

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA NO INVASIVA DEL CADMIO: MODIFICACIONES DE BIOMARCADORES CONDUCTUALES EN *CYPRINUS CARPIO*.

Bettina L. EISSA¹, Alfredo SALIBIAN^{1,2}, Lucrecia FERRARI^{1,2}, Paulo PORTA³ y Mariela BORGNA¹.

¹Programa de Ecofisiología Aplicada, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, (B6700ZBA)-Luján; prodea@mail.unlu.edu.ar. ²Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires, (B1900)-La Plata. ³Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Haedo, (B1706 EAH)-Haedo

Palabras clave.

biomarcadores conductuales * comportamiento * actividad natatoria * *Cyprinus carpio* * Cadmio subletal.

Keywords.

Behavior biomarkers * behavior * swimming activity * *Cyprinus carpio* * sublethal Cadmium.

Resumen.

Se describe un dispositivo que permite evaluar simultáneamente varios parámetros conductuales de peces en cautiverio. Se informan los resultados preliminares alcanzados al exponer juveniles (3 - 4 g) de la carpa común (*Cyprinus carpio*) a dos soluciones subletales de Cd^{2+} (0.3 y 0.5 mg/L), determinándose los cambios en su actividad natatoria (expresada cuantitativamente mediante un *Índice de actividad relativa, I_a*) y en sus preferencias altitudinal y lateral en los acuarios. La *actividad natatoria total* se redujo significativamente a la concentración más elevada del metal, retornando a los niveles basales registrados en el período Control luego de transferir los peces a medio sin el metal. La *preferencia altitudinal*, resultó modificada, encontrándose que los peces expuestos al metal se hallaban la mayor cantidad de tiempo en la capa superior de los acuarios. En cuanto a la *preferencia lateral* el resultado más importante fue la evidencia de que los mismos peces evitaban la sección correspondiente al sitio de goteo de la solución de Cadmio, sin hallarse un patrón particular de distribución en el resto de las secciones de los acuarios. Los cambios en la actividad natatoria total y en la preferencia altitudinal de los peces fueron reversibles; en cambio, la alteración en la preferencia lateral no se modificó luego del reemplazo de las soluciones de Cd por medios limpios.

Abstract. Non-invasive toxicological assessment of Cadmium: alterations in behavior biomarkers in *Cyprinus carpio*.

An experimental device that allowed the simultaneous evaluation of several ethological parameters of fish in captivity was described. The effects of two sublethal solutions of Cd^{2+} (0.3 and 0.5 mg/L) on the swimming activity (expressed quantitatively by means of an *Index of relative activity, I_a*) and on the altitudinal and lateral preferences of juvenile (3 – 4 g) fish (common carp, *Cyprinus carpio*) in captivity were reported. The *total swimming activity* was significantly reduced at the highest concentration of the metal; afterwards, when fish were transferred to media without the toxic, it returned down to basal values

registered in the Control period. The *altitudinal preference* was modified: fish were most of time in the surface layer of the aquarium. As for the *lateral preference* the most important result was the evidence that the fish avoided the section of the aquarium where Cadmium solutions were dripping, without a particular pattern of distribution in the rest of the aquarium. The changes in the swimming activity and in the altitudinal preference of fish were reversible; on the contrary, changes in the lateral preference remained after replacement of the Cd solutions by clean media.

INTRODUCCIÓN.

El cadmio (Cd) es un metal pesado que ha adquirido una gran importancia toxicológica y ecotoxicológica (WHO, 1992). Ello está asociado al hecho de que la actividad antrópica lo remueve 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 (Nriagu y Pacyna, 1988). Esta dinámica ambiental del metal conlleva la exposición crónica de los organismos, con consecuencias tanto a escala individual como poblacional, como consecuencia de los procesos de bioacumulación. Por ello, los impactos son variados, desde los que ocurren a nivel suborgánsmico hasta aquellos que se pueden manifestar como alteraciones en el ecosistema (Wright y Welbourn, 1994).

Toxicología del Cadmio.

Se conoce que el Cd es un elemento tóxico, cancerígeno, que en muy bajas cantidades afecta mecanismos y funciones fundamentales de diferentes especies, incluidos los humanos, siendo los órganos blanco más importantes el hígado y el riñón. A nivel celular la base de su acción tóxica radica en su interacción con fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina; otro aspecto de su toxicidad está vinculado a su interacción con los grupos -SH de macromoléculas y la generación de radicales libres.

Biomarcadores.

Los biomarcadores, constituyen una herramienta de evaluación de efecto tóxico muy útil en los estudios de evaluación de riesgo toxicológico y ecotoxicológico. El término biomarcador se refiere a cambios fisiológicos, bioquímicos, histológicos y comportamentales, entre otros, que se pueden detectar como consecuencia del contacto con los xenobióticos, desde el nivel de organización molecular y celular en adelante (Boudou y Ribeyre, 1997). Se reconocen tres principales tipos de biomarcadores: de exposición, de efecto y de susceptibilidad (Lagadic y col, 1997; Porta, 1996).

Los esfuerzos de los científicos se han orientado recientemente en dirección de la identificación de biomarcadores específicos y tempranos de exposición a contaminantes, siendo de particular y creciente interés lo referente a los marcadores de impactos sobre el comportamiento (Cohn y MacPhail, 1996). Las

alteraciones conductuales, aunque sean restringidas al nivel de los individuos, también pueden tener consecuencias sobre otros niveles de mayor complejidad. El comportamiento es una de las más importantes propiedades de la vida animal y juega un rol crítico en las adaptaciones biológicas; es el puente entre los aspectos moleculares y fisiológicos de la Biología y la Ecología y el nexo entre los organismos y el medio, entre el sistema nervioso y el ecosistema. Cabe señalar que muchas respuestas conductuales se manifiestan inmediatamente después de la exposición al contaminante, por lo que pueden considerarse como biomarcadores precoces de exposición.

Biomarcadores en especies acuáticas.

Los animales acuáticos, en particular, responden a los factores de estrés ambiental por medio de una variedad de mecanismos compensatorios (Wendelaar Bonga, 1997). Diversos estudios muestran los efectos de los xenobióticos sobre la actividad natatoria en los peces (Cohn y MacPhail, 1996; Doving, 1991; Giattina y Garton, 1983). La performance natatoria de los peces es una actividad de los individuos que ha sido utilizada como indicador de estrés subletal asociado a la exposición a sustancias químicas tóxicas (Beitinger y McCauley, 1990; Little y Finger, 1990).

Además, en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio se observó una alteración en el comportamiento alimentario de *Cyprinus carpio* expuestos a cadmio. El mismo se manifestó con una reducción en la ingesta y en la producción de heces (Muscatello et al, 2000).

La hipótesis básica de este trabajo es que los peces sometidos al estrés ambiental por exposición al Cd ven afectada su actividad natatoria. En relación con esta hipótesis, el Objetivo de este estudio preliminar fue describir un método original que permite estudiar la actividad natatoria de los peces en cautiverio. Se analizaron los cambios producidos por el Cadmio sobre la actividad total de los animales, registrando simultáneamente otros aspectos tales como su preferencia lateral y altitudinal en los acuarios. Además, se exploró la posibilidad de respuestas dependientes de la concentración del metal así como la reversibilidad de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Organismo prueba.

Los peces utilizados fueron juveniles de *Cyprinus carpio* de 3.0 - 4.0 gr de peso, obtenidos de un criadero privado de La Plata, sin exposición previa a contaminantes.

Diseño Experimental

Se utilizó un conjunto de 4 peceras en las que se acondicionaron los animales. El dispositivo se basó en el de Shirer et al (1968). El exterior de los acuarios tenía fijados sensores infrarrojos, que emiten señales que permiten el registro de la

ubicación espacial del pez mediante coordenadas. Las mismas fueron registradas con una frecuencia de una por segundo, en una computadora dotada de un sistema de adquisición de datos y recolectada en un *software* desarrollado especialmente. En la Figura 1 se presenta el esquema del dispositivo utilizado. Los datos fueron almacenados en una base para su posterior análisis.

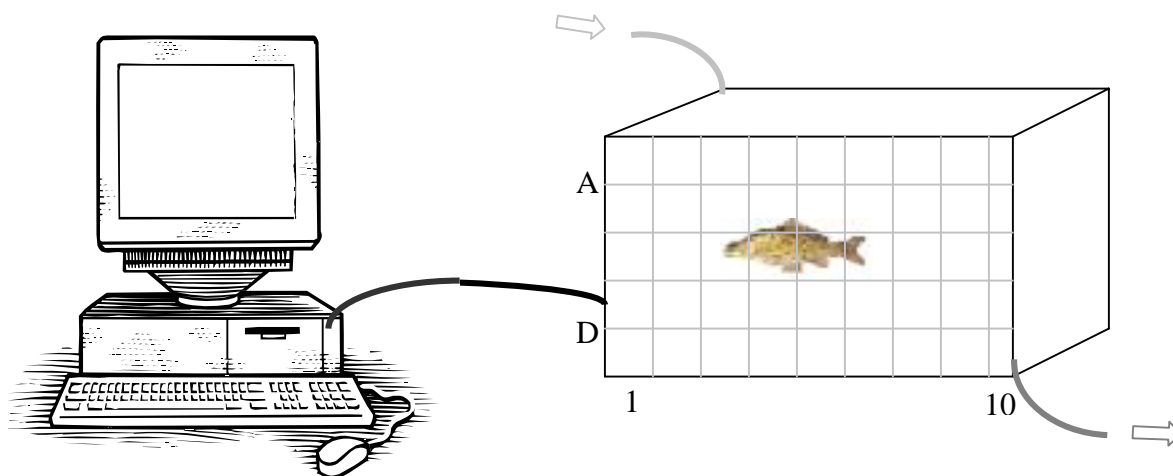


Figura 1. Esquema del dispositivo utilizado en los experimentos de este trabajo. Las flechas indican la dirección de los flujos de soluciones; A corresponde a la franja superficial y D a la más profunda; 1 es la sección en la que gotea las soluciones y 10 es la más alejada del sitio de goteo.

Períodos experimentales.

a) Aclimatación.

Se colocó un pez en cada pecera, conteniendo agua potable (AP), con aireación y flujo (10 ml/min) continuos durante un período de 7 días; el flujo fue regulado mediante una bomba peristáltica multicanal (Cole Palmer 7553-85). Durante este período los peces fueron alimentados diariamente *ad libitum* con alimento para peces (proteína cruda: 30%; lípidos: 4%; fibras: 5%; humedad: 10%, cenizas: 12%), el fotoperíodo se fijó en 12D:12N y la temperatura en 22 ± 1 °C. Estas condiciones se mantuvieron en los períodos experimentales subsiguientes.

b) Control.

Los animales permanecieron en AP.

c) Exposición.

El AP fue reemplazado por una solución de Cl_2Cd en AP (AP + Cd). Las concentraciones efectivas de Cd^{+2} utilizadas fueron de 0.3 y 0.5 mg/L.

d) Recuperación.

En esta etapa se reemplazaron las soluciones de Cadmio por AP.

Se efectuaron 6 ensayos, con 3 animales para cada concentración de Cd.

Todos los períodos tuvieron una duración de 4 días. Durante su transcurso se ofreció a los animales diariamente una cantidad de alimento equivalente al 2 % del peso corporal. Las peceras estuvieron aireadas en forma continua y los medios se renovaron cada 24 hr mediante el mismo sistema de *flow-through* indicado en (a).

En todos los casos se hicieron muestreos focales de 4 hr continuas por día (10 am a 2 pm); en ellos se registró la actividad natatoria, la preferencia altitudinal y la preferencia lateral. Diariamente se tomaron muestras de las soluciones para la medición de parámetros fisicoquímicos.

Métodos analíticos.

Los parámetros determinados fueron: oxígeno disuelto (OD), dureza, pH, temperatura y concentración de cadmio; en este último caso las muestras se acidificaron con NO_3H al 60% hasta $\text{pH} \leq 2$ y fueron conservadas refrigeradas hasta su medición.

El OD se determinó mediante un *kit* comercial (Merck 111107) basado en la técnica de Winkler, la dureza total con el *kit* Merck 108039 y el pH en un equipo Orion modelo 701 A. La concentración de Cd^{2+} se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica IL Modelo 457, a 228,8 nm con llama aire-acetileno.

Parámetros comportamentales evaluados.

La *actividad total* de cada pez se evaluó a partir de las señales obtenidas en las 4 horas diarias registradas. La misma se expresó como *Índice de Actividad Relativa* (I_a):

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

donde i = día de experimentación.

La *preferencia altitudinal* se evaluó determinando el porcentaje de las veces que el animal se encontró en cada uno de los 4 sectores horizontales de las peceras, de 4 cm de espesor (A, B, C y D, desde la superficie al fondo, respectivamente).

Para determinar la *preferencia lateral* se dividió el acuario en 10 franjas o secciones verticales, de 4 cm (de 1 al 10) cada una. La evaluación de este parámetro se efectuó calculando el porcentaje de veces que el pez fue detectado en cada una de esas secciones. El goteo de las soluciones (agua potable o agua potable con Cd) ocurrió a la altura de la sección 1.

Métodos estadísticos.

La comparación de los resultados entre pares de grupos experimentales se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Zar, 1999).

RESULTADOS.

Parámetros fisicoquímicos.

El OD osciló entre 6.7 - 8.6 mg/L, la dureza entre 0.75 y 0.85 mM CaCO₃ y el pH entre 8.4 - 8.8; la temperatura se mantuvo constante en 22 ± 1 °C. Las concentraciones de Cadmio (en mg/L) en los períodos Control y Recuperación fueron de <0.05, y en el de Exposición fue de 0.30-0.35 y de 0.45-0.50 respectivamente.

Índice de actividad relativa (*I_a*).

La actividad natatoria de los animales presentó una gran variabilidad cuantitativa interindividual. Por ello, para poder comparar perfiles de actividad de los diferentes individuos, diseñamos el *Índice de Actividad Relativa* que permite estandarizar los resultados sin condicionarlos a esa variabilidad.

El *Índice* se modificó de manera diferencial según la concentración del metal (Figura 2). Los peces expuestos a 0.3 mg/L Cd²⁺ no manifestaron cambios en la actividad total en ninguno de los tres períodos (Control vs. Exposición, p = 0.94; Control vs Recuperación, p = 0.74).

La exposición de las carpas en solución de 0.5 mg/L Cd²⁺, en cambio, modificó significativamente dicho *Índice* en la dirección de una importante reducción de su actividad total (Control vs. Exposición, p < 0.001); el cambio registrado fue reversible (Control vs Recuperación, p = 0.34; Exposición vs. Recuperación, p < 0.002).

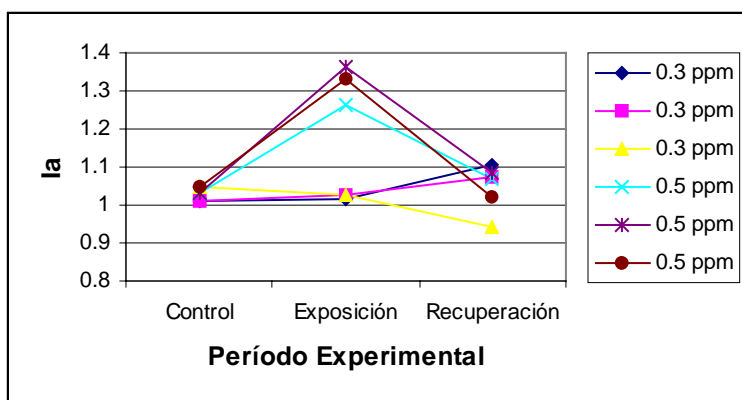


Figura 2. Índices de actividad relativa (*I_a*) de juveniles de *Cyprinus carpio* (n = 6) mantenidos durante 4 días sucesivamente en AP (Control), en dos soluciones de Cd²⁺ (Cadmio) y luego de ser transferidos a AP (Recuperación).

Preferencia altitudinal.

En este caso, la tendencia durante el período de Exposición al tóxico en ambas concentraciones, demostró estadísticamente, una preferencia de los peces por la capa superficial de la pecera (A). Su comportamiento en la fase Control fue irregular; durante la Recuperación los animales modificaron el patrón precedente asemejándose al del Control. En la Figura 3 se ilustra el caso de los peces expuestos a 0.5 mg/L Cd²⁺.

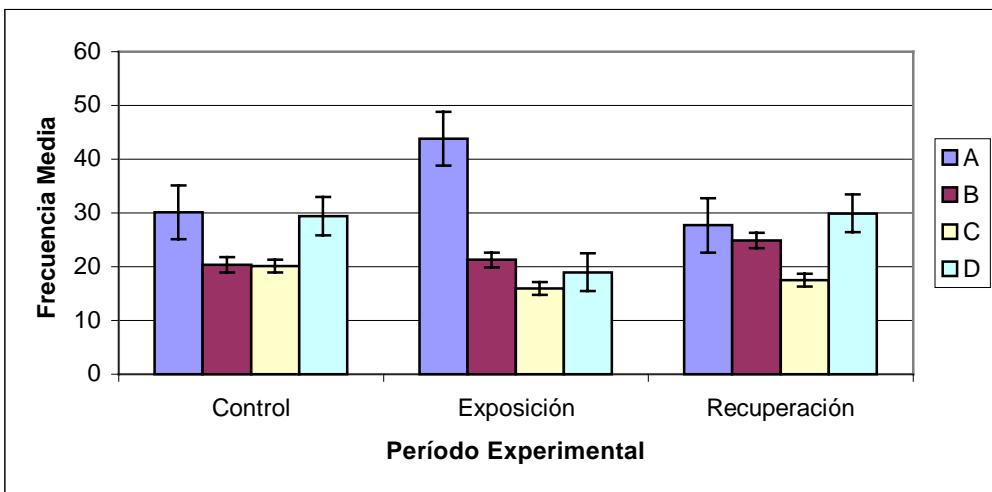


Figura 3. Preferencia altitudinal de juveniles de *Cyprinus carpio* (n = 3) mantenidos sucesivamente durante 4 días en AP (Control), en soluciones de 0.5 mg/L Cd²⁺ (Exposición) y luego de ser transferidos a AP (Recuperación). A: capa superficial, D: capa inferior. Datos como medias ± ESM.

Preferencia lateral.

Durante el período de Exposición los peces evitaron el sitio de goteo de la solución tóxica (Figura 1, sección 1). Al comparar los valores correspondientes a los extremos de las peceras se observa que esos animales permanecieron la mayor parte del tiempo en el extremo opuesto al sitio de goteo (en la sección 10), siendo la diferencia detectada altamente significativa. Por el contrario, el comportamiento de los peces en la etapas de Control fue comparable en ambos sitios; durante la Recuperación las carpas prefirieron permanecer en el sitio 10 (Figura 4).

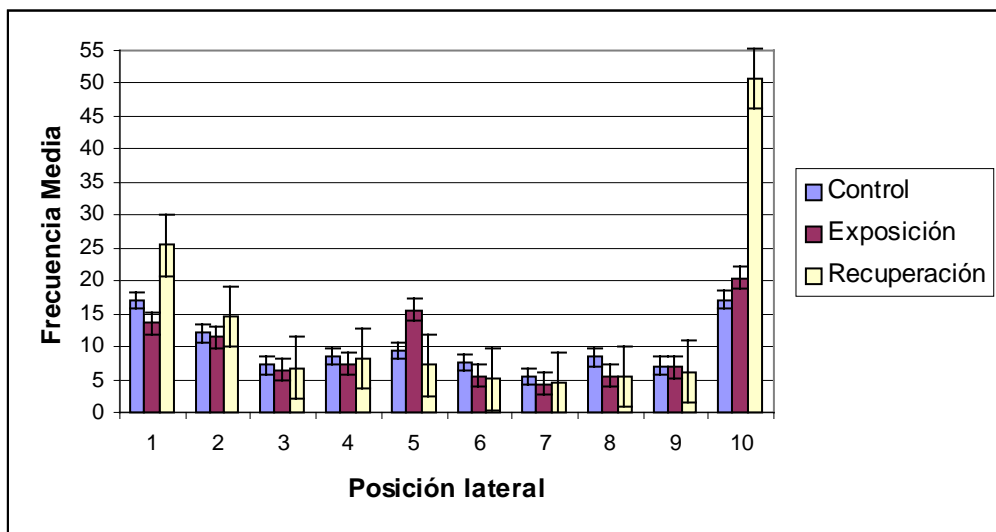


Figura 4. Preferencia lateral de juveniles de *Cyprinus carpio* (n = 3) mantenidos sucesivamente durante 4 días en AP (Control), en soluciones de 0.5 mg/L Cd²⁺ (Exposición) y luego de ser transferidos a AP (Recuperación). El punto 1 indica el sitio de goteo de las soluciones. Datos como medias ± ESM.

DISCUSIÓN.

Se presentan los resultados experimentales obtenidos en un dispositivo que permite analizar simultáneamente diferentes aspectos del comportamiento natatorio de formas juveniles de la carpa común (*Cyprinus carpio*), mediante una técnica original no invasiva; el diseño utilizado presenta, además, la ventaja de llevarse a cabo exponiendo a un mismo individuo a diferentes condiciones ambientales siendo, de esa manera, cada uno control de si mismo.

Según su duración, la actividad natatoria de los peces se clasifica en tres categorías: explosiva (< 20 seg), prolongada (entre 20 seg y 200 min) y sostenida (> 200 min) (Beamish, 1978); los resultados presentados en este trabajo se refieren a la segunda de dichas categorías.

Se conoce que la bioacumulación del Cd en solución puede ser influida por diversos factores ambientales como la temperatura y el perfil fisicoquímico del medio; ambos determinan la especiación del metal y de allí su biodisponibilidad y toxicidad (USEPA, 2001). A los efectos de descartar el efecto de variables como las mencionadas que pudieran afectar la *performance* natatoria de los peces, se utilizaron ejemplares de tamaño uniforme y se procuró mantener las condiciones del entorno fisicoquímico controladas dentro de límites estrechos; por la misma razón, el flujo de los diferentes medios experimentales también fue constante a lo largo de los experimentos.

Confirmando observaciones de otros autores (Kolok, 1999) hemos hallado, a pesar de que las variables más importantes estaban controladas, que la actividad natatoria mostró importantes variaciones interindividuales, atentando contra la posibilidad de analizar estadísticamente los resultados de grupos de peces sometidos a las mismas condiciones. Esta circunstancia pudo ser obviada mediante el *Indice de Actividad Relativa*.

Se demostró que la exposición prolongada a dos concentraciones subletales de Cd provocó alteraciones disímiles en la *actividad natatoria total* (Figura 2), la que se apreció significativamente reducida cuando la concentración fue mayor a 0.3 mg/L; cabe señalar que en este caso el cambio detectado en la actividad de las carpas fue reversible.

También se observaron cambios en la *preferencia altitudinal* de los animales (Figura 3): en el período Control los peces permanecieron mayormente en la superficie y el fondo del acuario. En el período de Exposición se manifestó una neta preferencia por permanecer en el sector más superficial del mismo. Posteriormente, en el período Recuperación, el patrón de distribución altitudinal también mostró ser reversible, adoptando uno similar al Control.

En lo referente a la *preferencia lateral* (Figura 4) lo mas destacado fue que los animales evitaron la franja de la pecera en la cual se producía el goteo de la solución de Cd. Llamativamente, este comportamiento no fue reversible, acentuándose notablemente en el período de Recuperación.

Se concluyó que el Cadmio es un estresante ambiental que tiene impactos adversos en la actividad natatoria de *C. carpio*, los que resultan concentración-dependientes; dos de los tres parámetros modificados por el metal fueron reversibles.

Estos resultados podrían interpretarse como consecuencia de eventos asociados a una mayor demanda de O₂ por deterioro en los mecanismos de captación del mismo (Espina y col., 2000).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Luján por el apoyo económico recibido. También a los profesionales de Ex-Cle S.A. quienes desarrollaron el software y a los Ing. Horacio García y Emiliano Pansechi por su asesoramiento.

BIBLIOGRAFÍA.

- Beamish, F. W. H. 1987. Swimming capacity. En: Fish Physiology, Vol. 7, Academic Press, New York. 101-187.
- Beitinger, T. L. 1990. Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. J. Great Lakes Res. 16 (4): 495-528.
- Beitinger, T. L. and W. R. McCauley, 1990. Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes. J. Great Lakes Res. 16: 542-575.
- Beyers, D. W., J. A. Rice, W.H. Clements, and C.J. Henry. 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.
- Boudou, A. and F. Ribeyre. 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. Environ. Health Perspect. 105 (Suppl. 1): 21-35.
- Cohn, J. and R.C. MacPhail. 1996. Ethological and experimental approaches to behavior analysis: implications for ecotoxicology. Environ. Health Persp. 104 (Suppl 2): 299-305.
- Doving, K. B. 1991. Assessment of animal behavior as a method to indicate environmental toxicity. Comp. Biochem. Physiol. 100C: 247-252.
- Espina, S., A. Salibián and F. Díaz. 2000. Influence of Cadmium on the respiratory function of the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Water, Air Soil Pollut. 119: 1-10.
- Giattina, J. D. and R.R. Garton. 1983. A review of the preference-avoidance responses of fishes to aquatic contaminants. Residue Revs 87: 43-90.
- Kolok, A. S: 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.
- Lagadic, L., T. Caquet, JC. Amiard and F. Ramade (eds), 1997. Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, París.
- Little, E. E. and S.E. Finger. 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9 : 13-19.
- Muscatello, J., A. Salibián, L. Ferrari y Eissa, BL. 2000. Efectos del cadmio sobre el balance alimentario de *Cyprinus carpio* en cautiverio. Resúmenes VII Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral (Santa Fe, Argentina): 125.
- Nriagu, J. O. and J.M. Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333: 134-139.

- Porta, A. 1996. Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.* 30:67-79.
- Shirer, H., J. Cairns and W. Waller. 1968. A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. *Water Res Bull* 4: 27-43.
- US Environmental Protection Agency, 2001. Update of ambient water quality criteria for Cadmium. U.S. EPA Office of Water, EPA-8222-R-01-001. Washington DC. 268 pp.
- Wandelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Revs.* 77: 591-625.
- WHO (World Health Organization), 1992. Cadmium. Environmental Aspects. Environmental Health Criteria Series N° 135. Geneva.
- Wright, D. A. and P.M. Welbourn. 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2: 187-214.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 663 + Apendices.
-