiesto efectos tóxicos directos sobre la biota de esos ambientes, cuya intensidad es función de diversos factores externos como la concentración y composición del contaminante, la duración de la exposición, etc. La información referida a este tipo de efectos es alcanzada mediante bioensayos de laboratorio cuyos resultados se aplican en la construcción de criterios para estimar riesgos ambientales, determinar niveles permitidos de contaminantes, evaluar el impacto ambiental adverso de vertidos tóxicos, etc.

Es importante anticipar que la información brindada por los bioensayos agudos (o letales) de laboratorio, generalmente uniespecíficos, no siempre es fácilmente extrapolable a las condiciones reales en las que lo habitual es la convivencia de varias especies en el mismo ambiente receptor, con diferentes letalidades para un mismo tóxico. Así, puede ocurrir que en los supervivientes se hayan producido efectos, también directos, pero subletales. Entre estos últimos pueden mencionarse los etológicos o las disfunciones suborganísmicas asociadas a los factores de estrés ambiental, que no necesariamente provocan la muerte de los animales. Por eso, esas

\*e-mail: prodea@mail.unlu.edu.ar

especies que no llegan a morir, son clasificadas como tolerantes; ellas se caracterizan por presentar ese tipo de efectos indirectos (o secundarios) que generalmente no se pueden evaluar mediante bioensayos de laboratorio, no letales, [2] pero de una mayor implicación ecológica.

En este mismo grupo de efectos, están aquellos que pueden tener otras consecuencias adversas adicionales, también indirectas, cuando por diversas razones se ven afectadas las poblaciones o comunidades de productores o consumidores [3]. Finalmente, a largo plazo, las consecuencias podrán apreciarse en otros niveles superiores de organización (población, comunidad, ecosistema).

#### *Biomarcadores de toxicidad.*

Los cambios indirectos debido a la exposición a xenobióticos se pueden evaluar cuantitativamente mediante biomarcadores. El término biomarcador se refiere a cambios particulares (bioquímicos, fisiológicos, histológicos, etc.), no letales, observables o cuantificables, que revelan la exposición presente o pasada de los organismos a xenobióticos, esto es, desde el nivel de organización molecular y celular en adelante [4-7]. Entre ellos, los comportamentales constituyen un grupo de indicadores subletales de especial interés en estudios de ecotoxicología acuática, caracterizados por su sensibilidad.

El comportamiento juega un papel fundamental en los procesos de adaptación. Muchas respuestas etológicas se manifiestan inmediatamente después del contacto con el contaminante, por lo que se los considera como biomarcadores precoces de exposición.

A los efectos de legitimar la información, es importante determinar previamente el perfil de la actividad o nivel basal de los parámetros biomarcadores seleccionados para evaluar, en una etapa posterior, los cambios ocurridos en ellos debido a las condiciones toxicológicas adversas del medio estudiado.

En lo referente al estudio de los parámetros natatorios “normales” de especies de la ictiofauna pampeana pueden citarse los trabajos de Trenti y col., [8] y de Gómez y Ferriz [9] quienes se ocuparon de la capacidad de natación, evaluándola en términos de su velocidad de natación. A ellos se agregan los nuestros, referidos a otras variables tales como la actividad natatoria y la ubicación espacial en condiciones de laboratorio [10,11].

Entre los vertebrados, los peces responden al estrés ambiental por medio de diferentes mecanismos compensatorios [12-14]. De ellos, son importantes varios cambios etológicos tales como la actividad natatoria total [6,15-17], velocidad de natación, ubicación espacial, performance natatoria [18,19], movimientos ventilatorios bucales y operculares [20,21]. Todos esos cambios conllevan un importante costo energético [22]. Además, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio mostraron que la exposición subletal al Cd producía una severa alteración en la función digestiva de *C. carpio*, con una significativa reducción de la ingesta y de la producción de heces [23,24].

#### *Toxicidad del Cadmio.*

El cadmio (Cd) es un metal pesado que ha adquirido una gran importancia toxicológica y ecotoxicológica [25]; es un elemento tóxico, cancerígeno, que a muy bajas dosis afecta mecanismos y funciones fundamentales de diferentes especies, incluidos los humanos, siendo los órganos diana más importantes el hígado y el

riñón. La actividad antrópica libera el metal de sus depósitos naturales insolubles distribuyéndolo en los diferentes compartimentos ambientales -aire, tierra, agua- siendo el último, el sitio más importante del depósito final de sus diferentes formas solubles [26]. Esta dinámica ambiental del metal conlleva la exposición crónica de los organismos, con impactos tanto a escala individual como poblacional, como consecuencia de los procesos de bioacumulación. Por ello, sus efectos son variados, desde los que ocurren a nivel suborgánsmico hasta aquellos que se pueden manifestar como alteraciones en el ecosistema [27]. En los peces, las branquias y el hígado son los principales órganos diana del metal [28].

El Cd es un contaminante que se halla “normalmente” en las masas de agua pampásicas, a veces en concentraciones superiores a los niveles guía determinados por la legislación vigente [29,30].

En este trabajo se informa acerca de los cambios provocados por dicho elemento en algunos biomarcadores conductuales de dos especies de teleósteos, una de ellas exótica introducida en los ecosistemas pampásicos (*Cyprinus carpio*) y la otra nativa (*Astyanax fasciatus*).

## **Material y métodos.**

#### *Equipo experimental*

Se utilizó un equipo descrito previamente [10] basado en el de Shirer y colaboradores [31]; el mismo está constituido por un conjunto de acuarios de vidrio en cuyo exterior se han fijado sensores infrarrojos, que emiten señales que permiten el registro de la ubicación espacial de los peces con una frecuencia de 1 seg<sup>-1</sup> mediante coordenadas. La información es almacenada en un ordenador dotado de un sistema de adquisición de datos y recogida en un software desarrollado especialmente.

#### *Períodos experimentales*

Las condiciones ambientales fueron constantes en todas las fases experimentales. El fotoperíodo se fijó en 12D:12N, la temperatura en 22,2°C y la aireación fue permanente. El flujo de los diferentes medios fue continuo (flow through) a una velocidad de 12-15 ml. min<sup>-1</sup>, regulado mediante una bomba peristáltica multicanal; la renovación completa del contenido de cada acuario ocurrió cada 24 hr.

Los animales recibieron alimento para peces (Tetra AniMin) de la siguiente composición: proteína cruda: 30 %; lípidos: 4 %; fibras: 5 %; humedad: 10 %, cenizas: 12 %.

Al iniciar los experimentos se pesaron los animales. Cada ensayo estuvo integrado por tres períodos sucesivos que transcurrieron en el mismo acuario: a) Aclimatación en agua potable (AP), b) Control en AP y c) Exposición, en la que el AP fue reemplazada por una solución de Cl<sub>2</sub>Cd en AP; la concentración total de Cd<sup>+2</sup> fue de 0.30-0.35 mg.L<sup>-1</sup>. El primer período tuvo una duración de 7 días (en el que no se realizaron registros de la actividad natatoria) mientras que cada uno de los dos subsiguientes se prolongó durante 4 días.

Los peces se alimentaron diariamente, ad libitum durante el período de aclimatación, mientras que en los otros dos se les ofreció una cantidad de alimento equivalente al 2 % del peso corporal. No se registró mortalidad en ningún caso.

### Métodos químico-analíticos.

En cada período se tomaron muestras diarias de los medios en cada acuario; en ellas se determinaron los siguientes parámetros: oxígeno disuelto (OD), dureza, pH, temperatura y concentración de Cadmio; en este último caso las muestras se acidificaron con HNO<sub>3</sub> (pH = 2). El OD se midió mediante la técnica de Winkler, la dureza total con un kit de reactivos Merck (108039) y el pH en un aparato digital Orion modelo 701 A. La concentración de Cd<sup>2+</sup> total se determinó por espectrometría de absorción atómica en un equipo Instrumentation Laboratory Modelo 457, a 228,8 nm.

### Organismos prueba.

Los bioensayos se llevaron a cabo con ejemplares juveniles de *Cyprinus carpio* (3,0 - 4,0 g) (N=9) y *Astyanax fasciatus* (1,0 -1,5 g) (N=9), sin exposición previa a contaminantes.

### Parámetros etológicos.

Se hicieron muestreos diarios de 4 hr continuas en cada acuario. Las señales registradas permitieron determinar para cada individuo los siguientes parámetros:

- a) la actividad natatoria total, como Índice de Actividad Relativa (Ia) [10]: cuando Ia=1 la actividad del pez es normal; cuando Ia es mayor o menor a 1, habrá disminuido o aumentado la actividad.

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

donde i = día de experimentación.

- b) la preferencia altitudinal, como frecuencia de veces que el animal fue registrado en cada una de 4 franjas horizontales de 4 cm de espesor (determinadas arbitrariamente en los acuarios), e identificadas, desde la superficie al fondo, como A, B, C y D respectivamente.
- c) la preferencia lateral, como frecuencia de veces en que el pez fue registrado en cada una de 5 franjas verticales, de 8 cm de ancho (en que se dividieron arbitrariamente los acuarios); el goteo de los medios (AP o AP + Cd) ocurrió cerca de la superficie de los acuarios, a la altura de la franja vertical 1.

### Expresión de los resultados. Métodos estadísticos.

Los resultados se expresaron como medias (para el Índice de Actividad Relativa) o como porcentaje de veces en que cada pez fue detectado en cada franja horizontal o vertical de los cuatro registros efectuados cada día ± ESM. La comparación de los resultados entre pares de grupos se realizó mediante el test de t para muestras apareadas y ANOVA de un factor (p < 0,05); se utilizó el software estadístico INSTAT.

## Resultados.

### Parámetros fisicoquímicos.

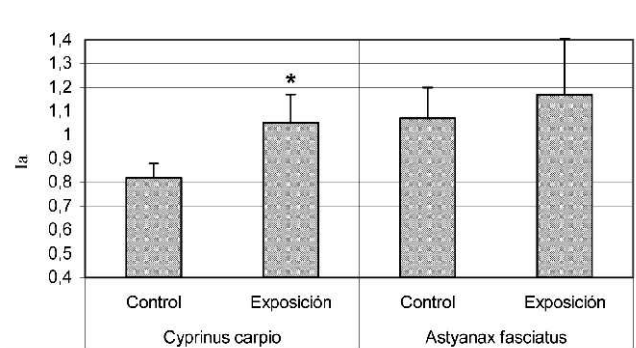
Los resultados conjuntos de todas las mediciones efectuadas (medias ± ESM) fueron los siguientes: pH, 8,41 ± 0,30 (n=140); OD (mg.L<sup>-1</sup>),

8,25 ± 0,46 (n=125); dureza (mM CaCO<sub>3</sub>), 0,76 ± 0,13; Cd<sup>2+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>), 0,33 ± 0,05 (n=126). Las concentraciones de cadmio en el agua potable (período control) fueron menores que los límites de detección del método (0,005 mg.L<sup>-1</sup>). Se aprecia que el perfil fisicoquímico de los medios se mantuvo estable por lo que los efectos registrados sólo son atribuibles al tóxico ensayado.

### Parámetros etológicos.

Actividad natatoria total (Figura 1).

Los cambios ocurridos en los índices Ia muestran que el metal provocó reducciones significativas en la actividad natatoria total en *Cyprinus carpio* (p<0,001). En cambio, en *Astyanax fasciatus*, el metal no lo alteró significativamente, si bien la tendencia fue comparable a lo observado en *C. carpio*.



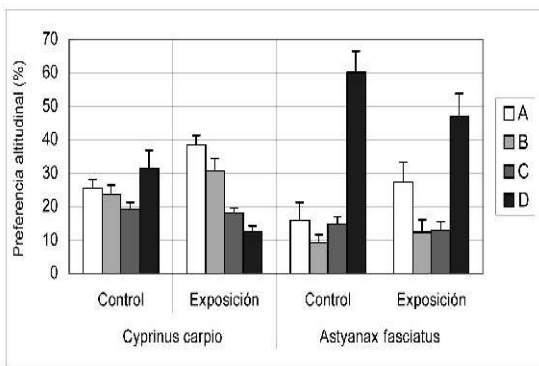
**Figura 1:** Actividad natatoria total [expresada como Índice de actividad relativa (Ia)] de juveniles de *Cyprinus carpio* (n=9) y *Astyanax fasciatus* (n=9) mantenidos sucesivamente durante 4 días en AP (Control) y en soluciones de Cd<sup>2+</sup> (Exposición). Datos como medias de los registros diarios ± ESM. El \* indica diferencias significativas (p<0,001).

Preferencia altitudinal (Figura 2).

En el período control, la distribución de *C. carpio* fue uniforme en las 4 capas, mientras que *A. fasciatus* se ubicó preferentemente en el fondo de los acuarios. Estas distribuciones se vieron afectadas por el Cd<sup>2+</sup>; en *C. carpio* se registró un desplazamiento en su preferencia hacia las dos capas superiores mientras que *A. fasciatus* se distribuyó entre las dos capas extremas (A y D) que en su conjunto representan casi el 75% de las frecuencias.

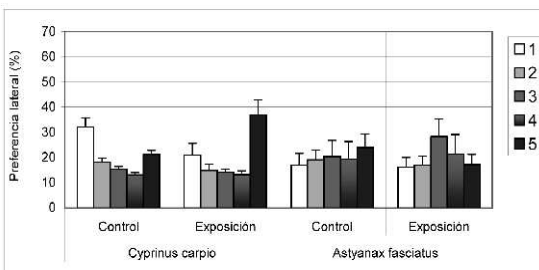
Preferencia lateral (Figura 3).

En el período control la distribución de *C. carpio* se caracterizó por una frecuencia de preferencia significativa en la franja 1; este perfil no se halló en *A. fasciatus* donde su distribución fue uniforme en todas las franjas. Cuando los peces fueron expuestos al metal, *C. carpio* se desplazó significativamente al extremo opuesto del sitio de goteo (franja 5); *A. fasciatus*, en cambio, mostró sólo una tendencia a permanecer en la franja intermedia (franja 3).



C. carpio Control					C. carpio Exposición					A. fasciatus Control					A. fasciatus Exposición				
A	B	C	D		A	B	C	D		A	B	C	D		A	B	C	D	
A		ns	ns	ns	A		ns	s	s	A		ns	ns	s	A		ns	ns	s
B			ns	ns	B			s	s	B			ns	s	B			ns	s
C				ns	C				s	C				s	C				s
D					D					D					D				

**Figura 2:** Preferencia altitudinal de juveniles de *Cyprinus carpio* (n=9) y de *Astyanax fasciatus* (n=9) mantenidos sucesivamente durante 4 días en AP (Control) y en soluciones de Cd<sup>2+</sup> (Exposición). Las letras indican franjas horizontales arbitrarias, A: franja superior, D: franja inferior. Datos como frecuencias medias de los registros diarios (en %) ± ESM. Las tablas indican diferencias significativas (p<0,05) entre las distintas franjas de cada periodo experimental.



C. carpio Control						C. carpio Exposición						A. fasciatus Control						A. fasciatus Exposición					
1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
1		s	s	s		1		ns	ns	ns	n	1		ns	ns	ns	n	1		ns	ns	ns	n
2			ns	ns	n	2			ns	ns	s	2			ns	ns	n	2			ns	ns	ns
3				ns	n	3				ns	s	3				ns	n	3				ns	ns
4					n	4					s	4					n	4					ns
5						5						5						5					

**Figura 3:** Preferencia lateral de juveniles de *Cyprinus carpio* (n=9) y de *Astyanax fasciatus* (n=9) mantenidos sucesivamente durante 4 días en AP (Control) y en soluciones de Cd<sup>2+</sup> (Exposición). Los números indican franjas verticales arbitrarias, 1: franja sobre la que gotean los medios, 5: franja más alejada. Datos como frecuencias medias de los registros diarios (en %) ± ESM. Las tablas indican las diferencias significativas (p<0,05) entre las distintas franjas de cada periodo experimental.

**Discusión**

Se presentan los resultados experimentales obtenidos mediante un dispositivo que permite estudiar simultáneamente diferentes aspectos del comportamiento natatorio de *Cyprinus carpio* y *Astyanax*

*fasciatus*, mediante una técnica original no invasiva; el diseño utilizado presenta, además, la ventaja de que se lleva a cabo exponiendo sucesivamente a un mismo individuo a dos diferentes condiciones ambientales (en nuestro caso agua potable y cadmio); de esa manera, cada individuo es control de sí mismo para los diferentes parámetros cuantificados.

La actividad natatoria total (Figura 1) resultó reducida para ambas especies siendo más marcado el efecto en las carpas. También se observaron cambios en la preferencia altitudinal de los animales (Figura 2): los resultados sugieren que los juveniles de *C. carpio* serían más sensibles al Cd que los de *A. fasciatus*, lo que podría ser interpretado como un carácter diferencial entre ambas especies; esto puede atribuirse a una sensibilidad diferencial de las estructuras sensoriales periféricas de los peces. Este resultado muestra cómo la presencia de un solo contaminante en el mismo ambiente compartido por varias especies podría provocar, efectos diferenciados, ilustrando la importancia ecotoxicológica predictiva de este tipo de información.

En relación con lo anterior, Espina et al. [32,33], estudiaron el efecto de concentraciones comparables de Cd sobre juveniles de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* brindando evidencias que podrían permitir una interpretación de los cambios en las preferencias altitudinales como efectos secundarios de eventos fisiológico-morfológicos asociados a una mayor demanda de O<sub>2</sub> por deterioro en los mecanismos de captación del mismo.

En lo referente a la preferencia lateral (Figura 3) lo más destacado fue que los animales mostraron una tendencia por evitar la franja del acuario en la cual se producía el goteo de la solución de Cd; este comportamiento fue más marcado en el caso de *C. carpio*. Hay evidencias de que esta respuesta podría ser de diferente magnitud según el metal presente en el medio y que involucraría al sistema olfativo de los peces [34].

Es interesante puntualizar que los cambios señalados se registraron inmediatamente después del inicio de exposición al metal, indicando que la técnica utilizada permite cuantificar, de manera no invasiva y temprana, la calidad toxicológica del medio acuático.

El análisis de la actividad natatoria de los peces en cautiverio es dificultosa por la gran variabilidad individual de las respuestas, aún en los periodos control; varios autores han advertido acerca de esto, aconsejando evitar el análisis de la información sobre la base de registros individuales [35,36]. Por ello, es importante destacar que en el protocolo utilizado por nosotros cada individuo es control de sí mismo y la expresión numérica de los resultados se realiza mediante índices relativos o porcentajes que permiten estandarizar los resultados evitando que sean afectados por esa variabilidad.

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, determinados para la protección de la biota acuática. En el caso particular del Cd es importante considerar, además de su concentración total, la dureza de los medios en los que se mide, ya que ese parámetro es uno de los atributos químicos críticos que modulan la toxicidad aguda y crónica del metal para los peces [37]. Por esa razón, los diferentes niveles guía que se exigen para la protección de la biota de agua dulce son variables.

Es importante señalar, por otra parte, que la toxicidad aguda del Cd para los peces, expresada como CL<sub>50</sub>, presenta valores

extremadamente variables -a veces con diferencias de varios órdenes de magnitud- para una misma especie, además de otras condiciones determinantes de la toxicidad (edad, estadio de desarrollo, sexo) [38,39].

La concentración en nuestros ensayos fue subletal pues no provocó la muerte de ningún individuo de las dos especies; sin embargo los resultados indican que tras permanecer 4 días en medios conteniendo aproximadamente 330 µg Cd.L<sup>-1</sup> los peces evidenciaron disturbios, en grado variable, en su actividad natatoria y en su distribución espacial.

Finalmente, los resultados alcanzados permiten afirmar que el Cd es un estresante ambiental que en las condiciones de nuestros ensayos muestra producir impactos adversos sobre la conducta natatoria de las especies estudiadas. Esta conclusión debe ser evaluada en el contexto de la realidad ecotoxicológica de los ambientes acuáticos pampeanos en muchos de los cuales las concentraciones de metales en general y del Cd en particular pueden hallarse en niveles comparables a las utilizadas en este estudio, superiores a los niveles guía de máximos permitidos por la legislación nacional e internacional para la protección de la biota acuática superficial.

**Agradecimientos.** Este trabajo corresponde a los Proyectos CDD-DCB (UNLu) 252/03 y 308/03 (Programa de Incentivos). Se contó con el apoyo económico del Departamento de Ciencias Básicas (DCB), Universidad Nacional de Luján (UNLu), de la CIC Pcia. de Buenos Aires (Subsidio para Investigadores) y de la Fundación Alberto J. Roemmers. Se agradece la colaboración del Sr. Raúl Pérez (CIDEPINT-CIC) en los análisis químicos.

## Bibliografía

1. Rand GM (1995) Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, Washington DC. pp 1125
2. Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RN (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 317: 207-233
3. Scott GR, Sloman KA (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 68: 369-392
4. Boudou A, Ribeyre F (1997) Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Persp* 105 (Suppl. 1): 21-35
5. Lagadic, L.; T. Caquet; J-C. Amiard and F. Ramade (eds) (1997) Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, París. pp 419
6. Cohn J, MacPhail RC (1996) Ethological and experimental approaches to behaviour analysis: implications for ecotoxicology. *Environ Health Persp* 104 (Suppl 2): 299-305
7. Porta A (1996) Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 30: 67-79
8. Trenti PS, Gómez SE, Ferriz RA (1999) Capacidad de natación en tres peces pampásicos. *APRONA* 13: 2-9
9. Gómez SE, Ferriz RA (2002) Capacidad de natación en *Poecilia reticulata* (Pisces: Cyprinodontiformes). *Rev Mus Argentino Cienc Nat, Nueva Serie* 4: 181-185
10. Eissa BL, Salibián A, Ferrari L, Porta P, Borgnia M (2003) Evaluación toxicológica no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus carpio*. *Biología Acuática* N° 20: 56-62
11. Eissa BL, Salibián A, Ferrari L, Borgnia M (2005) Estudios sobre los efectos etológicos del Cadmio. *Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers* 16: 435-443
12. Beitinger TL (1990) Behavioural reactions for the assessment of stress in fishes. *J Great Lakes Res* 16: 495-528
13. Wandelar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Revs* 77: 591-625
14. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149
15. Doving KB (1991) Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental toxicity. *Comp Biochem Physiol* 100 C: 247-252
16. Giattina JD, Garton RR (1983) A review of the preference-avoidance responses of fishes to aquatic contaminants. *Residue Revs* 87: 43-90
17. Drummond RA, Russom CL (1999) Behavioural toxicity syndromes: a promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ Toxicol Chem* 9: 37-46
18. Beitinger TL, McCauley WR (1990) Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes. *J Great Lakes Res* 16: 542-575
19. Little EE, Finger SE (1990) Swimming behaviour as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ Toxicol Chem* 9: 13-19
20. Gerhardt A, Janssens de Bisthoven L, Mo Z, Wang C, Yang M, Wang A (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. *Chemosphere* 47: 35-47
21. Shedd TR, van der Schalle WH, Widder MW, Burton DT, Burrows EP (2001) Long-term operation of an automated fish biomonitoring system for continuous effluent acute toxicity surveillance. *Bull Environ Contam Toxicol* 66: 392-399
22. 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
23. Muscatello J, Salibián A, Ferrari L, Eissa BL (2000) Efectos del cadmio sobre el balance alimentario de *Cyprinus carpio* en cautiverio. *Resumen VII Jorn Cs Nat Litoral (Santa Fe, Argentina)*: 125
24. Ferrari L, Salibián A, Muscatello J, Eissa BL (2002) Biomarcadores fisiológicos de exposición aguda al Cadmio: alteraciones en la función digestiva de peces. *Acta Toxicol Argent* 10: 52
25. WHO (World Health Organization) (1992) Cadmium. Environmental Aspects. *Environmental Health Criteria Series* N° 135. Geneva. pp 156
26. López-Artíguez M, Repetto M (1995) Estado actual de la

- toxicología del Cadmio. En: Repetto M (Editor), Toxicología Avanzada. Ediciones Díaz de Santos, Madrid. pp 393-423.
27. Nriagu, JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139
  28. 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
  29. Salibián A (2004) El Cadmio en el medio acuático. En: Malacalza, L. (Editor): *Ecología y Ambiente*. Luján (Buenos Aires). pp 135-139
  30. Salibián A (2006) Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. En: Ware GW (editor) *Rev Environ Contam Toxicol*. 185: 35-65
  31. Shirer H, Cairns J, Waller W (1968) A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. *Water Res Bull* 4: 27-43
  32. Espina S, Salibián A, Rosas C, Sánchez A, Alcaraz G (1998) Acute physiological responses of grass carp *Ctenopharyngodon idella* fingerlings to sublethal concentrations of cadmium. *Acta ToxicolArg* 3: 8-10
  33. 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: 1-10
  34. Svecevicus G (1999) Fish avoidance response to heavy metals and their mixtures. *Acta Zool Lituania Hydrobiologia* 9: 103-113
  35. Kolok AS, Plaisance EP, Abdelghani A (1998) Individual variation in the swimming performance of fished: an overlooked source of variation in toxicity studies. *Environ Toxicol Chem* 17: 282-285
  36. Kolok AS (1999) Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and a brief review of the recent fish literature. *Canad J Fish Aquat Sci* 56: 700-710
  37. Newman MC, Unger MA (2003) *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Ratón. FL. pp 458.
  38. US Environmental Protection Agency (1985) Ambient water quality criteria for Cadmium. EPA-440/5-84-032. National Technical Information Service, Virginia. pp 127.
  39. US Environmental Protection Agency (2001) Update of ambient water quality criteria for Cadmium. EPA-822-R-01-001. Office of Water, Washington DC. pp 268.