

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Doctorado en Ciencias Naturales

Pedro Carriquiriborde

Trabajo de Tesis

**Respuestas Biológicas a
Contaminantes Ambientales en Peces:**

**Estudio de la Bioconcentración, de los Efectos Letales y
Subletales y la Evaluación de Biomarcadores en**

Odontesthes bonariensis

**Expuesto a Diferentes Concentraciones de
Cadmio y Cromo en el Agua.**

Directores:

Dra. Alicia Estela Ronco

Dr. Fernando Noel Dulout

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente
(CIMA)

Facultad de Ciencias Exactas

(U.N.L.P.)

Contenidos

| | Página |
|--|--------|
| Resumen | ii |
| Capítulo I. Introducción. | 2 |
| I.a El desarrollo humano y los problemas ambientales: el papel de la contaminación. | 2 |
| I.b Vulnerabilidad de los sistemas acuáticos dulceacuícolas superficiales a la contaminación ambiental. | 5 |
| <i>I.b.1. Los sistemas acuáticos dulceacuícolas superficiales, estructura, funciones y servicios.</i> | 5 |
| <i>I.b.2. Los sistemas acuáticos y la contaminación ambiental: los metales pesados.</i> | 6 |
| <i>I.b.3. El cadmio en los sistemas acuáticos superficiales.</i> | 8 |
| <i>I.b.4. El cromo en los sistemas acuáticos superficiales.</i> | 10 |
| <i>I.b.5. Los peces como comunidad representativa de los ecosistemas acuáticos, recurso económico para el hombre y sensores de contaminación.</i> | 13 |
| <i>I.b.6. La ciencia en la generación de conocimiento sobre los mecanismos de acción y de herramientas de valuación de los efectos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos.</i> | 15 |
| Capítulo II. Hipótesis, Objetivos y Alcances. | 20 |
| Capítulo III. Las bases experimentales | 25 |
| III.a Los peces como modelo de estudio. El "pejerrey" la especie seleccionada. | 25 |
| III.b Enfoque Metodológico y la Estrategia Experimental | 33 |
| III.c Las Condiciones Experimentales | 40 |
| Capítulo IV. Cría y mantenimiento de <u><i>O. bonariensis</i></u> en condiciones de laboratorio | 44 |
| IV.a Antecedentes | 44 |

| | Página |
|--|-----------|
| IV.b Objetivos particulares | 45 |
| IV.c Diseño del las instalaciones para la cría del <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio. | 46 |
| <i>IV.c.1. Instalaciones preexistentes</i> | <i>46</i> |
| <i>IV.c.2. Consideraciones previas al diseño del sistema de cría</i> | <i>47</i> |
| <i>IV.c.3. Descripción del sistema de cría desarrollado</i> | <i>52</i> |
| <i>IV.c.4. Instalaciones accesorias</i> | <i>55</i> |
| <i>IV.c.5. Evaluación del funcionamiento del sistema de cría</i> | <i>57</i> |
| IV.d Condiciones de cría de <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio. | 58 |
| <i>IV.d.1. Obtención de los organismos</i> | <i>58</i> |
| <i>IV.d.2. Incubación</i> | <i>59</i> |
| <i>IV.d.3. Condiciones de cría y mantenimiento</i> | <i>59</i> |
| IV.e Respuesta de los peces a las condiciones de cría en el laboratorio | 65 |
| <i>IV.e.1. La obtención</i> | <i>65</i> |
| <i>IV.e.2. La eclosión</i> | <i>66</i> |
| <i>IV.e.3. La supervivencia</i> | <i>67</i> |
| <i>IV.e.4. El crecimiento</i> | <i>71</i> |
| <i>IV.e.5. La reproducción</i> | <i>75</i> |
| <i>IV.e.6. El estado sanitario</i> | <i>75</i> |
| IV.f Conclusiones y recomendaciones | 78 |
| IV.g Protocolo para la Cría de <u>O. bonariensis</u> en el Laboratorio | 80 |
| <i>IV.g.1. Obtención</i> | <i>81</i> |
| <i>IV.g.2. Incubación</i> | <i>81</i> |
| <i>IV.g.3. Fase 1</i> | <i>82</i> |
| <i>IV.g.4. Fase 2</i> | <i>82</i> |
| <i>IV.g.5. Fase 3</i> | <i>82</i> |
| <i>IV.g.6. Fase 4:</i> | <i>82</i> |
| <i>IV.g.7. Condiciones de laboratorio</i> | <i>83</i> |
| Capitulo V. Bioconcentración del Cd(II) y Cr(VI) en la branquia e hígado de <u>Odontesthes bonariensis</u>. | 86 |

| | Página |
|--|------------|
| V.a Introducción | 86 |
| V.a.1. Generalidades y definiciones | 86 |
| V.a.2. Factores que afectan la bioconcentración | 87 |
| V.a.3. Descripción biológica del proceso | 88 |
| V.a.4. Interpretación matemática del proceso de bioconcentración - Modelización | 90 |
| V.a.5. Antecedentes sobre la bioconcentración del Cd | 90 |
| V.a.6. Antecedentes sobre la bioconcentración del Cr | 92 |
| V.a.7. Niveles de bioconcentración de metales en los tejidos y su relación con efectos biológicos adversos. | 93 |
| V.b Objetivos particulares | 94 |
| V.c Materiales y métodos | 95 |
| V.c.1. Determinación de la concentración de Cd y Cr en el agua | 95 |
| V.c.1.1. Toma y preparación de las muestras | 95 |
| V.c.1.2. Determinaciones | 96 |
| V.c.2. Determinación de la concentración de Cd y Cr en los tejidos | 96 |
| V.c.2.1. Obtención de los tejidos | 96 |
| V.c.2.2. Secado | 97 |
| V.c.2.3. Digestión | 97 |
| V.c.2.4. Determinaciones | 98 |
| V.c.3. Reactivos, calibración, controles de calidad, cálculos y métodos estadísticos. | 98 |
| V.d Bioconcentración del Cd(II) | 101 |
| V.d.1. Concentración de Cd el agua de ensayo | 101 |
| V.d.2. Bioconcentración en la branquia | 102 |
| V.d.3. Bioconcentración en el hígado | 106 |
| V.d.4. Relación entre los niveles de Cd en la branquia y el hígado | 110 |
| V.e Bioconcentración del Cr(VI) | 112 |
| V.e.1. Niveles de Cr el agua de ensayo | 112 |
| V.e.2. Bioconcentración del Cr en la branquia | 113 |
| V.e.3. Bioconcentración en el hígado | 115 |
| V.e.4. Relación entre los niveles de Cr en la branquia y el hígado | 119 |

| | Página |
|--|--------|
| V.f Comparación entre los patrones de acumulación del Cd y del Cr en la branquia e hígado de <u>O. bonariensis</u>. | 120 |
| V.g Conclusiones particulares | 121 |
| Capítulo VI. Efectos Letales del Cd(II) y Cr(VI) sobre <u>Odontesthes bonariensis</u>. | 125 |
| VI.a Introducción | 125 |
| VI.b Objetivos particulares | 132 |
| VI.c Materiales y métodos | 132 |
| VI.c.1. Bioensayos de toxicidad aguda | 132 |
| VI.c.2. Reactivos, calibración, controles de calidad, cálculos y métodos estadísticos | 134 |
| VI.c.2.1. Agua de ensayo. | 134 |
| VI.c.2.2. Criterio de aceptación y cálculo de las LC50(t). | 134 |
| VI.c.2.3. Relación entre la toxicidad aguda y la dureza del agua – modelo empírico. | 134 |
| VI.c.2.4. Relación entre la toxicidad aguda y el tiempo de exposición – modelo mecanicístico. | 135 |
| VI.c.2.5. Análisis estadístico | 137 |
| VI.d Letalidad del Cd(II) | 138 |
| VI.d.1. Relación dosis respuesta: LC50(t) y pendientes de toxicidad. | 138 |
| VI.d.2. Insipiencia: CL50(¥). | 140 |
| VI.e Letalidad del Cr(VI) | 142 |
| VI.e.1. Relación dosis respuesta: LC50(t) y pendientes de toxicidad | 142 |
| VI.e.2. Insipiencia: CL50(¥). | 144 |
| VI.f Conclusiones particulares | 145 |
| Capítulo VII. Efectos Subletales: Respuesta de la Actividad Nucleolar | 149 |
| VII.a Introducción al capítulo | 149 |

| | Página |
|---|------------|
| VII.b Objetivos particulares | 159 |
| VII.c Materiales y métodos | 160 |
| VII.c.1. Toma de muestra y preparación del material para microscopía. | 160 |
| VII.c.2. Observaciones microscópicas, captura y análisis de imágenes. | 161 |
| VII.c.3. Selección de parámetros morfológicos, cálculos realizados y desarrollo de índices para evaluar la actividad nucleolar. | 162 |
| VII.c.4. Métodos estadísticos | 163 |
| VII.d Actividad Nucleolar Basal | 163 |
| VII.d.1. Actividad nucleolar basal en la branquia | 164 |
| VII.d.2. Actividad nucleolar basal en el hígado | 174 |
| VII.d.3. Resumen actividad nucleolar basal. | 184 |
| VII.e Respuesta de la actividad Nucleolar en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> frente al Cd(II). | 186 |
| VII.e.1. Efecto del Cd(II) sobre la actividad nucleolar en la branquia. | 186 |
| VII.e.1.1. Respuesta del VTP branquial | 187 |
| VII.e.1.2. Respuesta del NTP branquial | 192 |
| VII.e.2. Efecto del Cd(II) sobre la actividad nucleolar en el hígado. | 195 |
| VII.e.2.1. Respuesta del VTP hepático | 195 |
| VII.e.2.2. Respuesta del NTP hepático | 199 |
| VII.e.3. Relación entre la respuesta hallada en la actividad nucleolar branquial y hepática de <u>O. bonariensis</u> frente al Cd(II). | 202 |
| VII.f Respuesta de la actividad Nucleolar en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> frente al Cr(VI). | 203 |
| VII.f.1. Efecto del Cr(VI) sobre la actividad nucleolar en la branquia. | 204 |
| VII.f.1.1. Respuesta del VTP branquial | 204 |
| VII.f.1.2. Respuesta del NTP branquial | 207 |
| VII.f.2. Efecto del Cr(VI) sobre la actividad nucleolar en el hígado. | 209 |
| VII.f.2.1. Respuesta del VTP hepático | 209 |
| VII.f.2.2. Respuesta del NTP hepático | 212 |
| VII.f.3. Relación entre la respuesta hallada en la actividad nucleolar branquial y hepática de <u>O. bonariensis</u> frente al Cr(VI). | 214 |

| | Página |
|---|------------|
| VII.g Comparación entre la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> frente al Cd(II) y el Cr(VI). | 216 |
| VII.h Conclusiones particulares | 217 |
| Capítulo VIII. Discusión General | 224 |
| VIII.a Respuesta biológicas en <u>O. bonariensis</u> frente a la exposición a diferentes niveles de Cd(II) en el agua. | 224 |
| VIII.a.1. <i>La bioconcentración y los efectos letales agudos del Cd(II) y su relación con las características fisicoquímicas del agua.</i> | 224 |
| VIII.a.2. <i>Respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> frente a concentraciones subletales de Cd(II) y su relación con los niveles de acumulación del metal en los tejidos.</i> | 228 |
| VIII.a.3. <i>Implicancias ambientales de las respuestas observadas a nivel letal y subletal en <u>O. bonariensis</u> frente al Cd(II).</i> | 235 |
| VIII.b Respuesta biológicas en <u>O. bonariensis</u> frente a la exposición a diferentes niveles de Cr(VI) en el agua. | 238 |
| VIII.b.1. <i>La bioconcentración y los efectos letales agudos del Cr(VI) y su relación con las características fisicoquímicas del agua.</i> | 238 |
| VIII.b.2. <i>Respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> frente a concentraciones subletales de Cr y su relación con los niveles de acumulación del metal en los tejidos.</i> | 241 |
| VIII.b.3. <i>Implicancias ambientales de las respuestas observadas a nivel letal y subletal en <u>O. bonariensis</u> frente al Cr(VI).</i> | 243 |
| VIII.c Comparación entre los patrones de acumulación, la letalidad y la respuesta de la actividad nucleolar en <u>O. bonariensis</u> expuestos a Cd y el Cr. Posibles explicaciones según sus mecanismos de acción. | 248 |
| VIII.d Especulaciones sobre los posibles modos y mecanismos de acción del Cd y Cr en <u>O. bonariensis</u> en relación a los resultados obtenidos y el marco teórico vigente. | 252 |
| Capítulo IX. Conclusiones Generales | 256 |
| Capítulo X. Bibliografía | 259 |

Figuras

| | Página |
|--|---------------|
| Capítulo I | |
| Figura I.1. Diagrama PER. (OECD, 1998). | 4 |
| Capítulo III | |
| Figura III.1. Regiones ictiogeográficas de América Neotropical y probable distribución original y actual de las poblaciones de <u>O. bonariensis</u> en Sudamérica. | 27 |
| Figura III.2. Fotografía de un juvenil de pejerrey (<u>O. bonariensis</u>) de 6 meses de edad, como los utilizados para evaluar, en condiciones de laboratorio, efectos subletales de Cd y Cr sobre la especie. | 28 |
| Figura III.3. Diagrama conceptual planteado para la selección de las respuestas biológicas utilizadas para evaluar los efectos tóxicos del Cd y Cr sobre <u>O. bonariensis</u>. | 34 |
| Figura III.3. Diseño experimental general utilizado para la evaluación de respuestas biológicas al Cd y Cr en <u>O. bonariensis</u> | 38 |
| Figura III.5. Imagen del laboratorio durante la realización de un ensayo para determinar los efectos subletales del Cd y Cr en <u>O. bonariensis</u> | 41 |
| Capítulo IV | |
| Figura IV.1. Esquema de un sistema de cultivo cerrado completo. | 48 |
| Figura IV.2 Sistema de cultivo integrado diseñado para la cría y el mantenimiento de <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio durante todo su ciclo de vida. | 53 |
| Figura IV.3 Detalle de los tanques de cría mostrando los recipientes de 20L, las incubadoras y comederos automáticos utilizados para el cultivo de <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio. | 54 |
| Figura IV.4 Sistema integrado para la el cultivo externo de <u>Daphnia sp.</u> | 62 |
| Figura IV.5. Supervivencia de <u>O. bonariensis</u> en condiciones de laboratorio. | 67 |
| Figura IV.6. Ensayo de Supervivencia de <u>O. bonariensis</u> en Condiciones de Laboratorio. | 69 |
| Figura IV.7. Crecimiento de <u>O. bonariensis</u> en Condiciones de Laboratorio. | 72 |
| Figura IV.8 Resumen de las condiciones de cría empleadas y las curvas de supervivencia y crecimiento esperadas para las diferentes fases de cultivo de <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio. | 83 |
| Capítulo V | |
| Figura V.1. Variación de la concentración de Cd en el agua de ensayo entre los períodos de recambio. | 102 |
| Figura V.2. Acumulación del Cd en la branquia de <u>O. bonariensis</u> en función de la concentración del metal en el agua. | 103 |
| Figura V.3. Acumulación del Cd en la branquia de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 105 |
| Figura V.4. Acumulación del Cd en el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función de la concentración del metal en el agua. | 107 |
| Figura V.5. Acumulación del Cd en el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 108 |

| | Página |
|--|---------------|
| Figura V.6. Relación entre los niveles de Cd en el hígado y la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuestos durante 384 h a 10 mg Cd/L | 110 |
| Figura V.7. Variación de la concentración de Cr en el agua de ensayo entre los periodos de recambio | 112 |
| Figura V.8. Acumulación del Cr en la branquia de <u>O. bonariensis</u> en función de la concentración del metal en el agua. | 113 |
| Figura V.9. Acumulación del Cr en la branquia de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 114 |
| Figura V.10. Acumulación del Cr en el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función de la concentración del metal en el agua. | 116 |
| Figura V.11. Acumulación del Cr en el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 117 |
| Figura V.12. Relación entre los niveles de Cr en el hígado y la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuestos durante 384 h a 1000 mg Cr/L. | 119 |
| Capítulo VI | |
| Figura VI.1. Diagrama de la relación concentración-respuesta cuantil, base del método Probit. | 126 |
| Figura VI.2. Modelo de una caja utilizado para describir el proceso de bioacumulación en la branquia para luego derivar la relación entre los valores de LC50 y el tiempo de exposición. | 135 |
| Figura VI.3. Relación entre los valores estimados de LC50 del Cd(II) y la dureza del agua para <u>O. bonariensis</u> y su comportamiento respecto a la encontrada para otras especies de peces (EPA, 2000). | 140 |
| Figura VI.4. Relación entre los valores estimados de LC50 para el Cd(II) en <u>O. bonariensis</u> y el tiempo de exposición. | 141 |
| Figura VI.5. Relación entre los valores estimados de LC50 para el Cr(IV) y el tiempo de exposición en <u>O. bonariensis</u> | 144 |
| Capítulo VII | |
| Figura VII.1. Diagrama que resume el estado de conocimiento actual en relación a la biogénesis de los ribosomas y su vinculación con el nucleolo en una célula eucariota. | 153 |
| Figura VII.2. Diagrama del método utilizado para el recorrido de los preparados y la captura de las imágenes. | 161 |
| Figura VII.3. Determinación del área para cada nucleolo. | 161 |
| Figura VII.4. Diversidad de núcleos hallados en los preparados de branquia de <u>O. bonariensis</u> | 164 |
| Figura VII.5. Distribución de frecuencia de los valores de volumen nucleolar total y número de nucleolos por núcleo en las células del epitelio branquial de <u>O. bonariensis</u> | 165 |
| Figura VII.6. Determinación gráfica del número de núcleos a analizar para el estudio del Volumen Nucleolar Total y del Número de Nucleolos por núcleo en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 168 |
| Figura VII.7. Relación entre el número de nucleolos y el volumen nucleolar total por núcleo en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 169 |

| | Página |
|---|--------|
| Figura VII.8. Comportamiento de los valores de basales del VTP y NNP en el epitelio branquial de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de ensayo y del lote de organismos. | 171 |
| Figura VII.9. Relación entre el índice de condición y el VTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 173 |
| Figura VII.10. Diversidad de núcleos hallados en los preparados de hígado de <u>O. bonariensis</u> | 175 |
| Figura VII.11. Diferentes regiones observadas en los nucleolos de las células hepáticas resaltadas por diferentes tratamientos de las imágenes. | 175 |
| Figura VII.12. Distribución de frecuencia de los valores de volumen nucleolar total y número de nucleolos por núcleo en los hepatocitos de <u>O. bonariensis</u> | 176 |
| Figura VII.13. Determinación gráfica del número de núcleos a analizar para el estudio del Volumen Nucleolar Total y del Número de Nucleolos por núcleo en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 178 |
| Figura VII.14. Relación entre el número de nucleolos y el volumen nucleolar total por núcleo en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 179 |
| Figura VII.15. Comportamiento de los valores de VTP y NNP en el tejido hepático de <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de ensayo y del lote de organismos. | 180 |
| Figura VII.16. Relación entre el índice de condición (K) y los valores de VTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 182 |
| Figura VII.17. Respuesta del VTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cd(II). | 188 |
| Figura VII.18. Respuesta del NTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cd(II). | 193 |
| Figura VII.19. Respuesta del VTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cd(II). | 196 |
| Figura VII.20. Respuesta del NTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cd(II). | 200 |
| Figura VII.21. Respuesta del VTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI). | 204 |
| Figura VII.22. Respuesta del NTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI). | 207 |
| Figura VII.23. Respuesta del VTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI). | 210 |
| Figura VII.24. Respuesta del NTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI). | 213 |

Tablas

Página

Capítulo III

| | |
|--|-----------|
| Tabla III.1. Características químicas y físicas del agua corriente de La Plata utilizada para el cultivo de <u>O. bonariensis</u> y la realización de los ensayos de toxicidad. | 40 |
|--|-----------|

Capítulo VI

| | |
|---|-----------|
| Tabla IV.1. Porcentajes de eclosión de <u>O. bonariensis</u> (Lob99I y Cha02I y II) en el laboratorio. | 66 |
|---|-----------|

| | |
|--|-----------|
| Tabla IV.2. Parámetros de las curvas de supervivencia estimadas para <u>O. bonariensis</u> en el laboratorio. | 68 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Tabla IV.3. Parámetros de las curvas de crecimiento estimadas para <u>O. bonariensis</u> criado en condiciones de laboratorio. | 73 |
|---|-----------|

Capítulo V

| | |
|--|-----------|
| Tabla V.1. Características químicas del agua que condicionan la especiación química de los metales. | 87 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| Tabla V.2. Condiciones de operación del espectrofotómetro de absorción electrotérmica con horno de grafito, utilizadas para la determinación de Cd y Cr. | 97 |
|---|-----------|

| | |
|---|------------|
| Tabla V.3. Tasa de acumulación del Cd en la branquia de <u>O. bonariensis</u> y su relación con la concentración de Cd en el agua y el tiempo de exposición. | 104 |
|---|------------|

| | |
|--|------------|
| Tabla V.4. Modelización de la bioconcentración del Cd en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 106 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| Tabla V.5. Tasa de acumulación del Cd en el hígado de <u>O. bonariensis</u> y su relación con la concentración de Cd en el agua y el tiempo de exposición. | 107 |
|---|------------|

| | |
|--|------------|
| Tabla V.6. Modelización de la bioconcentración del Cd en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 109 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| Tabla V.7. Relación entre la concentración de Cd en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función de las concentraciones del metal en el agua y tiempos de exposición ensayados. | 111 |
|---|------------|

| | |
|--|------------|
| Tabla V.8. Modelización de la bioconcentración del Cr en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 115 |
|--|------------|

| | |
|--|------------|
| Tabla V.9. Modelización de la bioconcentración del Cr en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 118 |
|--|------------|

| | |
|--|------------|
| Tabla V.10. Relación entre la concentración de Cr en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función de las concentraciones del metal en el agua y tiempos de exposición ensayados. | 120 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| Tabla V.11. Concentraciones de Cd y Cr en la branquia y el hígado de <u>O. bonariensis</u> en función de los niveles de los metales en el agua y los tiempos de exposición | 122 |
|---|------------|

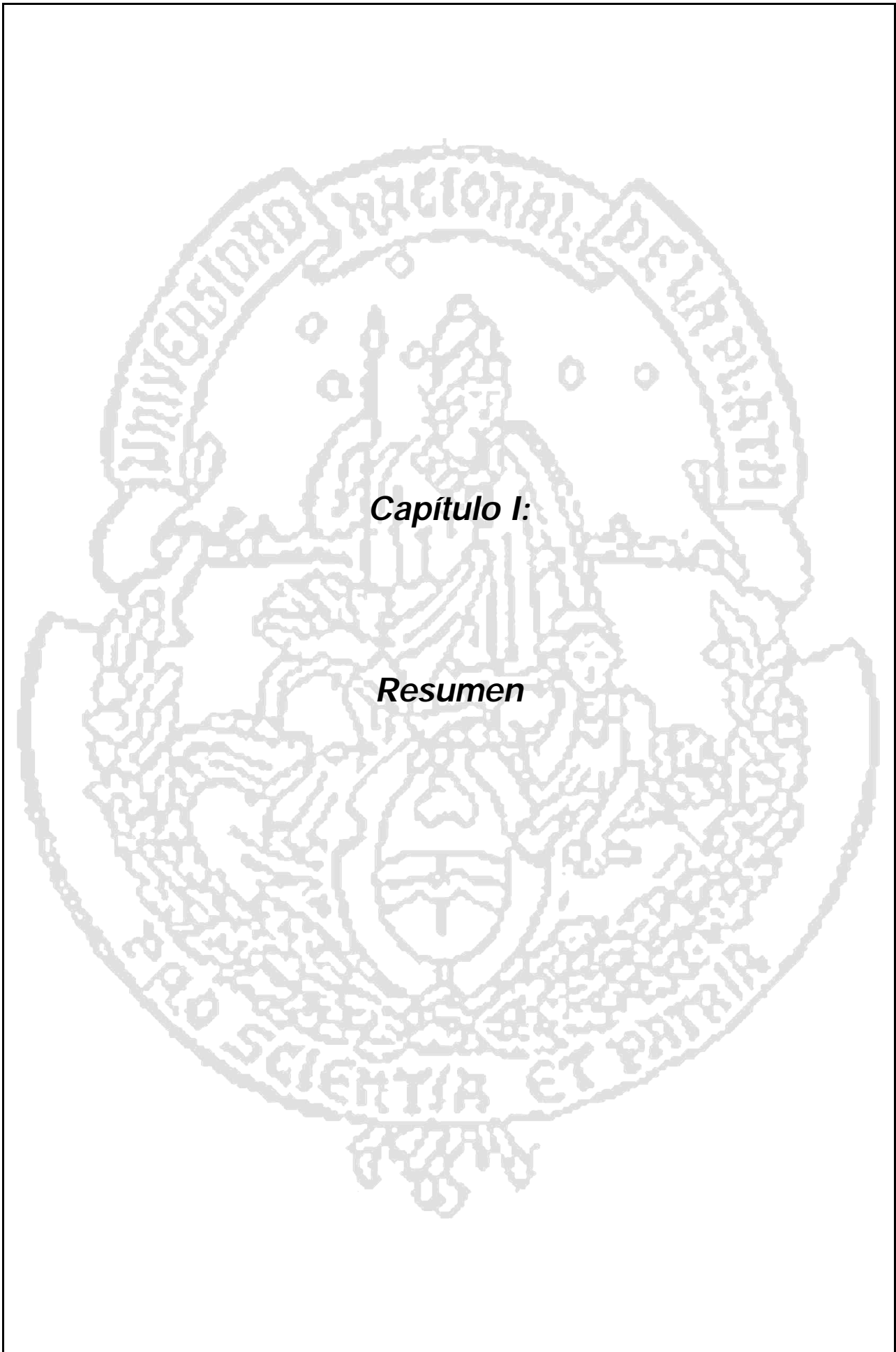
Capítulo VI

| | |
|--|------------|
| Tabla VI.1. Resumen de las Condiciones Experimentales Empleadas en los Ensayos de Toxicidad Aguda | 133 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| Tabla VI.2. Características fisicoquímicas del agua potable comercial utilizada en los ensayos de toxicidad aguda. | 134 |
|---|------------|

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla VI.3. Toxicidad Aguda del Cd(II) para <u>O. bonariensis</u> | 138 |
| Tabla VI.4. Parámetros del modelo utilizado para describir la dependencia de los valores de LC50 del Cd(II) para <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 142 |
| Tabla VI.5. Toxicidad Aguda del Cr(VI) para <u>O. bonariensis</u> | 143 |
| Tabla VI.6. Parámetros del modelo utilizado para describir la dependencia de los valores de LC50 del Cr(VI) para <u>O. bonariensis</u> en función del tiempo de exposición. | 145 |
| Capítulo VII | |
| Tabla VII.1 Variabilidad basal promedio presentada por los parámetros morfológicos volumen nucleolar y número de nucleolos por núcleo, en las células del epitelio branquial de <u>O. bonariensis</u> y definición del tamaño muestral para su estudio. | 166 |
| Tabla VII.2. Análisis de la Varianza para determinar efectos del tiempo de ensayo y del lote de los organismos sobre los valores de VTP y NTP en la branquia de <u>O. bonariensis</u> | 169 |
| Tabla VII.3. Variabilidad basal promedio presentada por los parámetros morfológicos volumen nucleolar y número de nucleolos por núcleo, en los hepatocitos de <u>O. bonariensis</u> y cálculo del tamaño muestral para su estudio. | 177 |
| Tabla VII.4. Análisis de la Varianza para determinar efectos del tiempo de ensayo y del lote de los organismos sobre los valores de VTP y NTP en el hígado de <u>O. bonariensis</u> | 181 |
| Tabla VII.5. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99. | 187 |
| Tabla VII.6. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00. | 189 |
| Tabla VII.7. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99. | 192 |
| Tabla VII.8. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00. | 194 |
| Tabla VII.9. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99. | 195 |
| Tabla VII.10. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00. | 197 |
| Tabla VII.11. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99. | 199 |
| Tabla VII.12. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00. | 201 |
| Tabla VII.13. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00. | 205 |

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla VII.14. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la branquia de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00. | 208 |
| Tabla VII.15. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-98. | 209 |
| Tabla VII.16. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00. | 211 |
| Tabla VII.17. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-98. | 212 |
| Tabla VII.18. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de <u>O. bonariensis</u> expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00. | 214 |



Capítulo I:

Resumen

Resumen

El desarrollo humano y los problemas ambientales: el papel de la contaminación.

Desde su aparición en la tierra como especie, el hombre, ha adquirido una capacidad creciente para la **explotación y adaptación al ambiente** de acuerdo a sus necesidades, permitiéndole colonizar casi todos los lugares de la tierra. Hasta la década de 1950-60, el hombre vio a la tierra como una **fuerza infinita de recursos** y con una **capacidad ilimitada de "diluir" los residuos** que se generaban de sus actividades. En 1987, la presentación del informe Brundtland ante la Asamblea General de las Naciones Unidas, instauró el concepto de **desarrollo sustentable**, poniendo fin a la idea de que la tierra era una fuente inagotable de recursos. En 1991 la OECD, en su difundido diagrama PER (presión, estado, respuesta), expone explícitamente a la **contaminación ambiental** como un factor de presión directo sobre los recursos naturales. En 1992 durante la Cumbre sobre la Tierra se plantea a la **contaminación de las aguas dulces superficiales** como uno de los temas prioritario de la agenda XXI.

Los sistemas acuáticos dulceacuícolas y su vulnerabilidad a la contaminación ambiental.

El agua dulce superficial representa sólo el 0,0091% del agua total del planeta y es vital para el hombre no sólo como fuente de consumo directo (bebida, higiene, riego) sino también como fuente de recursos naturales (ej. pesca). Los **sistemas acuáticos**, altamente complejos y diversos, son especialmente vulnerables a la contaminación puesto que son los receptores naturales de la mayoría de las sustancias tóxicas producidas por la industria, la agricultura y las actividades domésticas, y liberadas en el ambiente .

Los efectos nocivos de los contaminantes sobre el componente biótico de los ecosistemas acuáticos resulta de los efectos letales o subletales, agudos o crónicos sobre los individuos, que luego repercuten a niveles de organización mayores (poblaciones, comunidades). Estos no sólo dañan a los **ecosistemas naturales** en si mismo, sino que afectan el uso de los **recursos acuáticos** (económico, recreativo, agrícola) e incluso ponen en riesgo a la **salud humana**.

En el caso particular de la contaminación por **metales pesados**, la misma está relacionada en mayor medida a la actividad urbano-industrial y minera, aunque en ciertos casos también puede provenir de actividades agrícolas. En los sistemas acuáticos superficiales, los metales pueden encontrarse disueltos, en el material particulado, en los organismos o en el sedimento. La distribución entre estos compartimientos, dependerá del metal que se trate, de las fuentes de contaminación, de la especiación química, de los procesos de transporte, de las transformaciones químicas y biológicas, y de su bioacumulación. La toxicidad y biodisponibilidad de los metales depende de su especiación química, que a su vez es función de las características fisicoquímicas del agua.

Tanto el **cadmio** como el **romo** han sido causa de serios problemas de contaminación ambiental en distintos cuerpos de agua del mundo y de nuestro país. Para el cadmio, cuyo estado de oxidación predominante es Cd(II), se ha observado que el catión libre es la especie que presenta mayor toxicidad. Esta se ve afectada por la concentración de Ca^{+2} y de Cl^- , la presencia de materia orgánica y de material particulado, el aumento del pH y la disminución del potencial redox. En el caso del cromo, los estados de oxidación dominantes en aguas superficiales son el Cr(III) y Cr(VI), siendo el último el menos abundante en la naturaleza, el de mayor uso industrial y el más tóxico. Los factores más importantes que determinan la especiación del Cr en el agua, y consecuentemente su toxicidad son: el potencial redox, el pH y la presencia de sustancias complejantes y de material particulado.

De todos los organismos acuáticos, **los peces** han sido históricamente los primeros en ser utilizados para evaluar los efectos de posibles contaminantes sobre estos sistemas. Probablemente esto se haya debido a que la comunidad de peces constituye un **componente sobresaliente** de tales ecosistemas y que además constituye un **recurso económico** importante para el hombre. Por otro lado, los peces son los únicos vertebrados cuyo ciclo de vida es completamente acuático y por lo tanto permiten integrar los efectos de la exposición a sustancias tóxicas en ese medio, permitiendo la extrapolación de sus mecanismos de acción, con mayor grado de certidumbre, a los seres humanos.

Odontesthes bonariensis (Cuvier y Valenciennes, 1835), es un pez plantófago, **característico del sector meridional de la Cuenca del Plata** que ha sido luego

introducido antrópicamente en otros cuerpos de agua de nuestro país y de otras partes del mundo. Comúnmente conocido como pejerrey, es un de los peces dulceacuícolas de mayor **valor económico** de la Argentina, debido su pesca comercial y deportiva. Además, es considerada una especie muy promisoría para la acuicultura debido a la preciada calidad de su carne. A su vez, es una de las especies de peces para la cual se cuenta con mayor **información sobre su biología** y para la cual se han descripto **pautas básicas para su cría**. El pejerrey, se encuentra filogenética, morfológica y ecológicamente relacionado con el "silverside" norteamericano, *Menidia beryllina*, una especie ampliamente utilizada en bioensayos de toxicidad y que cuenta con su propio protocolo normalizado, donde además se establecen detalladamente las condiciones para su cría en condiciones de laboratorio. De acuerdo a los criterios de selección de organismos de ensayo y a las características mencionadas previamente, el pejerrey, se presenta como una especie muy adecuada para realizar estudios de toxicidad en la Argentina.

La ciencia en la generación de conocimiento sobre los mecanismos de acción y de herramientas de valuación de los efectos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos.

Desde la óptica científica, el estudio sistemático del efecto de los contaminantes sobre los sistemas acuáticos se remonta al siglo XIX. Uno de los primeros estudios de toxicidad fue realizado en peces por Penny y Adams en 1863 para evaluar más de 71 compuestos químicos utilizados en trabajos de tintura.

Los ensayos de **toxicidad letal aguda** son los primeros estudios que se realizan cuando se requiere conocer la toxicidad de una sustancia sobre un una especie determinada. Estos estudios son importantes por que permiten: i) estimar el **límite máximo tolerable** para una sustancia determinada, ii) evaluar la **toxicidad relativa** de un gran número de compuestos, iii) evaluar la **sensibilidad relativa** de diferentes organismos frente a una determinado compuesto, iv) evaluar los **efectos de las características del agua** (pH, dureza, salinidad, OD, MO) sobre la toxicidad de un compuesto, y v) desarrollar y entender la **relaciones dosis-respuesta y tiempo-respuesta**. En particular, se ha observado que la toxicidad letal aguda los metales pesados como el Cd(II) y el Cr(VI) puede presentar variaciones importantes dependiendo del la especie que se trate y de las características del fisicoquímicas del agua.

El estudio de la **bioacumulación** (o más específicamente de bioconcentración) de los contaminantes está dirigido a comprender las dos fases iniciales del proceso toxicológico, la naturaleza de la exposición (ej. biodisponibilidad) y la naturaleza de la toxicocinética del contaminante (velocidad y magnitud con la que el contaminante es incorporado, distribuido, metabolizado, eliminado). El conocimiento de los niveles del contaminante en los tejidos es importante porque permite evaluar la magnitud de una respuesta biológica directamente en relación la cantidad del tóxico en su sitio de acción y no indirectamente a partir del medio de exposición. En ecotoxicología esta estrategia de estudio se denomina enfoque del **residuo corporal crítico** (CBR, critical body residue), de la cual el concepto de contenido corporal letal (LBBs, letal body burdens) representa un caso específico. Algunas ventajas de este enfoque son: i) considera la **biodisponibilidad** explícitamente, ii) evalúa la **toxicocinética**, reduciendo la posibilidad de confusión debida al efecto del tiempo de exposición, iii) expresa la **potencia** del tóxico en una forma menos ambigua, facilitando la identificación e investigación de diferentes **modos de acción**, iv) toma en cuenta los efectos del metabolismo sobre la acumulación del tóxico, v) permite la **verificación experimental** de la exposición. En los organismos acuáticos, la **incorporación** de los metales ocurre principalmente a nivel de la **branquia**, dependiendo su magnitud de la especie química que éste presente. A diferencia de otros contaminantes, los metales no pueden ser degradados metabólicamente, por lo tanto, el mecanismo de **detoxificación** más común que presentan los organismos es su complejación mediante proteínas específicas, que en la mayoría de los organismos es llevada a cabo principalmente a nivel del **hígado**. Esto lleva a que en mayor o menor grado los metales se bioconcentren en los organismos vivos. Las vías de **excreción** más comunes son, a través de la orina en el **riñón** y con la bilis en el **hígado**.

El estudio de los **efectos subletales**, incluye la evaluación de un gran número de respuestas biológicas a diferentes niveles de organización en organismos expuestos a concentraciones por debajo de aquellas que producen la muerte somática directamente. En particular, aquellas respuestas a nivel histológico, fisiológico, bioquímico y molecular, pueden ser utilizadas como biomarcadores de efecto y/o exposición a contaminantes. Los **biomarcadores** proveen evidencia sobre si los organismos han sido expuestos a concentraciones de compuestos tóxicos que exceden la capacidad de detoxificación y reparación, y que han inducido respuesta de sus

blancos celulares o moleculares, actuando como señales de alerta temprana (rápida y sensible). Algunas de las cualidades de un buen biomarcador son: i) ser evidenciable antes que cualquier efecto adverso irreversible ocurra a niveles de organización biológica mayores, ii) ser evaluable mediante metodologías rápidas, poco costosas y de fácil acceso, iii) poder ser sometido a normas de control de calidad y garantía de calidad, iv) ser específico para una clase de tóxico, aunque biomarcadores no específicos poseen valor también, v) guardar una relación dosis-respuesta clara, vi) ser aplicable a un amplio conjunto de especies centinela, vii) indicar una disminución en alguna capacidad adaptativa del organismo (mejora su relevancia ecológica), aunque no siempre es necesario, viii) ser bien conocida su biología, de modo de poder entender como pueden influenciarla otros factores propios de organismo o del ambientales y ix) ser, en lo posible no destructivo.

El nucleolo es el dominio nuclear donde ocurre la **biogénesis de los ribosomas**. La estructura del nucleolo es altamente dinámica y refleja la actividad del mismo. El número de nucleolos depende de la cantidad de NORs (regiones organizadoras de nucleolo) activas y del grado de agregación de las mismas, mientras que su tamaño reflejará el grado de actividad nucleolar. El comportamiento de la **actividad nucleolar** normal en los peces, en función de su genoma, edad y maduración sexual, ha sido previamente estudiado, y se ha observado que la regulación de la biogénesis de los ribosomas es afectada por factores ambientales. El grado de actividad nucleolar reflejada por **parámetros morfológicos** como el tamaño y el número de nucleolos por célula, puede ser evaluada de manera sencilla y a bajo costo mediante **técnicas histológicas de rutina**, que pueden ser llevadas a cabo en cualquier laboratorio donde se cuente con un microscopio. Además, la metodología requiere de pequeñas porciones de tejido que pueden ser eventualmente extraídas del organismo sin necesidad de sacrificarlo.

Dado que el principal sitio blanco de los metales son las proteínas y, dependiendo del metal, los ácidos nucleicos, y que la principal función del nucleolo es la biosíntesis de los ribosomas, que representan la maquinaria molecular para la síntesis de las proteínas a partir de la información provista por el ADN, en consecuencia la actividad nucleolar podría actuar como **indicadora de efectos subletales** inducidos por los metales producto de la interferencia causada sobre las funciones biológicas de éstas macromoléculas.

Hipótesis

De acuerdo al planteo realizado en la introducción precedente, en el presente trabajo, se propone la siguiente hipótesis de estudio:

"El Cd(II) y el Cr(VI) se bioconcentran e inducen respuestas biológicas a nivel letal y subletal (sobre la actividad nucleolar branquial y hepática) en Odontesthes bonariensis expuesto a concentraciones ambientalmente relevantes de estos metales en el agua".

Objetivos

El objetivo general perseguido en el presente estudio fue el de evaluar de manera integrada diferentes respuestas biológicas en *Odontesthes bonariensis* expuesto a concentraciones letales y subletales de Cd y Cr en el agua, con el fin de conocer su toxicidad sobre la especie y de hallar señales que permitan identificar tempranamente la exposición y las respuestas de estos organismos a dichos metales.

En particular, éste trabajo la atención estuvo centrada en:

- i) desarrollar un sistema de **cría del pejerrey** en condiciones de **laboratorio** dirigido a su utilización en bioensayos de toxicidad y a otros estudios sobre su biología.
- ii) determinar los patrones de **bioconcentración** de estos metales pesados en función de su concentración en el agua y del tiempo de exposición en la branquia y el hígado, dos órganos de vital importancia para los efectos tóxicos de estos dos metales.
- iii) establecer la sensibilidad de la especie a estos metales mediante la evaluación de los **efectos letales**, estimados a partir de las concentraciones que causan en la población un 50% de mortalidad (LC50), y de su dependencia con el tiempo de exposición, las características del agua, y la edad y origen de los organismos.

iv) evaluar las respuestas a nivel de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado como señales de alerta temprana (biomarcador) de **efectos subletales** de los metales estudiados.

Metodología

El desarrollo del sistema de cultivo se realizó sobre la base bibliográfica existente para el pejerrey y otras especies de peces, y luego se fueron ajustando los requerimientos particulares para la escala de laboratorio. Los parámetros utilizados para evaluar el funcionamiento del sistema de cría estuvieron vinculados a estudiar por un lado, el funcionamiento de la infraestructura diseñada (ej. parámetros de calidad del agua) y por otro, caracterizan la adaptación de los organismo (ej supervivencia, crecimiento, índice de condición) a las condiciones de cría impuestas (ej. condiciones de incubación, cantidad y tipo de alimento, densidad de cría, tipo de recipiente). Ambos tipos de parámetros fueron controlados y ajustados durante los cuatro años de estudio. Como valores de referencia de los parámetros biológicos, se utilizaron aquellos observados para la especie en ambientes naturales.

La evaluación de los efectos letales se realizó mediante bioensayos normalizados de toxicidad empleando alevines de pejerrey de entre 15 y 30d de vida, provenientes de huevos obtenidos de reproductores capturados a campo, en la Laguna de Lobos o en la Laguna de Gómez, o de reproductores criados en cautiverio en la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Ministerio de Asuntos agrarios de la Provincia de Buenos Aires). Los ensayos se realizaron alternativamente en agua dura y moderadamente dura. Como punto final, éste registró la mortalidad en cada tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 h. Éste parámetro se utilizó posteriormente para la estimación de las $LC50_{(t)}$ mediante el método Probit.

Para la determinación de los patrones de bioconcentración y la evaluación de los efectos subletales, se realizaron ensayos de toxicidad empleando juveniles de pejerrey de 6 meses de vida provenientes de la Estación Hidrobiológica de Chascomús. Todos estos ensayos se realizaron en agua dura. El diseño experimental empleado fue un modelo bifactorial donde se evaluaron tres concentraciones de cada metal más el blanco a tres tiempos de exposición (4x3), para la determinación de la bioacumulación,

y tres concentraciones de cada metal más el blanco a cuatro tiempos de exposición (4x4), para la evaluación de la actividad nucleolar.

La concentración de los metales en cada uno de los tejidos digeridos en HNO₃, se determinó por espectrofotometría de absorción atómica electrotrémica en horno de grafito, utilizando un equipo GBC AA902 provisto de un atomizador electrotrémico GF2000. Las curvas de calibración se construyeron a partir de patrones comerciales, utilizando como controles, blanco de reactivos y material de referencia.

La actividad nucleolar en la branquia y el hígado fue evaluada mediante microscopía óptica en preparaciones histológicas realizadas a partir de muestras de tejido fijadas en una mezcla de metanol ácido acético 3:1, disgregadas en ácido acético al 45% (para la obtención de una suspensión de núcleos), goteadas sobre un portaobjetos nuevo y teñidos con AgNO₃ al 50%, utilizando gelatina como coloide protector. Los parámetros nucleolares que se evaluaron fueron el número de nucleolos promedio por núcleo (NTP) y el volumen nucleolar total promedio por núcleo (VTP). De acuerdo a la variabilidad observada para estos parámetros en estudios preliminares, el número de nucleolos analizado por preparado fue de 60. El volumen de cada nucleolo, se estimó a partir del volumen de una esfera de igual área transversal al de la elipse ajustada a cada nucleolo. Ésta, se obtuvo a partir del análisis de imágenes realizado sobre cada preparado, utilizando un programa de dibujo técnico. Las imágenes de cada preparado fueron capturadas y almacenadas en la PC mediante una cámara digital CCD-Iris color (Sony, 55C-370) montada sobre el microscopio (Olympus, BX40), utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.

Resultados

La infraestructura para la cría y el mantenimiento de los pejerreyes en condiciones de laboratorio fue diseñada para soportar una carga máxima teórica de 10,71 Kg. En a práctica, el sistema soportó una carga máxima de 5 kg de pejerreyes sin detrimento de la calidad del agua (pH, O₂, NH₄⁺) y con un mínimo costo y esfuerzo de mantenimiento. Respecto a las variables biológicas evaluadas, se observó que las condiciones de cultivo lograron un nivel de supervivencia (24,6 ± 6,9 %), comparable con el obtenido en otros estudios dirigidos al cultivo comercial o de repoblamiento y mucho mayor que el estimado en estudios llevados a cabo a campo. La mortalidad se ajustó satisfactoriamente al modelo exponencial $N = N_0 * e^{-(16,61*t)} + 21,5$ ($N = N_0 * e^{-(2,64*t)}$). Por

otro lado, la función de crecimiento promedio estimado mediante del modelo de Von Bertalanffy fue $Lst = 266,48 * [1 - e^{-0,336*(t+0,09)}]$, mostrando un crecimiento máximo esperado y una tasa de crecimiento algo menores a las obtenidas en estudios de cría en estanques provistos de alimento natural y mucho más baja que la observada en los ambientes naturales. Del mismo modo, a pesar de que los individuos mostraron abundante reserva lipídica al ser disectados, el índice de condición promedio ($0,92 \pm 0,01$) obtenido en el laboratorio fue algo menor al logrado en otros estudios. A pesar del menor crecimiento e índice de condición logrados en el laboratorio, la supervivencia observada demuestra que las condiciones de cultivo han sido satisfactorias, y que por lo tanto él pejerrey presenta una gran plasticidad fisiológica respecto al crecimiento. De todos modos éstos resultado indican la necesidad de indagar las causas del menor crecimiento e índice de condición obtenidos en el laboratorio, que probablemente se vinculen a la necesidad de contar de manera continua con un alimento de calidad y en cantidad apropiadas para cada fase de cría), y de resolver limitaciones físicas del crecimiento, que como se ha observado para otras especies pueden estar limitadas por el tamaños de los recipientes de cría.

El estudio de la bioconcentración en la branquia y el hígado de los pejerreyes expuestos al Cd y Cr, indicaron que para ambos tejidos, los niveles de los dos metales se incrementan en función de su concentración en el agua y del tiempo de exposición. Los valores basales de en la branquia y el hígado de los pejerreyes control fueron 0,21 y 0,21 $\mu\text{g/g}$ para el Cd, y de 0,40 y 0,03 $\mu\text{g/g}$ para el Cr, respectivamente, mientras que las máximas concentraciones observadas en cada tejido, alcanzadas a la mayor concentración de cada metal y máximo tiempo de exposición (348h), fueron de 11,11 y 0,65 $\mu\text{g/g}$ para el Cd y 2,57 y 1,28 $\mu\text{g/g}$ para el Cr respectivamente. La acumulación de Cd en la branquia fue 17 veces mayor que en el hígado, mientras que esta relación fue de sólo dos veces para el Cr. La acumulación de Cd en la branquia fue aproximadamente 2 veces mayor (en moles) a la de Cr, mientras que en el hígado esta relación se invirtió, siendo la acumulación del Cr aproximadamente 4 veces mayor (en moles) a la de Cd. La cinética de acumulación de cada metal se ajustó satisfactoriamente al modelo clásico de bioacumulación ($C_t = C_a \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{(-k_e t)}) + C_i$) tanto en la branquia como en el hígado. Para el Cd, el factor de bioconcentración (respecto al agua) y el factor de acumulación (respecto a los blancos) estimados fueron de 1981 veces y 8556 % en la branquia y de 127,7 veces y 713 % en el hígado de los pejerreyes expuestos a 10 $\mu\text{g Cd(II)/L}$. Los mismos parámetros para los pejerreyes

expuestos a 1000 µg Cr(VI)/L fueron 2,2 veces y 657 % en la branquia y de 1,2 veces y 2546 % en el hígado.

Los valores de $LC50_{(96h)}$ estimados para los alevines de 30d expuestos a Cd y a Cr en agua dura, fueron de 35 y 5470 µg/L, respectivamente, ubicando al pejerrey dentro del grupo de especies sensibles a estos metales. De acuerdo a estos valores la toxicidad letal aguda del Cd sobre el pejerrey resultó aproximadamente 156 veces mayor que la del Cr. Ambos metales incrementaron su toxicidad letal aguda al reducirse la dureza del agua y la edad de los organismos. Para el caso del Cd la función que explicó la relación entre la $LC50$ y la dureza fue $LC50 (\mu g \text{ Cd(II)/L}) = 35 \cdot (0.98^{\text{Ln} [\text{dureza} (\text{mg CaCO}_3/\text{L}) - 1.88]}$. El modelo conceptual (deducido a partir del modelo de bioconcentración, asumiendo el concepto de LBB), desarrollado para explicar la dependencia de los valores de $LC50$ con el tiempo de exposición y explicado por la expresión $LC50_{(t)} = LC50_{(\infty)} / [1 - e^{-k_e \cdot t}]^2$, se ajustó satisfactoriamente a los valores experimentales obtenidos para ambos metales, siendo los valores de $LC50_{(\infty)}$ y de k_e , respectivamente, de 26,02 µg/L y 0,02 h⁻¹ para el Cd y 4915,50 µg/L y 0,0211 h⁻¹ para el Cr.

Los estudios preliminares sobre el comportamiento de la actividad nucleolar en organismos no expuestos, demostraron que el VTP y el NTP resultaron desde el punto de vista de la variabilidad los parámetros más adecuados a evaluar. Se observó que, mientras el VTP responde a cambios en la condición fisiológica de los organismos, comportándose como un indicador "funcional" de la actividad nucleolar, que puede ser regulado por factores exógenos como por ejemplo el nivel de alimentación, el NTP responde a características definidas de cada tejido, comportándose como un indicador "estructural" de la actividad nucleolar, que pareciera estar definido por factores endógenos dados por la constitución genética de cada especie. De los parámetros morfológicos seleccionados para evaluar la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de los pejerreyes frente a la exposición a Cd y Cr, sólo el VTP mostró una clara respuesta en función de la concentración de los metales y del tiempo de exposición. En cambio el NTP mostró variaciones transitorias que resultaron difíciles de vincular con la exposición a los metales pero que podrían tener alguna relación con efectos reversibles sobre la agregación de los componentes nucleolares. En respuesta al Cd, el VTP branquial mostró una reducción significativa tempranamente desde las 6h de exposición, mostrando una reducción máxima de hasta el 43% en los pejerreyes expuestos a 10 µg Cd(II)/L durante 384h. La menor concentración que redujo

significativamente el VTP fue $1 \mu\text{g Cd(II)/L}$ (luego de 6h en un experimento y de las 384 h en otro). La respuesta del VTP hepático frente a la exposición a Cd se caracterizó por un incremento significativo (aproximadamente un 70%) de los valores del parámetro en los pejerreyes expuestos a 1 y $5 \mu\text{g Cd(II)/L}$. Por el contrario, el VTP hepático de los pejerreyes expuestos a $10 \mu\text{g Cd(II)/L}$ no presentaron cambios o mostraron una tendencia a la reducción de sus valores. La respuesta del VTP branquial y hepático en los pejerreyes expuestos a Cr estuvo siempre caracterizada por una reducción de los valores de este parámetro, siendo más marcada en la branquia. El VTP branquial de los pejerreyes expuestos a 500 y $1000 \mu\text{g Cr(VI)/L}$ mostró una reducción significativa tempranamente desde las 6 h de exposición, mostrando valores de hasta 33 y 41 % menores a los de los controles, respectivamente. La menor concentración que causó un descenso significativo de los valores de VTP en la branquia fue $100 \mu\text{g Cr(VI)/L}$ pero sólo luego de 384h de exposición. En el hígado, la reducción del VTP fue disímil entre experimentos, puesto que mientras en uno se observó una reducción significativa desde la primer hora de exposición en los pejerreyes expuestos a $1000 \mu\text{g Cr(VI)/L}$, en el otro ésta se advirtió sólo recién a las 192 h de tratamiento en los peces expuestos a $500 \mu\text{g Cr(VI)/L}$. La máxima reducción observada en este parámetro respecto a los organismos control, fue del 39%. La respuesta observada en la actividad nucleolar de la branquia y el hígado de los pejerreyes expuestos al Cd y Cr, ha podido ser interpretada de manera consistente, de acuerdo a la relación estructura-función que presenta el nucleolo, de los patrones de acumulación de cada metal en cada tejido y de los mecanismos de acción descriptos para cada metal.

De acuerdo a la bibliografía consultada, en la región meridional de la Cuenca del Plata, los valores de los parámetros fisicoquímicos del agua que mayor influencia poseen sobre la toxicidad del Cd y el Cr, muestran un patrón de distribución geográfica caracterizado por una tendencia al incremento de los mismos de norte a sur, presentando valores mínimos en el Bajo Paraná ($4,1 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$ y $\text{pH} = 6,1$) y máximos en las lagunas de la Cuenca del Río Salado. En consecuencia, la vulnerabilidad del pejerrey ante eventuales descargas de estos metales pesados, se incrementaría en sentido opuesto. Por otro lado, los niveles de Cd y Cr en el agua publicados para el sector meridional de la Cuenca del Plata, muestran las mayores concentraciones en el Río de la Plata, con niveles especialmente altos frente a la zona norte del Gran Buenos Aires donde se hallaron hasta $3,7$ y $1800 \mu\text{g/L}$ de Cd y Cr respectivamente. Por lo tanto, en determinados sectores del Río de la Plata, los niveles de Cd llegan a ser

comparables con aquellos que inducen efectos letales agudos sobre el pejerrey, mientras que los de Cr se corresponden con concentraciones que inducen respuestas subletales a nivel de la actividad nucleolar.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir del presente estudio podemos concluir que:

- i) se ha desarrollado un sistema de cría de bajo costo de funcionamiento y mantenimiento a escala de laboratorio que permite la realización de estudios toxicológicos y biológicos en condiciones controladas de experimentación, con una de las especies de peces dulceacuícolas de mayor interés socioeconómico de la Argentina.
- ii) por primera vez se ha determinado el patrón de **bioacumulación** del Cd y el Cr en el hígado y la branquia de *O. bonariensis*, hallando que éste es función de la concentración de cada metal en el agua, del tiempo de exposición y de las características de cada metal. Así, el Cd^{+2} presenta una gran afinidad por la branquia, reflejada por el alto grado de bioconcentración en éste tejido y el reducido poder de "penetración" al interior del organismo evidenciado por los reducidos niveles del metal en el hígado. Por otro lado, el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$, posee una mucho menor afinidad por la branquia, presentando una así una mayor capacidad de ingresar al organismo y por lo tanto, una mayor acumulación en el hígado que el Cd. La marcada diferencia de concentración entre la branquia y el hígado de los pejerreyes expuestos a Cd, hacen de esta relación un buen indicador de exposición a este metal pero no para el Cr.
- iii) el pejerrey presenta una sensibilidad a los **efectos letales agudos** causados por el Cd y Cr comparable a la manifestada por las especies más sensibles a estos metales. Tal diferencia de sensibilidad guarda relación con la capacidad de bioconcentración que cada uno de ellos presenta en la branquia (se evidencia más claramente cuando se expresa en concentraciones molares). Las características del agua y la edad de los individuos influyen significativamente sobre la sensibilidad de la especie a estos metales, incrementándose a medida que la dureza del agua y la edad disminuyen. La dependencia de la toxicidad letal aguda de estos metales

con el tiempo de exposición puede ser interpretada satisfactoriamente mediante un modelo donde se asume que la concentración en la branquia que causa la muerte de un individuo es constante y sólo depende del tiempo en que tarde en alcanzarla.

iv) La respuesta de la **actividad nucleolar**, evaluada a través del VTP, es un parámetro sensible a los efectos inducidos por del Cd y Cr a nivel de la branquia y del hígado de los pejerreyes. Contrariamente el NTP no muestra una respuesta clara frente a la exposición a los metales. La respuesta del VTP, guarda relación tanto con los niveles de acumulación de cada metal en los tejidos como con los mecanismos de acción descritos por otros autores para estos elementos. Este parámetro, es capaz de responder además frente a otros factores de estrés, como por ejemplo la reducción en los niveles de alimentación, y por lo tanto no constituye un biomarcador específico para los metales estudiados, sino que se comporta como un **biomarcador general de estrés**. La buena sensibilidad demostrada por este parámetro lo hace atractivo como biomarcador de efecto en estudios realizados en condiciones de laboratorio, si pudieran confirmarse para la especie los efectos celulares adversos vinculados a éste parámetro nucleolar citados por otros autores en otros modelos *in vivo* e *in vitro*. Al igual que lo observado para otros biomarcadores (ej. Citocromo P450), su implementación en estudios de campo, requeriría de un profundo conocimiento de la especie y de los ciclos estacionales que pudieran estar afectando su metabolismo.

Interpretaciones y Especulaciones

La evaluación integrada de las diferentes respuestas biológicas estudiadas (la acumulación, los efectos letales y los efectos subletales) en los peces expuestos a Cd y Cr, en relación al marco teórico vigente, permiten realizar las siguientes interpretaciones y especulaciones sobre los posibles **mecanismos tóxicos** de estos metales en *O. bonariensis*:

i) los **efectos letales** de ambos metales se deberían principalmente a las disfunciones que causan a nivel de la branquia. En el caso del Cd, su marcada letalidad (a muy bajas concentraciones del metal en el agua), podría ser atribuida a su gran afinidad por los grupos aniónicos ubicados en la superficie branquial, que incrementa su bioconcentración en éste tejido hasta niveles suficientemente

elevados como para permitir el ingreso pasivo del metal a través de canales de Ca^{+2} ubicados en la cara apical (ubicados principalmente de las células del cloro), y bloquear luego las Ca^{+2} -ATPasas basolaterales, impidiendo así el ingreso de Ca^{+2} y causando una pérdida neta de este elemento, que conduciría entonces a la muerte del organismo por hipocalcemia. La disminución de la activada nucleolar observada en la branquia de los pejerreyes expuestos a este metal, indica que otros daños celulares ocurren como consecuencia de los altos niveles de Cd, pero de acuerdo a la mayoría de los trabajos consultados, estos no parecieran jugar un papel tan importante en la inducción del efecto letal como la pérdida de Ca^{+2} . Este último hecho queda de manifiesto al observar el efecto protector que, al igual que para otras especies, el aumento de la dureza del agua ofrece frente a la toxicidad del Cd en *O. bonariensis*.

En el caso del Cr(VI), su menor afinidad por la branquia hace que su toxicidad aguda sea más reducida, ya que los niveles de este metal en el agua necesarios para inducir letalidad deberán ser más elevados. Si bien, el mecanismo por el cual el Cr(VI) induce la muerte de los organismos no está claramente dilucidado, es aceptado que el CrO_4^{-2} ingresaría a la branquia mediante canales inespecíficos para aniones (SO_4^{-2} , PO_4^{-3}) y que sería rápidamente reducido intracitoplasmáticamente, por vía enzimática o mediante reductores naturales (glutarato, ascorbato), a Cr(III) con la consecuente formación de aductos con las proteínas y el ADN, y la generación de estrés oxidativo. La formación de aductos sería el mecanismo más importante que explica la toxicidad del Cr, puesto que los mismos causarían un bloqueo masivo e inespecífico de las macromoléculas branquiales. Esta hipótesis, se corresponde con el descenso observado en la actividad nucleolar, indicador de daño celular. La inhibición de las funciones biológicas de las proteínas y ácidos nucleicos branquiales, serían entonces los responsables de inducir disfunciones a nivel de la osmoregulación, del intercambio gaseoso, de la regulación ácido base y de la excreción de desechos nitrogenados que conducirán finalmente a la muerte de los peces.

- ii) los **efectos subletales** del Cd y Cr aún no son comprendidos claramente. Pese al gran número de estudios realizados para evaluar los efectos subletales del Cd en peces, hasta el momento no se ha encontrado resultados consistentes sobre que este metal induzca efectos a este nivel (ej. sobre el crecimiento, capacidad

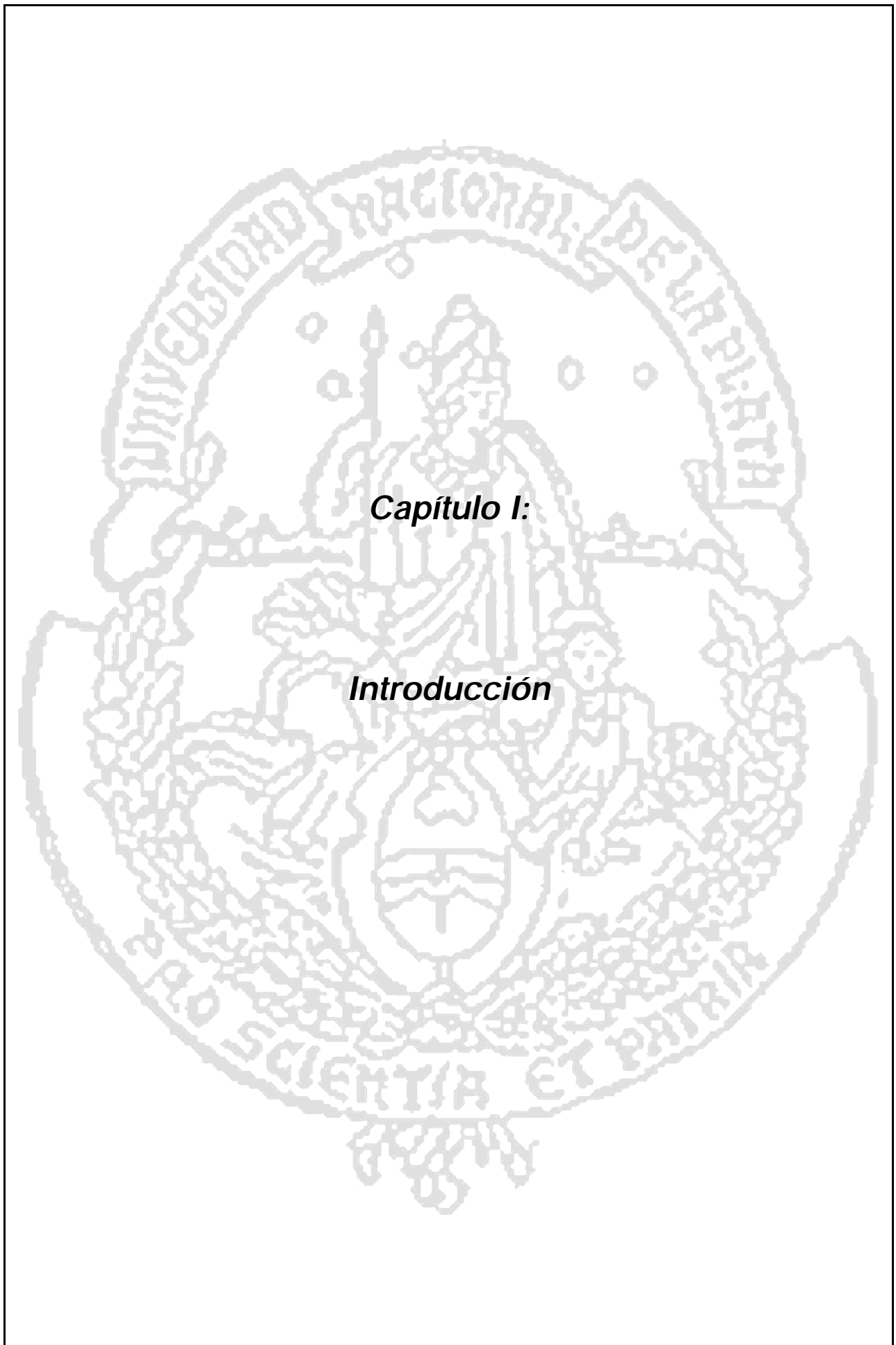
natatoria, consumo de oxígeno). Este hecho puede ser explicado en parte, como consecuencia de la gran afinidad que posee este metal por la branquia y que actúa restringiendo su ingreso al organismo y manteniendo así niveles muy bajos de este metal en los órganos internos. Además, los altos niveles de metalotioneínas y su gran capacidad de complejación del Cd, que han sido observados en el hígado de los peces, ofrecen una eficiente protección contra este metal. Además, se ha detectado que este sistema de protección le permite a los peces aclimatarse al metal cuando las exposiciones no son agudas. Toda la evidencia conduce a pensar que el principal sitio de acción del Cd es la branquia y que su mayor acción tóxica estaría vinculada a la interferencia con la fisiología del Ca. Sin embargo, el aumento de la actividad nucleolar hepática inducida por las bajas concentraciones de Cd en el hígado, podrían relacionarse con la capacidad que presenta el Cd, a muy bajas concentraciones, de interferir con los mecanismos de señalización celular. En tal sentido, como lo observado en cultivos celulares tratados con muy bajos niveles de este metal, el Cd sería capaz de aumentar la expresión génica, induciendo genes del tipo de los oncogenes c-myc, c-jun y c-fos. Este hecho podría estar alertando sobre un posible aumento en la probabilidad de desarrollo de tumores en los peces inducido por el Cd.

En relación al Cd, los efectos subletales causados por el Cr en los peces han sido mucho menos estudiados. La mayor capacidad de ingresar al organismo evidenciada por su mayor acumulación en el hígado, junto a la reducción de la actividad nucleolar causada por el metal en éste tejido, indican que el Cr estaría causando, en algún grado, daño celular a nivel hepático, que podría acarrear consecuencias sobre el normal desempeño de las funciones biológicas y sobre la capacidad adaptativa de los pejerreyes expuestos a este metal. La capacidad de interferir con el metabolismo de los carbohidratos y de deprimir del sistema inmune halladas por otros autores, conducen a pensar que el Cr pudiera llegar a causar efectos subletales en los peces, pero es evidente que aún es necesaria la realización de un número mayor de estudios dirigidos en este sentido.

- iii) El patrón de variación geográfica de las características fisicoquímicas del agua en el sector meridional de la Cuenca del Plata, indica que la **vulnerabilidad del Pejerrey en los ambientes naturales** al Cd y Cr, será mayor en la zona del Bajo Paraná. Por otro lado, de acuerdo con las concentraciones de ambos metales,

halladas por otros autores, en los cuerpos de agua de la región, indican que en determinadas zonas del Río de la Plata y bajo circunstancias excepcionales, el pejerrey podría estar sometido a exposiciones letales agudas de Cd y sufrir efectos subletales a nivel de la actividad nucleolar por exposición a Cr.

En el presente trabajo se han podido responder muchas de las preguntas planteadas al comienzo de este estudio y que han contribuido a enriquecer el conocimiento acerca de los efectos tóxicos del Cd y el Cr sobre el pejerrey, sin embargo es evidente que muchos más nuevos interrogantes han sido los que se han originado en el transcurso del mismo.



Capítulo I:

Introducción

Capítulo I. Introducción

I.a El desarrollo humano y los problemas ambientales: el papel de la contaminación.

Desde su aparición en la tierra como especie, el hombre (*Homo sapiens*), ha desarrollado una capacidad intelectual que le ha otorgado una habilidad creciente para la *explotación y adaptación del ambiente* de acuerdo a sus necesidades. Esta característica le ha permitido colonizar casi todos los ambientes de la tierra y lograr un nivel de supervivencia sin precedentes. Hasta hace 12.000 años atrás, con una población mundial estimada en no más de 10 millones de habitantes, el hombre vivía organizado en pequeños grupos nómades de cazadores y recolectores, manteniendo una completa armonía con el medio. La habilidad de domesticar plantas y animales surgida en medio oriente 8000 AC, fue un hito fundamental en la historia del hombre puesto que le permitió formar los primeros asentamientos permanentes y obtener excedentes, brindándole la oportunidad de realizar otro tipo de actividades y practicar el comercio. Sin embargo no fue hasta el siglo XIX, a partir de la revolución industrial, con la invención de la máquina de vapor que condujera al uso y explotación de los combustibles fósiles, a la explotación intensiva de los recursos minerales, al desarrollo de la agricultura mecanizada y al movimiento de personas y mercancías mediante los nuevos medio de transporte (tren y barcos a vapor), que la capacidad de modificar el ambiente y explotar los recursos naturales comenzara realmente a cambiar la faz de la tierra. Los avances tecnológicos, sumados al avance de la medicina ocurrido durante los siglos XIX y XX, con aportes como los de Pasteur y Fleming, contribuyeron a la explosión del crecimiento demográfico evidenciado desde entonces (National Geographic Society, 1998).

Durante toda esta etapa de desarrollo, la humanidad vio a la tierra como una *fuerza infinita de recursos y con una capacidad ilimitada de "diluirl" los residuos* que se generaban de sus actividades. Sin embargo, algunos hechos ocurridos durante la Segunda Guerra Mundial (1939-1945) y el período de post guerra, comenzaron a cambiar este paradigma (Newman y Unger, 2003). Las explosiones nucleares de Hiroshima y Nagasaki en 1945, pusieron de manifiesto la vulnerabilidad de la especie humana. La declinación de las poblaciones de salmón en el Río Columbia entre los años 1900 y 1960 (Van Hyning, 1973), y la casi extinción de la trucha en los grandes lagos hacia mediados de 1950, atribuidas a la sobrepesca, evidenciaron que la

capacidad de carga de los sistemas naturales era limitada (Hartman, 1988). El síndrome de Minamata, que afectó a miles de personas en Japón durante la década de 1950 debido al consumo de pescado contaminado con mercurio orgánico proveniente de las descargas de la empresa Chisso Corp, y el síndrome de Itai-itai, que afectó a los pobladores de la Prefectura de Toyama desde 1940 a 1960, como consecuencia de consumir arroz contaminado con cadmio a través del agua de riego contaminada por los desechos de una mina metalífera, instalaron en la opinión pública la preocupación por los posibles efectos de la contaminación sobre la salud humana (Newman y Unger, 2003). Los efectos deletéreos causados por el DDT sobre la reproducción de las aves rapaces, narrado por Rachel Carson (1962) en su célebre libro "Silent spring", junto a otros desastres naturales, extendieron la preocupación pública y gubernamental a los posibles efectos de la contaminación sobre el medio ambiente, instaurando la necesidad de su protección.

Durante los años siguientes se evidenciaron las consecuencias globales del paradigma que había reinado en la sociedad hasta estos momentos. Así en los últimos años, la humanidad ha evidenciado una explosión demográfica que llevó a la duplicación de la población mundial en sólo 35 años, alcanzando una población actual de 6,2 billones de habitantes (Population Reference Bureau, Inc 1998), de los cuales la mayoría vive en condiciones infrahumanas. Además, ocupando un 40 % de la superficie terrestre, ha atestiguado las consecuencias de la depredación y agotamiento de los recursos, con la pérdida de las selvas tropicales, el agotamiento de los recursos pesqueros en los mares, la degradación de los suelos y la extinción de especies e introducción de especies invasoras, con la consecuente pérdida de biodiversidad y de los servicios ecológicos que esos sistemas prestan al hombre. Finalmente, ha padecido los efectos de la contaminación ambiental, evidenciando la amenaza del calentamiento global por el aumento de CO₂ atmosférico y sus consecuencias sobre el clima, el adelgazamiento de la capa de ozono por la emisión de clorofluorocarbonos a la atmósfera, con la pérdida de protección contra la radiación UV, la contaminación del aire en las áreas urbano-industriales, y sus consecuencias sobre la salud humana, degradación de las aguas para consumo humano y la consecuente pérdida de acceso a aguas seguras, contaminación de las aguas dulces y los mares por derrames de petróleo, desechos urbanos industriales y agrícolas, con la consecuente pérdida de biodiversidad, contaminación radioactiva, y muchas otras formas de contaminación (National Geographic Society, 2002).

Todas estas transformaciones y la velocidad de los cambios, han alertado a la población mundial, modificando la concepción previa acerca de nuestro planeta. Este cambio de paradigma, dio lugar al surgimiento del concepto de desarrollo sustentable, que fue definido por primera vez en el Informe Brundtland, presentado en 1987 ante la Asamblea General de las Naciones Unidas. Allí se puso de manifiesto que los recursos y capacidad de depuración del planeta tierra son finitos y que por lo tanto los límites para el desarrollo no son absolutos, sino que vienen impuestos por el nivel tecnológico y de organización social, su impacto sobre los recursos del medio ambiente y la capacidad de la biosfera para absorber los efectos de la actividad humana.

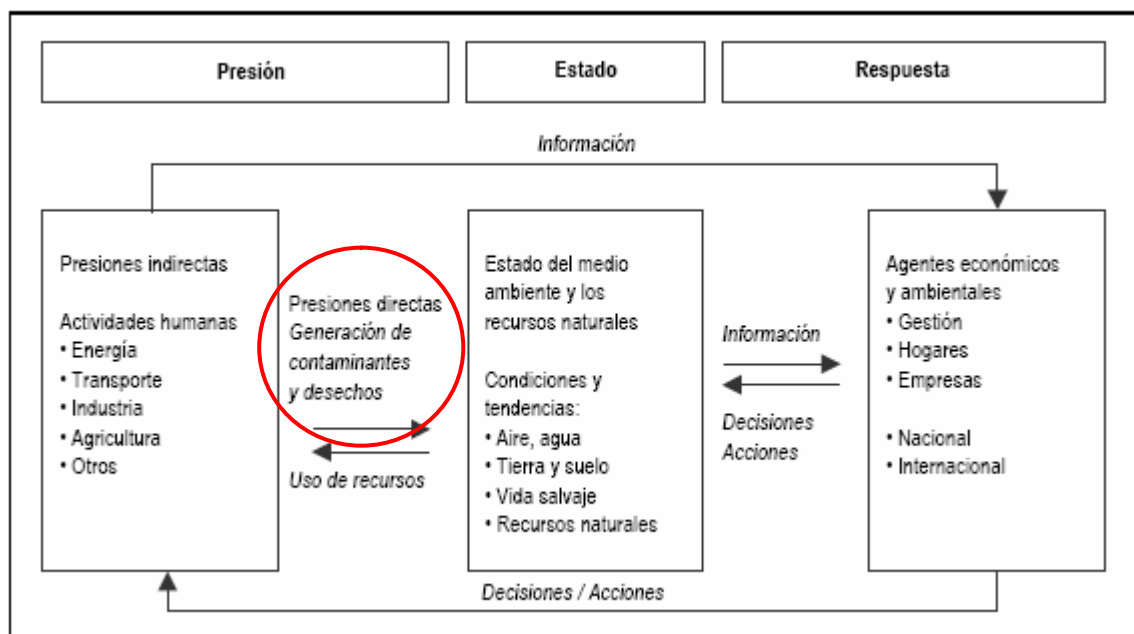


Figura I.1. Diagrama PER (OECD, 1998).

El círculo rojo indica las presiones directas ejercidas por la contaminación sobre el ambiente y los recursos naturales.

Luego en 1991 la OECD, en su difundido diagrama PER (presión, estado, respuesta; Figura I.1), expuso explícitamente a la contaminación ambiental como un factor de presión directo sobre los recursos naturales (OECD, 1998). La magnitud global de los problemas ambientales condujeron, en 1992, a la celebración durante la Cumbre sobre la Tierra celebrada en Río de Janeiro, donde se planteó como uno de los temas prioritarios de la agenda XXI, el de la Contaminación de las aguas dulces superficiales. Allí, se resaltó la importancia de contar con herramientas que permitan obtener información sobre la sustentabilidad de los recursos, proponiendo una serie de

indicadores para monitorear a nivel mundial, entre otras cuestiones, los recursos pesqueros y de la calidad del agua (United Nations, 1992).

I.b Vulnerabilidad de los sistemas acuáticos dulceacuícolas superficiales a la contaminación ambiental.

I.b.1. Los sistemas acuáticos dulceacuícolas superficiales, estructura, funciones y servicios.

El agua dulce superficial representa sólo el 0,0091% del agua total del planeta, y ésta representa la suma de todos los lagos, ríos y pantanos del mundo (Botkin y Keller, 2000). Los sistemas acuáticos son altamente complejos y diversos ya que comprende varios tipos diferentes de ecosistemas (arroyos, ríos, lagos) que poseen características bióticas y abióticas propias (Rand, 1995).

Los cuerpos de agua pueden dividirse en lóticos, aquellos con renovación del agua relativamente rápida (tiempos de residencia cortos) donde dominan procesos erosivos (ej. arroyos, ríos), y lénticos, con renovación del agua relativamente lenta (tiempos de residencia largos) donde dominan los procesos de sedimentación (ej. lagunas, lagos). Desde el punto de vista ecológico, los sistemas acuáticos superficiales son ecosistemas conformados por un componente abiótico, representado por el agua, el material particulado en suspensión y los sedimentos, y un componente biótico, dado por las diferentes comunidades de organismos, entre los cuales la de los peces es en general una de las más representativas en biomasa. Las características del agua y del resto de los componentes abióticos, dependerán de las características geológicas y climáticas dadas por su ubicación geográfica y de las actividades humanas. El componente biótico dependerá de las anteriores y de la historia natural de sus organismos.

Los ecosistemas acuáticos poseen una gran importancia tanto desde el punto de vista ecológico puesto que intervienen el ciclo biogeoquímico de los diferentes elementos mayoritarios (ej. C, N, P), y son hábitat de una gran diversidad de especies. Además, los sistemas acuáticos superficiales representan un recurso natural muy importante para el hombre, no sólo por constituir una fuente de agua para consumo directo en el uso doméstico (bebida e higiene), agrícola e industrial, sino también un recurso económico (ej. pesca) y recreativo, e incluso constituyen un importante medio de comunicación. Por otra parte, los ecosistemas acuáticos brindan innumerables servicios que no siempre resultan evidentes, como por ejemplo la capacidad de

purificación del agua, la regulación climática, reservorio de diversidad genética, entre otros. La importancia de los servicios que ofrecen los ecosistemas acuáticos se ponen de manifiesto al observar que la mayoría de las grandes ciudades del mundo se han desarrollado a orillas de ríos, lagos o zonas costeras.

La contaminación de las aguas superficiales ocurre cuando a un cuerpo de agua ingresa una determinada sustancia en cantidades que exceden la capacidad natural de dilución, transformación y/o remoción de tal sustancia por el sistema, causando efectos adversos sobre éste (Rand, 1995).

1.b.2. Los sistemas acuáticos y la contaminación ambiental: los metales pesados.

Los sistemas acuáticos, son especialmente vulnerables a la contaminación puesto que son los receptores naturales de la mayoría de las sustancias tóxicas producidas por la industria, la agricultura y las actividades domésticas, y liberadas en el ambiente (Anderson y D'Apollonia, 1978). Su vulnerabilidad depende de diferentes factores a saber: i) tipo de contaminante, ii) concentración y carga total que haya recibido, iii) duración y tipo de ingreso, iv) propiedades del ecosistema (ej. ubicación geográfica, tiempo de residencia y movimientos del agua, fisicoquímica del agua, tipo de sedimentos), y v) distancia a la descarga.

La distribución y acumulación de los contaminantes en los diferentes compartimientos abióticos y bióticos del ecosistema, dependerá de las propiedades fisicoquímicas del compuesto, de las propiedades físicas, químicas y biológicas del ecosistema y de la fuente y magnitud de las descargas en el ambiente. Estas determinarán, la especiación y carga (fuentes puntuales, fuentes difusas) del contaminante, y los procesos de transporte (deposición, volatilización, dilución-precipitación, advección, difusión, convección, resuspensión-sedimentación), transformación abiótica (equilibrio ácido-base, óxido-reducción, adsorción, complejación, hidrólisis, fotólisis), transformación biótica (óxido-reducción, precipitación sulfurosa, metilación, desalquilación) y la bioacumulación (bioconcentración, bioacumulación, biomagnificación) (Rand, 1995).

Los efectos tóxicos de los contaminantes sobre el componente biótico de los ecosistemas acuáticos resulta de los efectos letales o subletales, agudos o crónicos sobre los individuos, que luego repercutirán a niveles de organización mayores,

afectando parámetros a nivel poblacional (supervivencia, fecundidad, crecimiento poblacional, estructura de edades, abundancia, distribución) y de las comunidades (productividad, biomasa, diversidad). Estos no sólo perturban el normal funcionamiento de estos sistemas naturales, sino que influyen negativamente sobre los bienes y los servicios que ellos prestan al hombre.

Los metales están naturalmente presentes en los sistemas acuáticos, pero se convierten en contaminantes cuando, producto de las actividades humanas, sus concentraciones exceden los valores naturales. Una característica de relevancia ambiental que poseen los metales, es que no son degradables y por lo tanto tienden a acumularse en el ambiente pudiendo entonces alcanzar niveles tóxicos. En los sistemas acuáticos, el último sumidero de los metales los representan los sedimentos (Newman y Unger 2003).

En particular, los *metales pesados* constituyen un grupo de elementos metálicos con un peso molecular mayor a 40 y una densidad mayor a 7 g/m³ que se caracterizan por compartir una distribución electrónica particular en su capa externa. De acuerdo a esta última característica, los metales pesados pueden ser: i) cationes de *Clase B*, como el Cu⁺, Ag⁺, Cd⁺², y Hg⁺², que poseen 10 ó 12 electrones en los orbitales d y una baja electronegatividad, conformando esferas "blandas" fácilmente deformables por iones adyacentes, y que tienden a formar enlaces covalentes con dadores de electrones como el sulfuro, ó ii) cationes "marginales", como el Fe⁺², Ni⁺², Cu⁺², Cr⁺², que poseen características intermedias entre los cationes Clase B antes descriptos y los Clase A (Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺²) que poseen una configuración electrónica de gas inerte, forman esferas "duras" y son altamente electronegativos (Nieboer y Richardson, 1980). Algunos de los metales pesados como el Cu y el Zn son, a bajas concentraciones, elementos esenciales para el metabolismo de los seres vivos, mientras que otros como el Pb y el Cd, no poseen funciones biológicas conocidas. Sin embargo todos ellos han demostrado ser tóxicos para los organismos acuáticos más allá de determinadas concentraciones límite (Rand, 1995).

Las fuentes de contaminación por metales pesados, pueden ser puntuales o difusas, estando mayormente relacionadas a la actividad urbano-industrial y minera, aunque en ciertos casos también puede provenir de actividades agrícolas. Las fuentes puntuales dadas por los efluentes industriales y efluentes cloacales, son relativamente sencillas

de controlar y regular legalmente. Por el contrario, las fuentes difusas dadas principalmente por las escorrentías superficiales en áreas urbanas, agrícolas, de deforestación y de minería a cielo abierto, o debidas a aguas subterráneas contaminadas (por cámaras sépticas, rellenos sanitarios, disposición subterránea de residuos industriales) y deposición atmosférica son mucho más difíciles de controlar y evaluar (Rand, 1995, Botkin y Keller, 2000). Por ejemplo se calcula que a mitad de la carga de metales pesados que reciben los Grandes Lagos de Norteamérica, provienen de la deposición atmosférica (Colin, 2001),

Una vez que alcanzan los sistemas acuáticos superficiales, los metales pueden encontrarse disueltos, en el material particulado, en los organismos o en el sedimento. La distribución entre estos compartimientos, dependerá del metal de que se trate, de las fuentes de contaminación, de la especiación química, de los procesos de transporte, de las transformaciones químicas y biológicas, y de su bioacumulación.

1.b.3. El cadmio en los sistemas acuáticos superficiales.

El cadmio es el elemento número 48 de la tabla periódica, tiene un peso atómico promedio de 112,4 y es el 65avo elemento más abundante en la corteza terrestre. Este metal fue descubierto en incrustaciones de los hornos de cinc por el químico alemán Friedrich Stromeyer en 1817. El cadmio sólo existe como componente principal de un mineral, la greenockita (sulfuro de cadmio), que se encuentra muy raramente. Casi todo el cadmio industrial se obtiene como subproducto en el refinado de los minerales de cinc. El Cd es utilizado en la producción de aleaciones, en estabilizadores plásticos, en electro-platinado y galvanizado, en la fabricación de pigmentos, construcción de baterías y otros numerosos productos. El cadmio puede alcanzar también los ambientes acuáticos a través de los fertilizantes y pesticidas. Los barros cloacales y las cenizas de las plantas de combustión de carbón a menudo contienen Cd y suelen contaminar con este metal los suelos agrícolas cuando se las utiliza como abono. El humo suele contener altos niveles de Cd que es así transportado por la atmósfera en la fase particulada (Hutton, 1983; Newman y Unger, 2003).

De acuerdo a lo anterior, el Cd puede alcanzar los sistemas acuáticos a través de fuentes puntuales como efluentes cloacales, o mediante fuentes difusas, por escorrentías en zonas urbano-industriales, en suelos agrícolas contaminados y minas de zinc, o a través de deposición atmosférica. Por ejemplo en el río Rhin, se ha

observado que para una carga constante del metal, el aumento del volumen de descarga disminuye unas 100 veces la concentración del metal en el material particulado el río (Salomons y de Groot, 1978). La distribución del Cd entre la fase particulada y la disuelta en un sistema acuático depende principalmente del pH. A medida que aumenta el pH, aumenta la adsorción del Cd al material particulado. Se ha observado que el aumento de la proporción de Cd disuelto a menor pH aumenta su biodisponibilidad para el bivalvo *Dreissena* sp. que muestra un incremento en la acumulación del metal (Salomons et al., 1988). En los peces la especie química del Cd que posee mayor biodisponibilidad es el catión libre, que es la especie dominante en aguas dulces óxicas y con bajo contenido de materia orgánica. En estos sistemas se ha observado que la concentración de Ca^{+2} , y en menor grado de materia orgánica, es el parámetro que mayor influencia posee sobre acumulación de Cd en la branquia de los peces. La precipitación de carbonatos e hidróxidos y la formación de complejos solubles con cloruros, sulfatos, carbonatos, e hidróxidos suelen ser de muy poca relevancia en aguas dulces. Algunos de los factores que reducen la forma libre del Cd son el aumento del pH y de la concentración de Cl^- y la reducción del potencial redox del ambiente.

En los ambientes naturales el Cd puede presentar concentraciones de hasta $0,01 \mu\text{g/L}$, pero en ambientes contaminado puede alcanzar hasta varios microgramos por litro o más (USEPA, 2000). Los niveles de Cd hallados en los diferentes componentes de los sistemas acuáticos superficiales vinculados a zonas urbano industriales de nuestro país han mostrado valores relativamente altos de este metal. Los valores máximos (y promedio) hallados en agua total en el Río Reconquista fueron de $11 (4,8) \mu\text{g/L}$ (García et al., 1996). En agua total y sedimento del Río de la Plata (San Isidro) un estudio se hallaron valores de $2 \mu\text{g/L}$ y $1,2 \mu\text{g/g}$ (Villar et al., 1998) y en otro estudio anterior se observaron valores promedios en muestras de agua total tomadas de diferentes zonas del Río de la Plata fueron $1,50 \pm 0,79 \mu\text{g/L}$ (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992). Los valores promedios de Cd hallados en diferentes especies de bivalvos recolectados en el Río de la Plata fueron para *Limnoperna fortunei* de $0,73 \pm 0,41 \mu\text{g/g}$ y para *Corbicula fluminea* de $0,37 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ (Villar et al., 1999) y $1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ (Bilos et al., 1998). Los niveles de Cd en el hígado y el músculo de peces colectados en el Río de la Plata fueron, respectivamente, para *Prochilodus lineatus* $25,7 \pm 16,7$ y $< 0,03 \mu\text{g/g}$ y para *Pterodoras granulosus* $2,3 \pm 3,4$ y $< 0,03 \mu\text{g/g}$. (Villar et al., 2001). De aquí vemos que la concentración de Cd en el agua es aproximadamente 1000 veces menor que en los

sedimentos y en la biota, mostrando así una distribución preferencial en estos dos últimos compartimientos.

Los niveles de Cd en agua total hallados para sistemas dulceacuícolas superficiales vinculados a zonas urbano-industriales muestran valores muy superiores a los esperables para ambientes naturales, indicando cierto grado de contaminación por este metal.

1.b.4. El cromo en los sistemas acuáticos superficiales.

El Cr es el elemento N°24 de la tabla periódica y posee un peso atómico promedio de 52. Es el veintiunavo elemento más abundante en la corteza terrestre. Este elemento fue descubierto en 1797 por el químico francés Louis Nicolas Vauquelin quien lo obtuvo por primera vez en Siberia a partir del mineral crocoita. En un comienzo, este elemento fue utilizado como pigmento. No fue hasta principios del 1800 que Isaac Tyson halló cromita en las proximidades de Baltimore que la industria del cromo comenzó expandirse (Udy, 1956). En la actualidad el 80% del cromo producido es empleado en aplicaciones metalúrgicas (principalmente producción de acero inoxidable), el 15% es utilizado en la manufactura de compuestos del metal y el 5% restante en aplicaciones como material refractario. A nivel de los países occidentales, la utilización de los compuestos químicos del cromo en la industria se distribuye en un 40% en el curtido de cueros, 17% para cromado, 15% para la preservación de maderas, 15% en la fabricación de pigmentos, 3% en materiales refractarios y 10 % en otros usos. En el cutidos de cueros se utiliza un compuesto soluble de cromo trivalente, para la preservación de la madera se utiliza dicromato de sodio o el ácido crómico, y para el cromado pueden usarse uno u otro invariablemente (Barnhart, 1997).

En los sistemas acuáticos, el cromo puede provenir tanto de fuentes naturales como antrópicas. Las fuentes naturales de cromo pueden ser a partir de la meteorización de las rocas, de la deposición húmeda o seca desde la atmósfera, y de la escorrentía desde el sistema terrestre. Incrementos locales de los valores de cromo se deben principalmente a fuentes antrópicas como las descargas a partir de la industria metalurgica, del cromado, de la curtiembre, de la preservación de la madera, de la fabricación de pinturas, y otras industrias químicas (Nriagu, 1988).

Según Barnhart (1997), el cromo posee tres características químicas fundamentales que explican su comportamiento en el ambiente y su papel en la salud humana: i) El cromo puede poseer todos los estados de oxidación desde -2 a +6, pero en la naturaleza el cromo trivalente es la forma más abundante, ii) las demás formas tenderán a convertirse en óxido de cromo trivalente en contacto con los ambientes naturales y iii) aunque en el ambiente el óxido de cromo trivalente no es termodinámicamente estable, este reaccionará de manera extremadamente lenta. El cromo hexavalente en la naturaleza es encontrado sólo rara vez y en ambientes muy localizados, por lo cual su presencia en el ambiente es señal de actividad antrópica.

Se ha observado que la concentración de los metales en los ríos está determinada por las descargas. Por ejemplo, para el río Rhin, se ha hallado que para una carga constante de Cr, el aumento del volumen de la descarga reduce la concentración de este elemento en el material particulado, probablemente como consecuencia del efecto de dilución y del menor tiempo de residencia.

El número y tipo de especies químicas de cromo presentes en los efluentes dependerán del carácter de cada proceso industrial. En las aguas naturales el cromo puede ser encontrado básicamente en dos estados de oxidación, Cr(III) y Cr(VI). La presencia de una u otra o de la relación entre ellas dependerá de procesos tales como transformaciones redox inducidas química o fotoquímicamente, precipitación/disolución y adsorción/desorción. Bajo condiciones anóxicas o subóxicas, Cr(III) es la forma dominante. En soluciones acuosas bien oxigenadas, el Cr(III) es la forma termodinámicamente más estable a $\text{pH} < 6$, mientras que a $\text{pH} > 7$ lo es el CrO_4^{-2} , a pH intermedios el predominio de una u otra dependerá de la concentración de oxígeno. Sin embargo en aguas naturales superficiales, la especie química dominante no sólo dependerá del pH o del O_2 , sino que también lo hará de la concentración de agentes oxidantes, reductores y complejantes naturales presentes en el agua. Este hecho explica porque el Cr(III) suele ser la especie dominante aún en los cuerpos de agua superficiales (Chuecas y Riley, 1966; Cranston y Murray, 1978, 1980; Pettine *et al.*, 1991; Kieber y Helz, 1992). También puede ocurrir lo contrario, puesto que en condiciones naturales donde la forma dominante es el Cr(III), se ha observado que éste puede ser oxidado fácilmente a Cr(VI) en presencia de óxidos de manganeso (Schroeder y Lee, 1975; Bartlett y James, 1979; Nakayama *et al.*, 1981a; Pettine y Millero, 1990; Johnson y Xyla, 1991; Richard y Bourg, 1991).

En las aguas naturales, el Cr(III) tiende a formar complejos aqua/hidroxo que se adsorben fuertemente a las partículas inorgánicas (Rai et al., 1989; Masscheleyn et al., 1992), por el contrario, el Cr(VI) es sólo débilmente sorbido sobre superficies inorgánicas y por lo tanto posee mayor movilidad y biodisponibilidad. Además, el Cr(III) tiende a formar complejos con la materia orgánica (aminoácidos, ácidos fúlvicos y húmicos), que si bien evitan la precipitación del $\text{Cr}(\text{OH})_3\text{aq}$, remueven al metal de la solución (Nakayama et al., 1981b; Masscheleyn et al., 1992; Kaczynski y Kieber, 1994).

El comportamiento de las especies químicas del cromo en los efluentes puede ser algo diferente al observado en las aguas naturales, como consecuencia de las propiedades fisicoquímicas particulares que presente el efluente y que serán características para cada tipo de industria. Por ejemplo, mientras el Cr(VI) será la forma dominante en efluentes provenientes de industrias metalúrgicas, del cromado, refractaria y de la producción y aplicación de pigmentos y pinturas, el Cr(III) lo será en los efluentes provenientes de las curtiembres, textiles (tinturas) y cromado decorativo (Nriagu, 1988). La especie química utilizada en el proceso industrial puede ser modificada por las condiciones fisicoquímicas del efluente. Así por ejemplo efluentes de curtiembres, donde el Cr(III) es la especie esperada, las reacciones de oxidación-reducción en el medio pueden incrementar las concentraciones de la forma hexavalente del cromo (Kotas y Stasicka, 2000).

La concentración media de cromo en ríos y lagos se encuentra en el intervalo de 0,03 a 5,20 $\mu\text{g/L}$ (Kaczynski y Kieber, 1993; Beaublen et al., 1994; Handa, 1998), aunque en sitios contaminados puede ser mucho mayor. En varios estudios realizados en América Latina se ha observado que los niveles de cromo en los sedimentos de zonas costeras aumentan en relación a zonas urbano industriales, con niveles de hasta 795 $\mu\text{g/g}$ (peso seco) de sedimento (Seeliger et al., 1988). En nuestro país, se han hallado niveles de cromo en el sedimento de arroyos costeros tributarios del Río de la Plata de hasta 86,2 $\mu\text{g/g}$ (peso seco) de sedimento (Ronco et al., 2001), con valores extraordinariamente altos en la desembocadura del Riachuelo donde estos valores fueron de hasta 2.046 $\mu\text{g/g}$ (peso seco) de sedimento (Kreimer et al., 1996). Para el Río de la Plata, los niveles promedios (y máximos) de cromo hallados en el material en suspensión fueron de 203 ± 139 (408) $\mu\text{g/g}$ (Bilos et al., 1998), en los sedimentos fueron de 21 ± 4 (27) $\mu\text{g/g}$ (Bilos et al., 1998) y $83,7 \pm 49,2$ (192) $\mu\text{g/g}$ (Villar et al.,

1998) y en agua total $6,9 \pm 9,7$ (35) $\mu\text{g/L}$ (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992), y $42,6 \pm 184,2$ (4100) $\mu\text{g/L}$ (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997) y $44,2 \pm 30,1$ (102) $\mu\text{g/L}$ (Villar et al., 1998). Los niveles de Cr acumulados en la biota del Río de la Plata, muestran valores promedio (y máximos) para *C. fluminea* de $5,2 \pm 2,8$ (11) $\mu\text{g/g}$ y menores a $0,5 \mu\text{g/g}$ para el hígado de *P. lineatus* y *P. granulosus* (Villar et al., 2001).

Las concentraciones en sedimentos y material suspendido son comparables con los niveles hallados para ríos vinculados a zonas urbano-industriales de otras partes del mundo (Bilos et al., 1998) y los valores en el agua muy superiores a los valores promedio mencionados previamente, dando señales de contaminación por teste metal en sistemas acuáticos de nuestro país.

1.b.5. Los peces como comunidad representativa de los ecosistemas acuáticos, recurso económico para el hombre y sensores de contaminación.

Los peces son considerados una comunidad en si misma dentro de los ecosistemas acuáticos, debido a que poseen una estructura definida y ocupan una gran diversidad de nichos ecológicos. Los peces pueden ocupar diferentes posiciones en las redes tróficas, pudiendo ser fitoplanctófagos (consumidores de primer orden; ej. *Bryconamericus iheringi*), zooplanctófagos (consumidores de segundo orden, ej. *Odontesthes bonariensis*), piscívoros (consumidores de tercer orden; ej. *Hoplias malabaricus*), o detritívoros. De acuerdo al los ambientes que ocupen, estos pueden ser bentónicos (*Loricarichthys anus*), bentopelágicos (*Cyprinus carpio*) o pelágicos (*Odontesthes bonariensis*). Además, en los lagos templados, los peces constituyen la mayor biomasa y por lo tanto el mayor pool de nutrientes. Desde el punto de vista socioeconómico los peces representan uno de los recursos más importantes de los sistemas acuáticos, debido a la importancia de su pesca con fines comerciales, ornamentales y deportivos, y de su producción a través de la acuicultura (Suter et al., 1999).

Probablemente por su importancia ecológica y socioeconómica, los peces han sido utilizados en como organismo de experimentación por aproximadamente 200 años. Además, han sido históricamente los primeros organismos acuáticos utilizados para evaluar el efecto de sustancias tóxicas sobre los sistemas acuáticos. Uno de los primero trabajos donde se utilizaron peces en estudios de toxicidad fue realizado por

Penny y Adams en 1863 (Hunn, 1989). Estos autores evaluaron los efectos de sustancias químicas utilizadas como tinturas sobre *Leuciscus phoxinus* y *Carassius auratus* en mas de 400 experimentos de laboratorio con 71 sustancias químicas diferentes (Penny y Adams en 1863). Desde entonces y hasta la década del '40, se recomendó a *Carassius auratus* como organismo de ensayo e introdujo el concepto de tiempo letal (Powers, 1917), se identificaron los factores relativos a los organismo y al agua de dilución necesarios de considerar al realizar ensayos con peces (Belding, 1927), se observó el efecto del aumento de la concentración de un tóxico sobre la tasa respiratoria y cardiaca de los peces (Steinmanm, 1928), se realizaron los primeros ensayos de campo con peces enjaulados y se observaron para un tóxico los mismos efectos en el campo y en el laboratorio (Carpenter, 1930), se relacionaron efectos observados a campo y en laboratorio con modos de acción descriptos para más de 114 tóxicos (Ellis, 1937), y se documentan los efectos protectores del calcio sobre la toxicidad del Pb y Zn en *Gasterosteus aculeatus* (Jones, 1938).

Durante la década del '40 los y '50, se utilizan los bioensayos con peces en la realización de programas para evalúa la toxicidad de sustancias a gran escala, mediante la realización de ensayos estáticos utilizando recipientes de 5 galones, dando lugar a lo que se conoció como la era de los "pickle-jar biologist" (Hunn, 1989). Algunos ejemplos fueron los programas de la US Public Health Service para evaluar principalmente los efectos de los pesticidas organoclorados y otros contaminantes sobre los sistemas acuáticos dulceacuícolas (Tarzwell, 1978), los estudios realizados por el US Fish and Wildlife Service Laboratory para evaluar la toxicidad de más de 4000 sustancias químicas sobre seis especies de peces (Wood 1953, Hollis y Lennon 1954), y el programa de la Hammond Bay Biological Station od the US Fish and Wildlife Service en el que se estudiaron más de 4000 sustancias químicas para la selección de un tóxico para controlar a las lampreas (*Petromyzon marinus*) en los grandes lagos (Applegate *et al.*, 1957).

En 1954, los bioensayos con peces representaron la base del primer protocolo de la "American Society for Testing and Materials" (ASTM) para evaluar toxicidad acuática (ASTM, 1954) y en 1960 la American Public Health Association (APHA) incluyó los bioensayos de toxicidad con peces en su reconocido libro "Standard Methods" (APHA-AWWA-WEF, 1998). En la década de 1970, los datos de toxicidad aguda en peces fueron aceptados en los Estados Unidos, como parámetro válido en la legislación y

como niveles guía para control de la contaminación acuática (Rand, 1995). Desde entonces y hasta la actualidad los ensayos con peces han sido utilizados con múltiples propósitos en la toxicología acuática.

Odontesthes bonariensis (Cuvier y Valenciennes, 1835), es un pez plantófago, característico del sector meridional de la Cuenca del Plata que ha sido luego introducido antrópicamente en otros cuerpos de agua de nuestro país y de otras partes del mundo. Comúnmente conocido como pejerrey, es un de los peces dulceacuícolas de mayor valor económico de la Argentina, debido su pesca comercial y deportiva. Además, es considerada una especie muy promisoría para la acuicultura debido a la preciada calidad de su carne. A su vez, es una de las especies para la cual se cuenta con mayor información sobre su biología y se han descripto pautas básicas de su cría. El pejerrey, se encuentra filogenética, morfológica y ecológicamente relacionado con el "silverside" norteamericano, *Menidia beryllina*, una especie ampliamente utilizada en bioensayos de toxicidad y que cuenta con protocolo normalizado, donde además se establecen detalladamente las condiciones de su cría en condiciones de laboratorio.

De acuerdo a los criterios de selección de organismos de ensayo y a las características mencionadas previamente, el pejerrey, se presenta como una especie muy adecuada para realizar estudios de toxicidad en la Argentina.

1.b.6. La ciencia en la generación de conocimiento sobre los mecanismos de acción y de herramientas de valuación de los efectos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos.

Desde la óptica científica, el estudio sistemático del efecto de los contaminantes sobre los sistemas acuáticos se remonta al siglo XIX, siendo uno de los primeros estudios de toxicidad el realizado por Penny y Adams en 1863 para evaluar más de 71 compuestos químicos utilizados en tintura. Sin embargo, no fue hasta 1940 y 1950 que la preocupación por el efecto de los residuos y de las sustancias químicas sobre la biota se convirtiera en un tema público. Durante ese período, los estudios de laboratorio más difundidos fueron los ensayos de toxicidad aguda con peces y cladóceros, utilizados para evaluar la toxicidad de diferentes compuestos (ej. organoclorados) y establecer criterios de calidad de las aguas. En 1954, la "American Society for Testings and Materials" (ASTM) diseñó el primer protocolo para los ensayos de toxicidad acuática y en 1960 estos ensayos son incluidos por la "American Public Health Association"

(APHA) en su conocido libro, "Standard Methods". Durante 1970 hubo un incremento en el número, variedad y complejidad de ensayos, realizándose los primeros en microcosmos. En estos años, se dirigió la atención a los efectos subletales y a los estudios de evaluación de riesgo. En la década de los '80, se desarrollaron ensayos a microescala para el análisis de efluentes y de otras sustancias químicas, se continuó en el perfeccionamiento de las evaluaciones de riesgo, y se realizaron grandes avances en el estudio cuantitativo de las relaciones estructura-actividad (QSARs) de los compuestos orgánicos. Durante ésta década, la toxicología acuática dió un giro desde los estudios con una sola especie a un enfoque multiespecífico y al estudio de los ecosistemas. Los estudios de campo adquieren gran auge, especialmente en relación al biomonitoreo de cuerpos receptores, lo que lleva al desarrollo de los bioindicadores, índices de integridad y biomarcadores. Este enfoque continuó profundizándose durante toda la década del '90, trabajando con baterías de biomarcadores, o aún más, integrando respuestas provenientes de diferentes niveles de organización (Rand, 1995). En la actualidad el estudio de biomarcadores ha derivado en la evaluación del efecto de los contaminantes sobre los patrones de expresión global del genoma y los patrones de síntesis proteica de toda la célula.

Los ensayos de *toxicidad letal aguda* son los primeros estudios que se realizan cuando se requiere conocer la toxicidad de una sustancia sobre una especie determinada (APHA-AWWA-WEF, 1998). Estos estudios son importantes porque permiten: i) estimar el límite máximo tolerable para una sustancia determinada, ii) evaluar la toxicidad relativa de un gran número de compuestos, iii) evaluar la sensibilidad relativa de diferentes organismos frente a una determinado compuesto, iv) evaluar la influencia de las características del agua (pH, dureza, salinidad, OD, MO) sobre la toxicidad de un compuesto, y v) desarrollar y entender la relaciones dosis-respuesta y tiempo-respuesta (Rand, 1995). En particular, se ha observado que la toxicidad letal aguda de los metales pesados como el Cd(II) y el Cr(VI) puede presentar variaciones importantes dependiendo de características del organismo (especie, edad, tamaño) y del agua.

El estudio de la *bioacumulación* (o más específicamente de bioconcentración) de los contaminantes, está dirigido a comprender las dos fases iniciales del proceso toxicológico, la naturaleza de la exposición (ej. biodisponibilidad) y de la toxicocinética del contaminante (velocidad y magnitud con la que el contaminante es incorporado, distribuido, metabolizado, eliminado). El conocimiento de los niveles del contaminante

en los tejidos permite a su vez evaluar la magnitud de una respuesta biológica en relación directa con la cantidad del tóxico en el tejido blanco y no indirectamente a partir del medio de exposición. En ecotoxicología esta estrategia de estudio se denomina enfoque del residuo corporal crítico (CBR, critical body residue), de la cual el concepto de contenido corporal letal (LBBs, letal body burdens) representa un caso específico (McCarty y Mackay, 1993). Algunas ventajas de este enfoque son: i) considera la biodisponibilidad explícitamente, ii) evalúa la toxicocinética, reduciendo la posibilidad de confusión por el efecto del tiempo de exposición, iii) expresa la potencia del tóxico en una forma menos ambigua, facilitando la identificación e investigación de diferentes modos de acción, iv) toma en cuenta los efectos del metabolismo sobre la acumulación del tóxico, v) permite la verificación experimental de la exposición (Rand, 1995). En los organismos acuáticos, la incorporación de los metales ocurre principalmente a nivel de la branquia, dependiendo su magnitud de la especie química que éste presente. A diferencia de otros contaminantes, los metales no pueden ser degradados metabólicamente, por lo tanto, el mecanismo de detoxificación más común que presentan los organismos es su complejación mediante proteínas específicas, que en la mayoría de los organismos es llevada a cabo principalmente a nivel del hígado. Esto lleva a que en mayor o menor grado los metales se bioconcentren en los organismos vivos. Las vías de excreción más comunes son, a través de la orina en el riñón y de la bilis en el hígado (Deb y Fukushima, 1999).

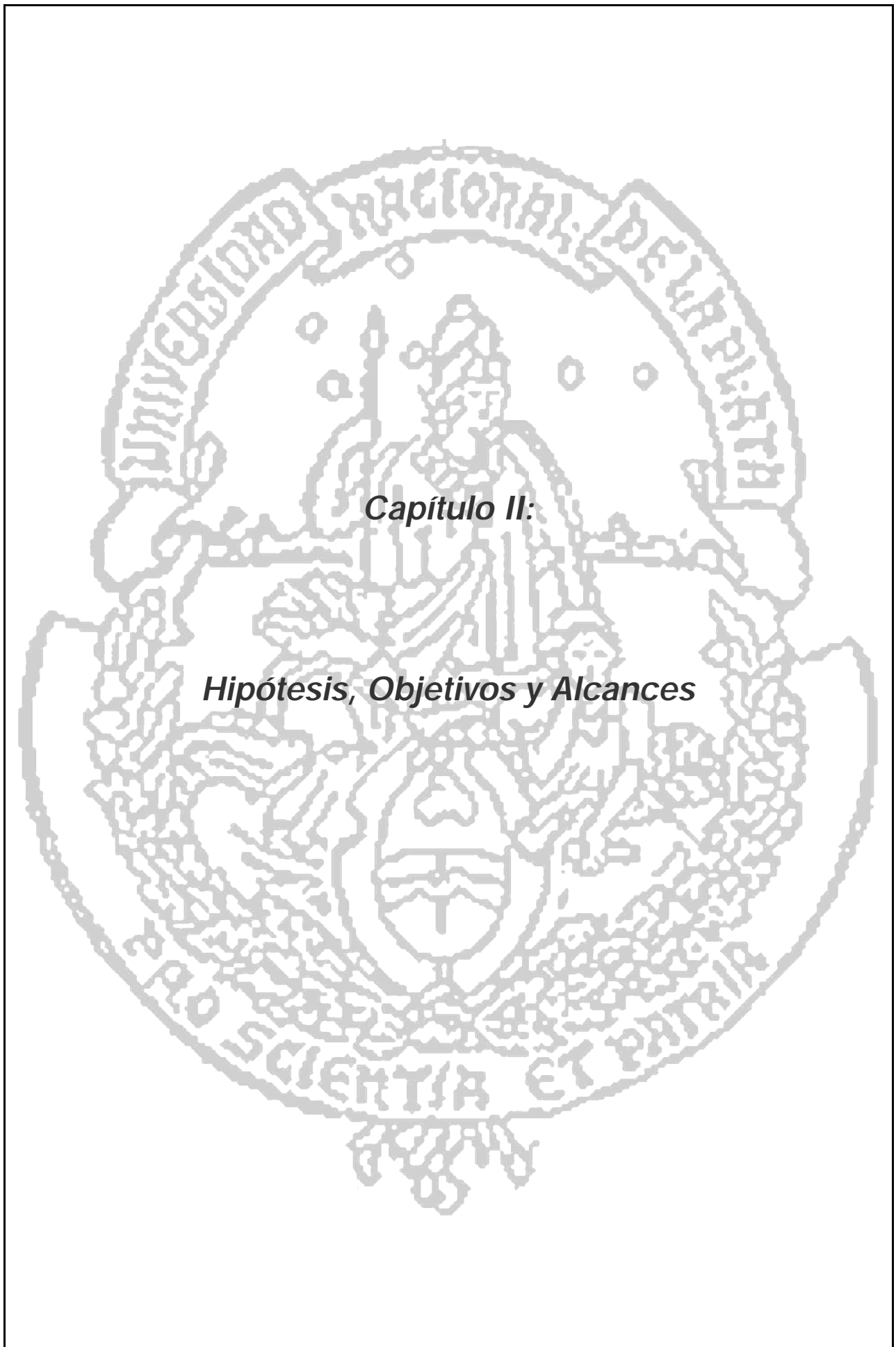
El estudio de los *efectos subletales*, incluye la evaluación de un gran número de respuestas biológicas a diferentes niveles de organización en organismos expuestos a concentraciones por debajo de aquellas que producen la muerte somática directa (Newman y Unger, 2003). En particular, aquellas respuestas a nivel histológico, fisiológico, bioquímico y molecular, pueden ser utilizadas como biomarcadores de efecto y/o exposición a contaminantes (McCarthy y Shugart, 1990).

Los *biomarcadores* proveen evidencia sobre si los organismos han sido expuestos a concentraciones de compuestos tóxicos que exceden la capacidad de detoxificación y reparación, y que han inducido respuesta de sus blancos celulares o moleculares, actuando como señales de alerta temprana (rápida y sensible). Algunas de las cualidades de un buen biomarcador son: i) ser evidenciable antes que cualquier efecto adverso irreversible ocurra a niveles de organización biológica mayores, ii) ser evaluable mediante metodologías rápidas, poco costosas y de fácil acceso, iii) poder

ser sometido a normas de control de calidad y garantía de calidad, iv) ser específico para una clase de tóxico, aunque biomarcadores no específicos poseen valor también, v) guardar una relación dosis-respuesta clara, vi) ser aplicable a un amplio conjunto de especies centinela, vii) indicar una disminución en alguna capacidad adaptativa del organismo (mejora su relevancia ecológica), aunque no siempre es necesario, viii) ser bien conocida su biología, de modo de poder comprender la influencia de otros factores propios del organismo o del ambientales y ix) ser, en lo posible, no destructivo (McCarthy y Shugart, 1990; Newman y Unger, 2003).

El nucleolo es el dominio nuclear donde ocurre la biogénesis de los ribosomas. La estructura del nucleolo es altamente dinámica y refleja la actividad del mismo (Mélèse y Zhixiong, 1995). El número de nucleolos depende de la cantidad de NORs (regiones organizadoras de nucleolo) activas y del grado de agregación de las mismas, mientras que su tamaño reflejará el grado de actividad nucleolar. El comportamiento de la actividad nucleolar normal en los peces, en función de su genoma, edad y maduración sexual, ha sido previamente estudiado (Arkhipchuk, 1999). Además, y se ha observado que la regulación de la biogénesis de los ribosomas es afectada por factores ambientales (Leary y Huang 2001). Recientemente, se ha observado *in vitro* que el nucleolo es capaz de actuar como un sensor de estrés (Rubbi y Milner, 2003). El grado de actividad nucleolar reflejada por parámetros morfológicos como el tamaño y el número de nucleolos por célula, puede ser evaluada de manera sencilla mediante técnicas histológicas de rutina (Howell y Black, 1980), que además, poseen la ventaja de poseer un bajo costo y de poder ser llevadas a cabo en cualquier laboratorio donde se cuente con un microscopio. Asimismo, la metodología requiere de pequeñas porciones de tejido que pueden ser eventualmente extraídas del organismo sin necesidad de sacrificarlo.

Dado que el principal blanco sobre el cual actúan los metales son las proteínas y los ácidos nucleicos, y que la principal función del nucleolo es la biosíntesis de los ribosomas, que representan la maquinaria molecular para la síntesis de las proteínas a partir de la información provista por el ADN, en consecuencia es posible que la actividad nucleolar responda a los efectos subletales inducidos por los metales, producto de la interferencia causada sobre las funciones biológicas de éstas macromoléculas.



Capítulo II:

Hipótesis, Objetivos y Alcances

Capítulo II. Hipótesis, Objetivos y Alcances

De acuerdo a los antecedentes expuestos donde queda claro que la contaminación ambiental es uno de los desafíos a enfrentar por la humanidad en los próximos años para lograr el tan anhelado "desarrollo sustentable" y que son necesarias herramientas para evaluar el estado de los recursos naturales.

Sabiendo que los metales pesados suelen ser contaminantes frecuentes en los sistemas acuáticos superficiales y que existen casos donde el Cd y el Cr han producido problemas de contaminación.

Considerando que los peces constituyen un componente biótico sobresaliente de los sistemas acuáticos, que además representan un recurso socioeconómico importante y que poseen una larga historia como organismos de ensayo en ecotoxicología.

Teniendo en cuenta que el pejerrey (*O. bonariensis*) es un pez dulceacuícola característico del sector meridional de la Cuenca del Plata que posee importancia socioeconómica regional y que, pese a ello, hasta el momento se desconoce cual es su sensibilidad y los posibles efectos adversos que contaminantes ambientales tales como el Cd y el Cr, pueden inducir sobre la especie.

Debido a la utilidad que demuestran los estudios donde se evalúan integradamente los efectos de los contaminantes a diferentes niveles de organización y a distintos grados de exposición para la interpretación de los posibles modos de acción de dichos contaminantes, y teniendo en cuenta la necesidad de desarrollar herramientas bioanalíticas de bajo costo que permitan detectar respuestas que actúen como señales de alerta temprana en organismos expuestos a los mismos.

Dado el enclave metabólico de las funciones del nucléolo vinculado a la síntesis de las proteínas, agregado a la afinidad que los metales poseen con éstas y a la consecuente susceptibilidad de ser afectadas por la acción tóxica de los mismos. A la relación morfofuncional que presenta el nucléolo, que permite la evaluación de su actividad mediante métodos histológicos de rutina, y a las evidencias que sugieren que este dominio nuclear posee la capacidad de actuar como posible sensor de estrés celular.

En el presente trabajo, se propone la siguiente **hipótesis general** de estudio:

"El Cd(II) y el Cr(VI) se bioconcentran e inducen respuestas biológicas a nivel letal y sublethal (sobre la actividad nucleolar branquial y hepática) en Odontesthes bonariensis expuesto a concentraciones ambientalmente relevantes de estos metales en el agua".

Esta hipótesis general puede ser desglosada a su vez en las siguientes **hipótesis particulares**:

- i) El Cd y Cr se bioconcentran en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* en función del tiempo, los niveles de exposición y del tipo de tejido.
- ii) *O. bonariensis* es una especie sensible al Cd y el Cr, y los efectos tóxicos se manifiestan diferencialmente dependiendo de cada metal, de las características fisicoquímicas del agua, y de la edad y el origen de los organismos.
- iii) Los parámetros morfológicos nucleolares NTP y VTP (indicadores de la actividad nucleolar) en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* responden frente a la exposición de los peces a concentraciones subletales de Cd y Cr, actuando como posibles biomarcadores de contaminación.
- iv) La evaluación integrada de los patrones de bioconcentración, los efectos letales y los efectos subletales, en el contexto del marco teórico preexistente, permite una mejor comprensión de los posibles modos de acción del Cd y Cr en el pejerrey.

De acuerdo con la hipótesis planteada, el **objetivo general** perseguido en el presente trabajo de tesis fue:

Evaluar de manera integrada diferentes respuestas biológicas en *Odontesthes bonariensis* expuesto a concentraciones letales y subletales de Cd y Cr en el agua, con el fin de conocer la sensibilidad de la especie frente a estos metales y de hallar señales que permitan identificar tempranamente respuestas de estos organismos a dichos metales.

En particular, los esfuerzos estuvieron centrados en:

- i) desarrollar un sistema de **cría del pejerrey** en condiciones de laboratorio dirigido a su utilización en bioensayos de toxicidad y a otros estudios sobre su biología.
- ii) determinar los patrones de **bioconcentración** de estos metales pesados en función de su concentración en el agua y del tiempo de exposición en la branquia y el hígado, dos órganos de vital importancia para los efectos tóxicos de estos dos metales.
- iii) establecer la sensibilidad de la especie a estos metales mediante la evaluación de los **efectos letales**, estimados a partir de las concentraciones que causan en la población un 50% de mortalidad (LC50), y de su dependencia con el tiempo de exposición, las características del agua, y la edad y origen de los organismos.
- iv) evaluar las respuestas a nivel de la **actividad nucleolar** en la branquia y el hígado como señales de alerta temprana (biomarcador) de efectos subletales de los metales estudiados.

Los aspectos inéditos de los **alcances esperados** del presente trabajo de tesis son:

- i) Desarrollar un **sistema de cultivo a escala de laboratorio** para el pejerrey, que posibilite la realización de un mayor número de **estudios experimentales** sobre la biología de la especie.
- ii) Desarrollar un **protocolo para la realización de ensayos de toxicidad** con el pejerrey que pueda ser utilizado tanto en el ámbito de la investigación como de la gestión.
- iii) Generar **información** sobre el patrón de bioconcentración, los niveles letales y subletales del Cd y Cr para el pejerrey, que permitan una mejor comprensión de los **aspectos toxicológicos básicos** de estos metales para la especie, otorgando además **niveles de referencia** a los cuales pueden esperarse efectos letales y subletales inducidos éstos, que puedan ser utilizados para planificar **nuevos estudios toxicológicos**, o desde la **gestión**.

- iv) Generar **información** sobre la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de peces expuestos a Cd y Cr, evaluando la posibilidad de su utilización como **biomarcador de respuesta y/o efecto** frente a la exposición de los pejerreyes a los metales estudiados tanto en condiciones de laboratorio como en exposiciones a campo.

- v) Proporcionar un **enfoque novedoso**, donde se integren los diferentes efectos inducidos por el Cd y Cr sobre *O. bonariensis*, permitiendo una mejor interpretación y comprensión de los mecanismos de acción de estos metales sobre la especie y en relación a los diferentes niveles de exposición.

- vi) Realizar una **evaluación** sobre zonas de mayor **vulnerabilidad** de la especie a los metales estudiados en base a los datos de letalidad y subletalidad obtenidos en el presente estudio, su relación con variables fisicoquímicas (ej. dureza, pH), y las concentraciones de ambos metales y las características fisicoquímicas, publicadas por otros autores, para diferentes cuerpos de agua en que habita la especie, que pueda ser utilizado conjuntamente con lo expuesto en el punto iii) como base para la protección y conservación de la especie.



Capítulo III:

Las bases experimentales

Capítulo III. Las bases experimentales

Luego de planteada la hipótesis de trabajo y los objetivos generales del estudio, el presente capítulo tiene como objeto: i) presentar y justificar la elección de la especie de estudio, ii) establecer el enfoque metodológico general y las estrategias experimentales utilizadas para someter a prueba la hipótesis planteada, y iii) describir las condiciones experimentales generales utilizadas en el estudio. Los detalles metodológicos y las técnicas particulares utilizadas para determinar la acumulación de los metales en los tejidos y evaluar los efectos letales y subletales, serán especificados en los capítulos pertinentes.

III.a Los peces como modelo de estudio. El "pejerrey" la especie seleccionada.

Los peces han sido utilizados como modelos en ensayos de toxicidad tempranamente desde años previos a la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), con el objeto de investigar sobre la toxicidad de los metales y de otra amplia variedad de materiales (Hunn, 1989). Los ensayos de toxicidad con peces fueron la base del primer protocolo realizado por la *American Society for Testing and Materials* (ASTM) para los ensayos de toxicidad acuática (ASTM, 1954), y desde 1960, estos han sido incorporados por la *American Public Health Association* en su publicación "*Standard Methods*" (APHA, 1960; APHA, AWWA, WEF, 1998).

Este particular interés por el uso de los peces en ensayos de toxicidad probablemente radique, por un lado, en que estos representan un recurso natural importante para el hombre, y por otro, a que es el único grupo de vertebrados cuyo ciclo de vida es completamente acuático y por lo tanto, algunos efectos de los contaminantes sobre ellos, pueden ser en cierta medida extrapolados en el hombre.

Las especies más comúnmente utilizadas en los estudios de toxicidad con peces, corresponden a aquellas de distribución Holártica, como los salmónidos, y contrariamente, es poco lo que se conoce acerca de las especies Neotropicales. En el presente trabajo, se ha escogido como modelo de estudio a *Odontesthes bonariensis*, por tratarse de una especie característica del sector meridional de la Cuenca del Plata que posee una gran importancia socioeconómica debido a la calidad de su carne y la atracción de su pesca deportiva (Bonetto y Castello, 1985).

Vulgarmente conocido como "pejerrey", nombre que significa "pez de reyes" y fuere acuñado por viajeros y naturalistas europeos ya a fines del siglo XVIII a los peces del género *Atherina*, haciendo alusión a un pez europeo muypreciado por los monarcas españoles, *Odontesthes bonariensis* es un pez óseo (Clase: Osteictio, Subclase: Actinopteri; Superorden: Teleósteos) perteneciente al orden de los Atheriniformes y más específicamente a la familia de los Atherinidae. Esta especie fue descrita por vez primera en 1835 por Cuvier y Valenciennes basada en material colectado por la expedición "Voyage del'América Meridionale", con el nombre de *Atherina bonariensis*. Desde entonces, debido a la complejidad que desde el punto de vista sistemático ha representado el orden de los Atheriniformes (Dyer, 1993; Dyer y Chernoff, 1996), la especie ha cambiado de nombre sucesivamente hasta que en 1985 fuera incluida y posteriormente confirmada en el género *Odontesthes* (White, 1985; García, 1987; Dyer, 1993; Dyer y Chernoff, 1996).

Desde el punto de vista de su origen, *O. bonariensis* pertenece a un grupo de peces de abolengo marino que secundaria y recientemente, en términos evolutivos, se ha adaptado por completo al medio dulceacuícola (Ringuelet et al, 1967). Utilizando el estuario de río de la Plata y sus afluentes como vía de acceso, ésta especie ha colonizado y logrado reproducirse exitosamente en ríos y lagunas de la región, constituyéndose así en un pez propio del sector meridional de la cuenca del Plata. Por tal motivo, el "pejerrey" puede ser visto como un intruso de filiación marina que colonizare exitosamente las aguas dulces de la parte baja de la cuenca de Plata, donde ha tenido que competir con la compleja diversidad faunística de origen hílico (guayano-brasílica), erémico y mesófilo (andino-patagónica) que conforma el gigantesco ecotono correspondiente al dominio Pampásico y que constituye el límite meridional de la Provincia ictiográfica Parano-Platense (Figura III.1) perteneciente a la Subregión Brasílica (Mac Donagh, 1934; Ringuelet, 1975; Canevari et al., 1988). Más precisamente, su distribución natural se corresponde con ríos y cuerpos de agua someros de la región pampeana, donde es especialmente abundante, Río de la Plata y ríos Uruguay y Paraná donde aparentemente no sobrepasaría septentrionalmente las localidades de Corrientes o Posadas en Argentina. Sin embargo, por introducción antrópica, en la actualidad su distribución se extiende desde el lago Titicaca (Bolivia), y ríos y lagunas del sur de Brasil hasta las aguas patagónicas (Bonetto y Castello, 1985). Además esta especie ha sido introducida en otras regiones del mundo como Japón, Israel, Bélgica, Francia e Italia (Welcome, 1988).



Figura III.1. Regiones ictiogeográficas de América Neotropical y probable distribución original y actual de las poblaciones de *O. bonariensis* en Sudamérica.

Subregión Brasílica: 1. Dominio Magdalena, 2-5. Dominio Orinoco-Venezolano, 6-7. Dominio Guayano-Amazónico, 8-9. Dominio del Pacífico, 10-12. Dominio Andino, 13-14. Dominio del Paraná (15 provincia Parano-Platense), 16-18. Dominio Este de Brasil. Subregión Austral: 19. Prov. Chilena, 20. Prov. Patagónica. 21. Dominio centroamericano (Ringuelet, 1975). Puntos negros, localidades Argentinas para las cuales ha sido citado *O. bonariensis*. (Baigún y Delfino, 1994), área en rojo oscuro: probable distribución original, área en rojo claro: distribución actual en Latinoamérica según Bonetto y Castello (1985).

Morfológicamente (Figura III.2.) se trata de un pez de cuerpo grácil, de aspecto subcilíndrico y marcadamente hidrodinámico, con una peculiar curvatura ventral en la región posterior. Su cabeza se caracteriza por la presencia de ojos bien desarrollados, la configuración particular de sus maxilares, y la boca protráctil. Las branquiespinas en el primer arco branquial junto al número de escamas en su estola representan uno de los caracteres sistemáticos más relevantes (García, 1987). Su coloración, típica de peces pelágicos, es bifásica con la región dorsal oscura que puede ir del verde a un marrón rojizo y la ventral blanca con iridiscencias azuladas, ambas regiones separadas en el flanco por una estola plateada muy notable. El extremo de su aleta caudal suele tornarse de color blanco amarillento en los ejemplares adultos.



Figura III.2. Fotografía de un juvenil de pejerrey (*O. bonariensis*) de 6 meses de edad, como los utilizados para evaluar, en condiciones de laboratorio, efectos subletales de Cd y Cr sobre la especie.

Barra: 1 cm

Al eclosionar, los alevines son transparentes y miden tan sólo entre 3-5 mm pero se desarrollan rápidamente pudiendo alcanzar entre 100 y 200 mm en el primer año, si las condiciones del ambiente son óptimas. La talla máxima promedio alcanzada por los adultos en los cuerpos naturales es de 350-400 mm pero en casos excepcionales pueden llegar a medir hasta 700 mm y pesar hasta 1 kg (Bonetto y Castello, 1985).

El período crítico para la diferenciación sexual del "pejerrey" ocurre entre las semanas 3-5, 2-4, y 1-4 luego de la eclosión a 17, 19 y 27 °C respectivamente y la proporción de hembras varía desde 100% entre los 17-19 °C, 95% a 21 °C; 81,2% a 23 °C; 29,4% a 25 °C y 0% a 29 °C (Strüssmann *et al.*, 1997a). Los machos y hembras de ésta especie ovulípara alcanzan la madurez sexual en el primer año de vida. Una hembra puede desovar desde 2000 huevos en el primer año hasta 45000 en cuarto año de edad. La relación entre el número de ovas y la longitud estándar, en primavera, es de 107 ovas/cm (Calvo y Dadone, 1972). Los huevos tienen 1,2 a 1,6 mm, son de color verde amarillento y poseen filamentos adhesivos que le sirven para adherirse a la vegetación sumergida y evitando así caer al fondo anóxico. El período de freza tiene lugar una o

dos veces al año dependiendo si la población habita en ambientes cerrados como lagunas y embalses (Boschi y Fuster de Plaza, 1959) o abiertos como ríos (Ringuelet, 1943). El mayor desove se produce en primavera (julio-diciembre), lográndose el climax en septiembre y octubre momento en el que intervienen la mayoría de las hembras maduras. El segundo, cuando ocurre, es más breve y se da en el otoño (marzo-abril) e intervienen sólo aproximadamente la mitad de las hembras (Calvo y Dadone, 1972).

Los hábitos alimentarios del "pejerrey" son muy variados dependiendo de la productividad y diversidad de presas ofrecidas por el ambiente y del tamaño de los ejemplares. Debido a la presencia de branquiespinas filtradoras, el "pejerrey" puede acceder a una alimentación de tipo plantófaga; las placas dentarias faríngeas le permiten triturar alimentos sólidos como moluscos y otras criaturas del bentos y la boca protráctil le faculta para capturar insectos, camarones y peces, estas cualidades físicas le permiten explotar diversos sectores y recursos del ambiente. Numerosos trabajos demuestran el amplio espectro en la dieta del "pejerrey", en ellos se cita la presencia de restos vegetales, fitoplancton, microcrustáceos como copépodos y cladóceros (*Bosmina* sp.), camarones (*Palaemonetes* sp.), moluscos (*Litoridina* sp., *Biomphalaria* sp., *Ampullaria* sp., *Diplodon* sp., *Corbicula* sp.) y peces (*Clupea* sp., *Astyanax* sp., *Iheringichthys* sp.) en los contenidos viscerales, variando la frecuencia de cada uno de estos ítems de acuerdo al sitio y a la edad de los ejemplares estudiados (Bonetto y Castello, 1985; Ringuelet, 1942; Boschi y Fuster de Plaza, 1959; Burbidge *et al.*, 1973; Godoy, 1946). El canibalismo es mencionado también como alternativa alimentaria frecuente en ambientes oligotróficos (Ringuelet, 1942).

A pesar de ser un ágil y veloz nadador, el "pejerrey" es un pez no migratorio que habita ambientes dulceacuícolas y preferentemente de aguas frescas. Sin embargo es bien conocida la tolerancia de ésta especie a amplios intervalos de salinidad, e incluso es sabido que concentraciones milimolares de NaCl puede beneficiar su supervivencia (Tsuzuki *et al.*, 2000). Por otro lado, si bien se consideran los 17 °C como la temperatura óptima para su desarrollo (Bonetto y Castello, 1985) la especie suele tolerar las amplias variaciones térmicas (Gómez y Ferriz, 2001) que experimentan los someros cuerpos de agua donde ella habita, que pueden llegar hasta aproximadamente los 30 °C al sucederse varios días de mucho calor y poco viento durante el período estival, hasta los pocos grados de temperatura (Freyre, 1967; Gómez, 1996) que el agua presenta durante las frías noches de invierno.

El carácter eurihalino y euritérmico, sumado a la plasticidad dietaria, la estrategia reproductiva y el rápido crecimiento, colocan al "pejerrey" dentro de las especies consideradas como estrategias de la "r". La alternancia de períodos de sequías e inundaciones que afectan la región (Olivier, 1959), someten a las lagunas a importantes variaciones hídricas que afectan drásticamente las características fisicoquímicas de sus aguas (oscilaciones térmicas, en la turbidez, en el pH, en la salinidad y la dureza) y conduce a repentinos cambios en los primeros niveles tróficos (principal fuente de alimento de la especie), transportando a los cuerpos de agua pampásicos a través de ciclos de aguas claras, turbias y muy turbias (Quirós et al, 2002). Estas particularidades de la especie y del ambiente parecen haberse amalgamado rápidamente en términos evolutivos dándole al "pejerrey" la posibilidad de establecerse exitosamente en éste el medio dulceacuícola y explicando la abundancia que la especie actualmente allí exhibe.

Su presencia en éstos ambientes no ha pasado desapercibida para el hombre quién lo ha erigido como especie emblemática de la región (López y García, 2001; López *et al.*, 2001). La excelente calidad de su carne y la sencillez de su pesca comercial, la facilidad para su piscicultura y su alta demanda, sumado la gran atracción que representa desde el punto de vista de su pesca deportiva, han hecho del "pejerrey" un recurso natural muy importante que hasta el presente sólo ha sido explotado muy por debajo de su potencial real (Bonetto y Castello, 1985).

Su pesca comercial con redes de enmalle en la cuenca del salado se encuentra habilitada en determinadas lagunas como Las Tunas, del Monte y Cueru. El rendimiento obtenido por tales pesquerías, respetando los cupos de extracción, ha sido de sólo 3kg/ha/año (López et al 2001). Estos valores son muy inferiores al potencial productivo estimado para estos ambientes de 100-120kg/ha/año (Olivier, 1959; Ringuelet, 1964; CIC, 1982; Canevari, 1998).

La piscicultura del "pejerrey", si bien iniciada experimentalmente ya en 1904 por el entonces Ministerio de Agricultura de la Provincia de Buenos Aires y luego las etapas para su cultivo descriptas hace ya más de medio siglo por Valette (1910) y Ringuelet (1943), ha evolucionado muy lentamente en nuestro país. Por el contrario, en países como Israel o Japón, la piscicultura del pejerrey ha evolucionado rápida y exitosamente llegando a convertirse en Japón en una de las cuatro especies ictícolas más

importantes y de mayor consumo desde su introducción en 1968 (López y García, 2001).

Indudablemente, de las actividades vinculadas a esta especie, la pesca recreativa y deportiva es la que reviste mayor relevancia desde el punto de vista socio-económico. Más de 1.125.000 personas practican la pesca recreativa o deportiva en la provincia de Buenos Aires (Baigún y Delfino, 1999) generando un importante impacto económico tanto directo como indirecto debido a la generación de fuentes de trabajo y a la demanda de servicios por parte de los usuarios.

El manifiesto valor de esta especie y su carácter emblemático ha hecho que el "pejerrey" sea uno de los peces más estudiados de nuestro país (López y García, 2001; López et al, 2001), haciéndose merecedor de una recopilación bibliográfica propia (López et al 1991) y de cuatro libros (Ringuelet, 1943; Marrero Galíndez, 1950; Grosman, 1995; Grosman, 2001). La mayor parte de los trabajos son estudios de ecología y biología de campo sobre aspectos reproductivos (García Romeu 1964a, 1964b; García Romeu y Cordero Funes, 1964; Dadone y Calvo, 1966; Calvo et al, 1967; Calvo y Dadone, 1972; Calvo y Morriconi, 1972; Calvo *et al.*, 1977; Iwaszkiw y Freyre, 1980), tróficos (Ringuelet, 1942a, 1942b; Cabrera, 1960, 1962; Cabrera et al, 1973; Iriart y Ringuelet, 1966; Destéfanis et al, 1967, 1969; Destéfanis y Freyre, 1972, Ringuelet *et al.*, 1980; Escalante 1985; Aquino, 1991; Grossman, 1995; Grosman y González Castelain, 1996), poblacionales, demográficos o de biología pesquera (Freyre, 1976; Freyre *et al.*, 1983; Freyre y Sendra, 1993; Freyre *et al.*, 1994; Sendra y Colautti, 1997) e incluyendo algunos estudios parasitológicos (Ringuelet, 1943; Szidat y Nani, 1951; Ostrowski, 1964, 1968, 1977). Gran parte del esfuerzo se ha centrado también en el estudio de su cultivo (Valette, 1910; Ringuelet, 1943; González Regalado y Mastrarrigo, 1954; Reartes, 1995), y en especial en la alimentación y densidad de cultivo de las larvas y su efecto sobre la supervivencia y el crecimiento (Luchini *et al.*, 1984; Grosman y González Castelain, 1996).

Exceptuando los estudios sobre histología gonadal realizados por García Romeu (1964a; 1964b), y García Romeu y Cordero Funes (1964), los estudios sobre fisiología, bioquímica o biología celular y molecular en el "pejerrey" son materia relativamente reciente. Quizás hayan sido Freyre *et al.* los pioneros en incurrir en el campo de la

biología experimental cuando en 1981 realizaron un estudio sobre el metabolismo energético del pejerrey.

Recién casi diez años después, desde la Universidad de Pesca de Tokio en Japón, se retoman sistemáticamente los estudios experimentales orientados a mejorar diferentes aspectos relacionados con la piscicultura del pejerrey. Comenzando con estudios vinculados al efecto de factores como la temperatura, el ayuno y la condición nutricional sobre parámetros histológicos en alevines de pejerrey (Strüssmann y Takashima, 1989a; 1989b; 1990). Luego factores ligados a aspectos reproductivos como la movilidad de las gametas (Renard *et al.*, 1994; Strüssmann *et al.*, 1994), el efecto de la temperatura en la determinación del sexo (Strüssmann *et al.*, 1996), y la crioconservación de embriones (Strüssmann *et al.*, 1999). Finalmente, factores asociados al mejoramiento genético por inducción de individuos triploides (Strüssmann *et al.*, 1993), el estudio de marcadores genéticos (Strüssmann, 1997), la caracterización de ADN mitocondrial (Yoshizaki *et al.*, 1997) y aislamiento de microsatélites en *O. argentinensis* y *O. perugiae*, llevado a cabo en Australia (Beheregaray y Sunnucks, 2000).

A estos trabajos se le suman las importantes contribuciones realizados en la Argentina por investigadores del Instituto de Neurociencia y el Laboratorio de Embriología Animal de la Universidad Nacional de Buenos Aires, sobre estudios de la regulación hormonal del crecimiento y la reproducción en el "pejerrey" (Stefano *et al.*, 1997; Vissio *et al.*, 1999; Stefano, 1999; Miranda *et al.*, 2001, Miranda *et al.*, 2002).

El estudio del efecto que los factores ambientales ejercen sobre los peces de la región ha sido pobremente estudiado y sólo pueden mencionarse investigaciones de laboratorio sobre la tolerancia a factores ecológicos extremos (Gómez, 1993, Gómez y Ferriz, 2001; Gómez y Toresani, 1993), la relación entre la química de los cuerpos de agua y la ocurrencia de las diferentes especies (Menni *et al.*, 1996) y sólo recientemente un estudio específico sobre el "pejerrey", donde se evalúa la relación entre factores ambientales y la biomasa relativa de ésta especie en lagos y embalses templado-calidos de la Argentina (Baigún y Delfino, 2001).

La preocupación por las consecuencias de la contaminación en los ambientes acuáticos donde habita la especie no es un nueva (Ringuelet, 1967; Freyre, 1973;

Catoggio, 1990; Ronco *et al.*, 1992; Ronco *et al.*, 1996), sin embargo, los estudios centrados específicamente sobre el efecto que los contaminantes ambientales generan sobre el "pejerrey" son escasos y recientes. Al respecto pueden citarse trabajos donde sólo se publican niveles de concentración de metales pesados para varias especies del Río de la Plata, incluida *O. bonariensis* (Verrengia-Guerrero y Kesten, 1993) y para "pejerreyes" de la laguna de Lobos (Ronco y Argemi, 1998) ó concentraciones de PCB's y compuestos organoclorados en *O. bonariensis* (Menone *et al.*, 2000) pero sin evaluar posibles efectos biológicos sobre los individuos o las poblaciones. La evaluación de respuestas biológicas en "pejerreyes" expuestos a contaminantes ambientales es realmente un campo del conocimiento completamente desconocido para éste organismo, donde sólo se puede mencionar el estudio de Monserrat y Bianchini (2000), sobre la puesta a punto de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa como biomarcador, en una especie muy cercana, *O. argentinensis*.

En resumen, dado que *O. bonariensis* es una especie característica de nuestra región y que representa, no sólo para Argentina sino también para otros países del mundo, un recurso natural de alto valor desde el punto de vista socio-económico, sumado a que en nuestro país es la especie de peces de la cual se dispone mayor información acerca de su biología, ecología y acuicultura, y debido a la evidente necesidad de contribuciones al conocimiento sobre su sensibilidad y respuesta frente a contaminantes ambientales, el "pejerrey" se presenta como un modelo muy adecuado para el presente estudio, donde se pretende evaluar respuestas biológicas a contaminantes ambientales como biomarcadores de efecto en especies de peces características del sector meridional de la cuenca del Plata.

III.b Enfoque Metodológico y Estrategia Experimental

El **enfoque metodológico** escogido para estudiar los efectos biológicos del Cd y Cr sobre *O. bonariensis*, se basa en la evaluación integrada de tres puntos centrales de la ecotoxicología, la acumulación del tóxico, los efectos letales y los efectos subletales. En la Figura III.3. se muestra el diagrama conceptual utilizado para seleccionar las respuestas biológicas estudiadas. En él se grafican la relación entre la exposición y la respuesta a un contaminante. Las flechas indican el sentido dominante de la relación. Los círculos simbolizan la acumulación, principalmente como manifestación a la exposición, y los efectos subletales y letales, principalmente como respuestas al

contaminante. Las superposiciones de los círculos, simbolizan los puntos comunes entre la acumulación, los efectos subletales, y los efectos letales.

Por ejemplo, en un pez expuesto a metales a través del agua, el metal ingresará al organismo y se acumulará en los tejidos en función de la concentración biodisponible del metal en el agua, del tiempo de exposición y del tejido que se trate. Por otro lado, el sobrepaso de ciertos niveles del metal en los tejidos, determinará la aparición de efectos, que según cuán rápida e intensa haya sido la acumulación, serán letales o

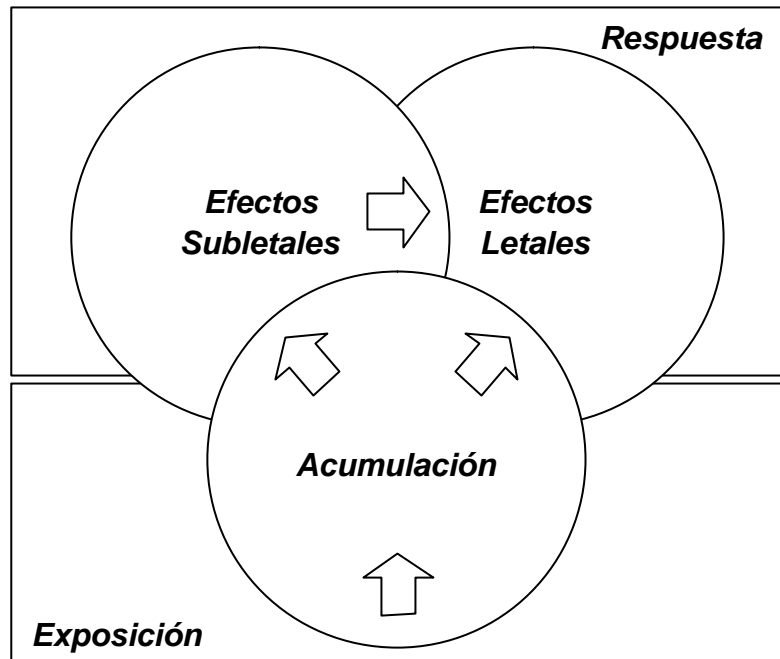


Figura III.3. Diagrama conceptual planteado para la selección de las respuestas biológicas utilizadas para evaluar los efectos tóxicos del Cd y Cr sobre *O. bonariensis*

subletales. Los efectos subletales, pueden a su vez desencadenar indirectamente en efectos letales. La acumulación por si sola, nos informará que el organismo está siendo expuesto, pero no sobre los posibles efectos que podrá ocasionarle. Así mismo, los efectos letales y subletales nos indicarán únicamente la toxicidad del metal respecto a su concentración en el agua, pero nada nos dirán acerca de cual fue la concentración de este en su sitio de acción en los tejidos. Por otro lado, los efectos letales por si solos, nos indicarán las máximas concentraciones tolerables por el organismo y cuando los efectos ya sean irreversibles, y sin informar acerca de los posibles mecanismos que produjeron la muerte. De manera opuesta, los efectos subletales evaluados mediante biomarcadores pueden indicarnos los posibles mecanismos de acción del tóxico y mostrarnos tempranamente los efectos del metal, pero en cambio, poco nos dirán sobre las consecuencias a nivel de la capacidad de supervivencia, reproducción o crecimiento de los peces.

Por tal motivo, en el presente estudio, se ha escogido trabajar abarcando cada una de estas respuestas biológicas, evaluándolas de modo integrada, intentando vislumbrar relaciones entre ellas (intersecciones de los círculos) que permitan una mejor

comprensión de los efectos tóxicos observados de los metales estudiados sobre *O. bonariensis*.

La **acumulación**, se estudió con el objeto de conocer la toxicocinética del tóxico y para determinar si los efectos biológicos observados guardan relación con los niveles del tóxico en los tejidos. Además, el estudio de la acumulación permite determinar los niveles basales de un contaminante para la especie, establecer modelos que expliquen su comportamiento en relación a la concentración del tóxico y al tiempo de exposición, y establecer la magnitud de este proceso entre los distintos órganos con el fin de definir diferentes fases de exposición, que luego pueden ser utilizadas como indicadores en estudios a campo.

El empleo de la acumulación como indicador de exposición, presenta un problema para aquellos contaminantes que no se bioacumulan, debido a que pueden ser rápidamente metabolizados y excretados. Sin embargo, los metales no pueden ser metabolizables, y en general, debido a sus relativamente lentas tasas de excreción, poseen algún grado de bioacumulación. Otro inconveniente que presenta la evaluación de exposición mediante la acumulación, es la complejidad y el conocimiento incompleto que se posee de la relación entre los contenidos del tóxico en el tejido y la respuesta tóxica (McCarthy y Shugart, 1990).

Una introducción más detallada a los procesos que intervienen en la acumulación de un tóxico en el organismo y a los modelos utilizados para su interpretación, serán tratados en detalle en el Capítulo V, donde es evaluada la acumulación del Cd y Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis*.

Los **efectos letales**, brindan información de cual es la sensibilidad de *O. bonariensis* al tóxico en comparación con la de otras especies de peces y sobre cual es la toxicidad relativa de cada uno de los metales estudiados sobre el pejerrey. La determinación de los efectos letales es el paso inicial en cualquier estudio toxicológico, puesto que permiten establecer un punto de referencia sobre la sensibilidad de la especie en estudio, sobre la base de una respuesta de gran relevancia biológica como lo es la evaluación de la mortalidad y/o supervivencia en una población de dicha especie. Los **efectos letales agudos**, que evalúan la mortalidad inducida por un contaminante frente a exposiciones intensas y a corto plazo, son generalmente los más utilizados debido a

su corta duración. El punto final más comúnmente utilizado en este tipo de estudio, es la estimación de la concentración que mata al 50% de los individuos de la población estudiada en un período de exposición que, en ensayos con peces, suele ser frecuentemente de 48 ó 96 h (del inglés, LC50_(t)). Otros puntos finales, como por ejemplo el LC25_(t) ó LC10_(t), pueden ser utilizados para estimar límites entre concentraciones que producen o no efectos letales. Además, el estudio del comportamiento de los valores de LC_(t) permite el establecimiento del valor de **incipiencia**, concentración letal a tiempo infinito, que resulta útil para establecer un límite entre aquellas concentraciones capaces de causar efectos letales y subletales (Newman y Unger, 2003).

Los fundamentos teóricos del uso de la LC50(t) y la metodología para su cálculo serán desarrollados en el Capítulo VI, donde se establecerán los valores de estos parámetros para el pejerrey expuesto a concentraciones letales de Cd y el Cr.

Los **efectos subletales** son aquellos que se manifiestan a concentraciones por debajo de aquellas que producen directamente la muerte de los individuos. Sin embargo, estos pueden afectar la capacidad de supervivencia del organismo y conducirlo indirectamente a la muerte (Rand, 1995). El estudio de respuestas subletales a nivel suborganísmico (ej. molecular, bioquímico, celular, histológico, fisiológico) como indicadores de exposición o respuesta de los organismos a contaminantes, resulta particularmente interesante puesto que pueden ser utilizadas como **biomarcadores**.

Previamente denominados por McCarthy y Shugart (1990) como "marcadores biológicos" y definidos como "mediciones de fluidos corporales, células o tejidos, que indican, en términos bioquímicos o celulares, la presencia de contaminantes o la magnitud de la respuesta a ellos", los biomarcadores presentan una serie de ventajas para la evaluación de efectos biológicos. Dos de ellas, particularmente interesantes para el presente estudio, son: i) capacidad de *integración de las interacciones farmacodinámicas y toxicológicas*, ya que representan una medida biológicamente relevante de las interacciones del tóxico en el tejido blanco, proveen información sobre los mecanismos de acción del tóxico y fundan sobre una base mecanicística la respuesta observada, y iii) *actuar como señales de alerta temprana*, puesto que responden rápidamente, a bajas concentraciones del contaminante y antes que los efectos sean irreversibles. Por otro lado, una de las desventajas que presentan los

bioarcadores, es que en general resulta difícil establecer una relación entre las respuestas observadas a nivel suborganísmico y la relevancia ecológica que estas pudieran (Newman y Unger, 2003).

En particular en el presente estudio se ha escogido como biomarcador, a la actividad nucleolar de la branquia y el hígado de *O. bonariensis*. Esta elección se fundamenta en que el modo de acción principal de los metales pesados, se debe a su capacidad de unirse a macromoléculas, especialmente proteínas y ADN, e interferir con sus funciones biológicas. En consecuencia, como el nucleolo es el dominio nuclear donde son sintetizados los ribosomas, que constituyen la "maquinaria celular" indispensable para la síntesis proteica, de acuerdo a la necesidad de sintetizar proteínas que posea la célula, y por lo tanto, cualquier interferencia en con ese proceso, ya sea debido a daño en el ADN o por alteración e el metabolismo proteico, debiera ser reflejada por la actividad nucleolar. A esto se suma, que la actividad nucleolar puede ser evaluada a través parámetros morfológicos (ej. número, tamaño) por medio de métodos histológicos sencillos y de bajo costo, como consecuencia de que el nucleolo es una estructura altamente dinámica que se modifica de acuerdo al grado de actividad que posea. Por lo tanto, en el presente estudio se propone la evaluación de la actividad nucleolar como biomarcador general de efecto frente a la exposición a metales pesados, tales como el Cd y el Cr.

La selección de los tejidos propuestos para evaluar la actividad nucleolar, se fundamenta en que: i) la branquia es el principal órgano blanco frente a la exposición de los peces a metales a través del agua y ii) el hígado es el órgano (junto al riñón) de detoxificación de metales por excelencia de los peces.

El marco teórico en torno al estudio de respuestas subletales y en particular sobre los biomarcadores, antecedentes sobre el efecto tóxico de los metales en los tejidos seccionados y la metodología específica utilizada para evaluar la actividad nucleolar, serán expuestas en mayor profundidad en el Capítulo VII, donde se presentan y discuten los resultados encontrado a nivel de la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de los pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de los dos metales estudiados.

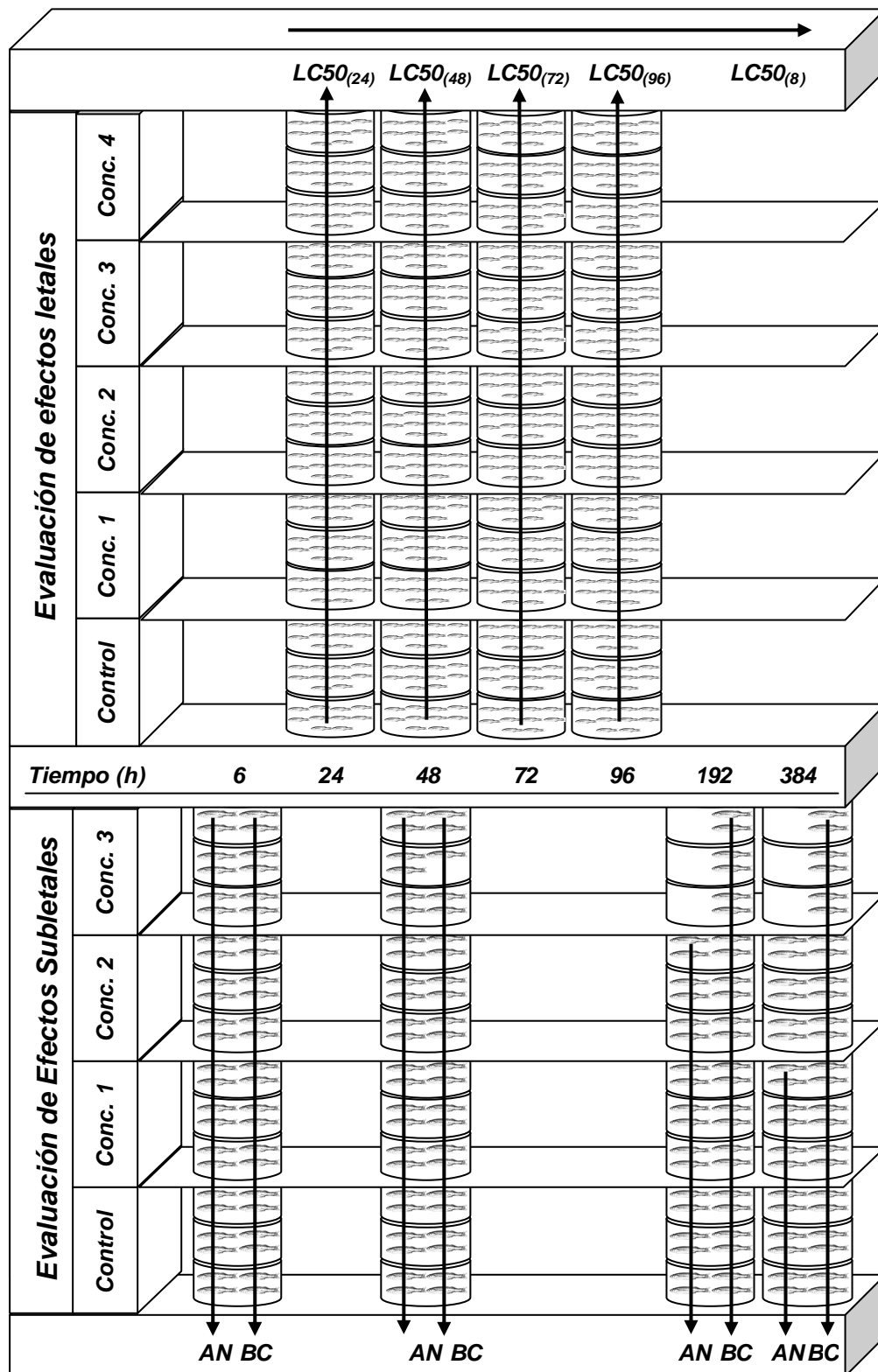


Figura III.4. Diseño experimental general utilizado para la evaluación de respuestas biológicas al Cd y Cr en *O. bonariensis*

LC50(x): concentración letal 50 a un tiempo dado, AN: actividad nucleolar, BC: bioconcentración, Peces: n utilizado en cada análisis y para cada tratamiento (concentración x tiempo)

Como se mencionara previamente, cada una de las respuestas biológicas a estudiar, otorgan una visión parcial del efecto global producido por el tóxico sobre los individuos

y por tal motivo, se ha planteado su evaluación integrada. La **estrategia experimental** planteada para lograr tal enfoque (Figura III.4), consistió en la realización, para cada metal, de dos tipos de experimentos: i) ensayos de toxicidad letal aguda (hasta 96h) para evaluar efectos letales, y ii) ensayos para evaluar efectos subletales a corto (1 o 6 h) y mediano plazo (hasta 384 h). Estos últimos ensayos también fueron utilizados para evaluar la bioconcentración de los metales estudiados en la branquia y el hígado luego de 48 y 384h de exposición.

Los **ensayos de toxicidad letal aguda**, fueron realizados utilizando alevines *O. bonariensis* de 15 y 30 d en agua de dos durezas diferentes. La edad escogida para este tipo de estudio se basó principalmente en dos razones, por un lado, debido a que los estadios más tempranos en general son aquellos más sensibles, y por otro, porque estos ensayos requieren de un gran número de organismos, de modo que trabajara con individuos de mayor edad, exigiría de grandes instalaciones e incrementaría mucho los costos. Los experimentos realizados con cada metal, tipo de agua y origen, consistieron en un ensayo preliminar (para hallar el intervalo adecuado de concentraciones) y dos o tres ensayos definitivos. La variable evaluada en estos ensayos fue la mortalidad observada en cada concentración a cada tiempo de exposición. Los tiempos de exposición ensayados fueron 24, 48, 72 y 96 h. Las mortalidades registradas en cada caso fueron luego utilizadas para estimar las curvas dosis respuestas mediante el método Probit (Finney, 1971), a partir de las cuales se obtuvieron las concentraciones letales (LC) que producen el 10, 25 y 50 % de mortalidad y las pendientes para cada tiempo de exposición. El valor de insipiencia $LC_{50(8)}$ se estimó a partir de las $LC_{50(t)}$ obtenidas a cada uno de los tiempos ensayado. El $LC_{50(8)}$ fue utilizado para el establecimiento de las concentraciones subletales a ensayar.

Los **ensayos para evaluar efectos subletales**, fueron realizados utilizando juveniles de *O. bonariensis* de 6 meses de edad. Esta fue seleccionada de modo tal de trabajar con los estadios más tempranos que presentaran un tamaño suficiente, como para, a partir de dos individuos, obtener una cantidad mínima de tejido que permitiera realizar las determinaciones de los metales en la branquia y el hígado. Los ensayos consistieron en la exposición de los peces a dos (primer año) o tres (segundo año) concentraciones subletales de cada metal más un grupo control, por un período de 6, 48, 192 y 384 h (excepto primer año con Cr que fueron 0,5, 1, 2 y 4h). Cada

concentración fue ensayada por triplicado y los ensayos fueron realizados por duplicado (años diferentes). De los cuatro individuos muestreados por cada réplica, dos fueron utilizados para analizar el contenido del metal correspondiente en cada tejido y dos para evaluar la actividad nucleolar branquial y hepática, obteniéndose así un total de tres muestras para análisis de metales y 6 para la evaluación de la actividad nucleolar, por cada concentración y tiempo de exposición.

Los detalles particulares de cada experimento y metodologías utilizadas para la evaluación de cada uno de los ensayos y respuestas biológicas evaluadas, serán comentados en los Capítulos pertinente.

III.c Las Condiciones Experimentales

En esta sección se describirán las condiciones generales bajo las cuales fueron mantenidos los pejerreyes y realizados los ensayos de toxicidad. Las condiciones particulares para cada uno de los ensayos realizadas serán expuestas posteriormente en sus capítulos respectivos.

Los organismos de experimentación fueron otorgados por la Dirección de Pesca del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires (MAAPBA) u obtenidos por fecundación artificial de reproductores maduros realizadas a campo a campo en la Laguna de Lobos. Los organismos cedidos por el MAAPBA fueron huevos o alevines de 1 a 2 días de vida, provenientes de desoves y fecundación artificial realizados en la Laguna de Gómes (Junín), a partir de reproductores naturales, ó de reproductores criados en cautiverio en la estación de piscicultura que dicha institución posee en Chascomús.

Tanto la incubación de las huevos como la cría de los alevines se realizó en un sistema de cerrado cría utilizando agua corriente de La Plata declorinada y filtrada

Tabla III.1. Características químicas y físicas del agua corriente de La Plata utilizada para el cultivo de *O. bonariensis* y la realización de los ensayos de toxicidad.

| Parámetro | Valor |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Cd | <0,001 mg/L |
| Cr | <0,003 mg/L |
| Na ⁺ | 105,0 mg/L |
| K ⁺ | 31,6 mg/L |
| Ca ⁺² | 55,0 mg/L |
| Mg ⁺² | 47,0 mg/L |
| Cl ⁻ | 48,5 mg/L |
| HCO ₃ ⁻ | 198,7 mg/L |
| CO ₃ ⁻² | 7,9 mg/L |
| Dureza | 255,3 mg CaCO ₃ /L |
| pH | 7,2 |
| Temperatura | 21 °C |

a través de carbón activado. Las características fisicoquímicas del agua se muestran en la Tabla III.1. La calidad del agua se mantuvo mediante un sistema de circulación y filtración (biológica, química y física) del agua (ver Capítulo IV). Los parámetros: T°, pH, oxígeno disuelto y concentración de amonio, fueron registrados periódicamente a modo de control. La temperatura se mantuvo constante en 22 ± 1 °C, mediante un sistema general de aire-acondicionado instalado en el acuario. La intensidad de iluminación fue de ajustada entre 550-1050 lux utilizando tubos fluorescentes luz día, y el fotoperíodo se mantuvo constante en 16 h luz: 8 h oscuridad. La aireación del sistema se mantuvo con un sistema de circulación de agua en cascada y burbujeo de aire mediante turbinas.

Las condiciones particulares de cría de los pejerreyes, desde huevo hasta las edades utilizadas en cada uno de los ensayos, serán descritas en el Capítulo IV.

Las condiciones generales bajo las cuales se realizaron los ensayos de toxicidad, fueron básicamente las mismas que las utilizadas durante el período de cría. Una imagen del laboratorio durante los ensayos se muestra en la Figura III.5. Todos los ensayos de toxicidad realizados fueron estáticos con renovación del 100% del medio cada 24 h. Los peces fueron expuestos en recipientes plásticos, de 250 ml en los estudios de efectos letales y de 20L en los estudios de efectos subletales (Figura III.5.). Durante los ensayos, la frecuencia de alimentación se redujo a una vez cada 48h y sólo se les proveyó alimento vivo (*nauplii* de *Artemia* sp a los alevines o adultos de *Daphnia* sp a los juveniles).

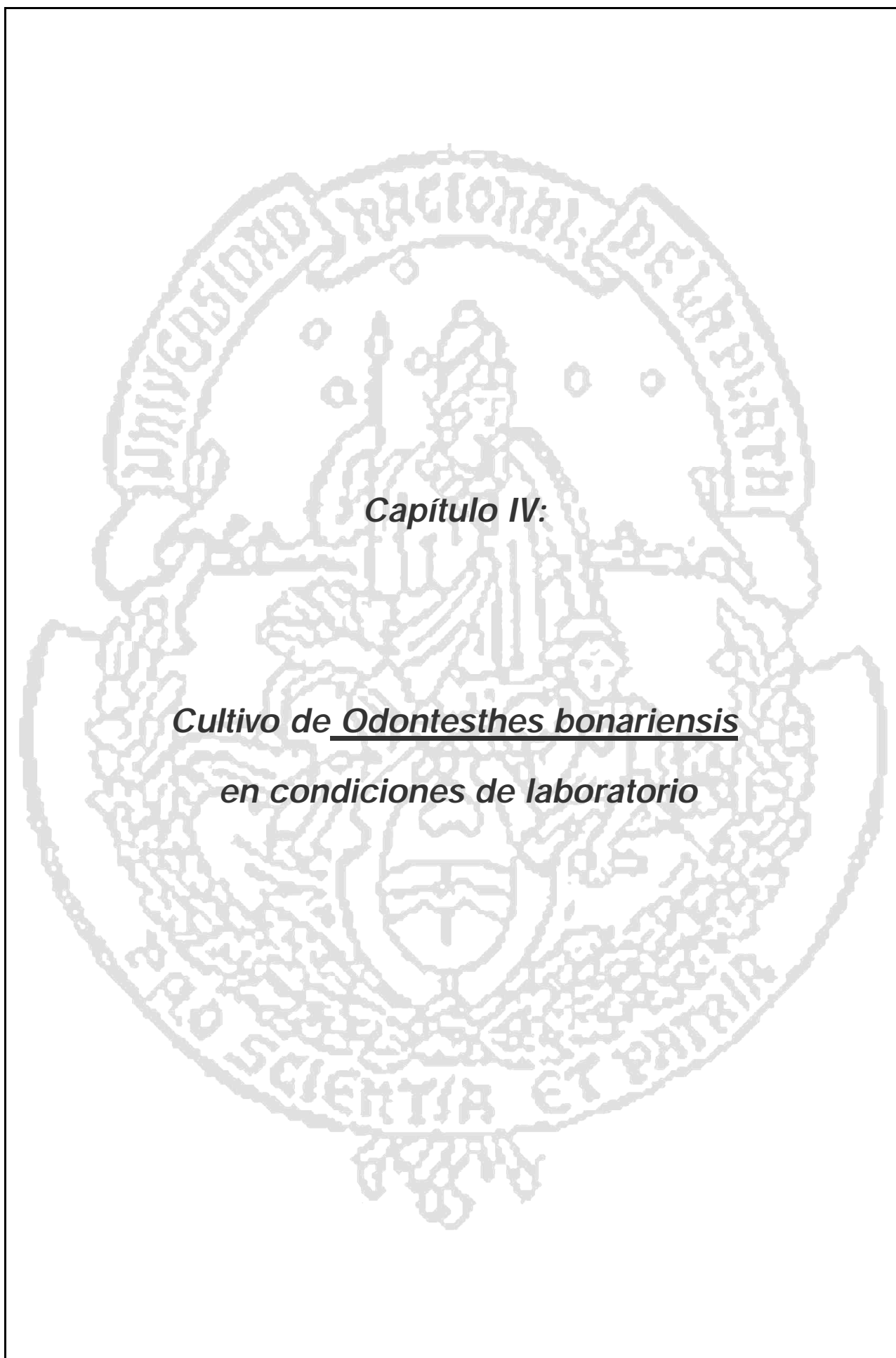


Figura III.5. Imagen del laboratorio durante la realización de un ensayo para determinar los efectos subletales del Cd y Cr en *O. bonariensis*

Para la realización de los ensayos de **toxicidad letal aguda**, se utilizaron alevines de pejerrey de 15 y 30 días de edad. Los ensayos se realizaron de acuerdo a protocolos

normalizados (APHA, AWWA, WEF, 1998; USEPA, 1993). Los peces se consideraron muertos cuando no presentaron movimiento opercular, y frente a la pérdida de brillo y aparición de coloración blanquecina del tegumento. Los recambios de medio, el registro de las mortalidades y el retiro de los organismos muertos se realizó cada 24 h.

Durante los ensayos destinados a evaluar **efectos subletales** se utilizaron juveniles de pejerreyes de 6 meses de edad (Lst: $63,5 \pm 9,5$ mm; W: $2,23 \pm 1,07$ g). A cada tiempo de exposición los peces correspondientes fueron inmediatamente demedulados, medidos, pesados y luego disectados. Para la disección, se utilizó instrumental quirúrgico cuidadosamente lavado, pasado por agua acidulada (HNO_3 10%) y enjuagado en agua nanopura. La disección siempre se comenzó por los individuos control y luego en concentración creciente para evitar contaminación. Se utilizó un juego de instrumental diferente para cada metal. Inmediatamente luego de disectados, los tejidos para la determinación de los metales, se colocaron en portaobjetos numerados, previamente pesados y limpios, prosiguiendo luego como se detalla en el Capítulo V. Las muestras de tejido para el análisis de la actividad nucleolar se fijaron rápidamente en una mezcla de metanol y ácido acético 3:1 fría, realizando un cambio del fijador luego de una hora y conservándolas a -20 °C hasta el momento de su procesamiento, según se describe en el Capítulo VII.



Capítulo IV:

**Cultivo de *Odontesthes bonariensis*
en condiciones de laboratorio**

Capítulo IV. Cría y mantenimiento de O. bonariensis en condiciones de laboratorio

IV.a Antecedentes

Como se mencionara anteriormente, los primeros intentos de cultivar al "pejerrey" datan de casi un siglo (Tulian, 1908, 1909, 1911; Valette, 1910) y las bases para su piscicultura han sido sentadas ya hace más de 60 años (Ringuelet, 1942). Numerosos son los estudios que se han ocupado posteriormente de éste tema, atendiendo las distintas fases del ciclo del cultivo, obtención de ovas, alevinaje, engorde y obtención de reproductores (Luchini *et al.*, 1984; Reartes, 1987, 1995; Grosman y González Castelain, 1996; Porcaro, 2001; Berasain *et al.*, 2001; Colautti y Remes, 2001). Los objetivos de tales estudios estuvieron orientados principalmente a la obtención de individuos para el repoblamiento de cuerpos naturales ó para su piscicultura a escala comercial. En el primero de los casos, se emplean instalaciones relativamente sencillas que utilizan sistemas de abiertos incubación conformados por un gran número de incubadoras de ovas y bateas para la recepción de alevines - ej. Estación Hidrobiológica de Chascomús (MAAPBS), planta de incubación de la laguna de Lobos, laboratorio rodante de incubación del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires (MAAPBS) -. Para el segundo, se utilizan importantes estaciones de piscicultura con grandes tanques o piletas a la intemperie, vinculados a cuerpos de agua naturales que en ciertos casos les suministran agua y alimento vivo a discreción pero, que como contraparte, imposibilitan un estricto control de las variables fisicoquímicas y biológicas - ej. Estación Hidrobiológica de Chascomús (MAAPBS), Estación de Piscicultura del Dique San Roque en la Provincia de Córdoba, estaciones de acuicultura de la launa de Navarro y Monte, entre otras-

A diferencia de los casos anteriores, las necesidades para llevar a cabo un cultivo a escala de laboratorio capaz de proveer organismos de diferentes edades y en condiciones adecuadas para su utilización en bioensayos, implican recrear un sistema de cría completo en espacios reducidos, empleando sistemas cerrados o semi-cerrados con recirculación del agua, estrictamente regulados y utilizando agua de características fisicoquímicas y biológicas bien definidas, con control estricto del fotoperíodo y empleando un tipo de alimentación específica.

No existen antecedentes, en la bibliografía disponible, acerca de un sistema de éstas características para el cultivo del pejerrey ni tampoco, específicamente, sobre las condiciones para su cría y mantenimiento en condiciones de laboratorio. Afortunadamente, *Menidia beryllina*, una especie distribuida en el sector sud-oriental de la costa de los Estados Unidos que está filogenéticamente emparentada al pejerrey, y que por sus características morfológicas, hábito alimentario, modo de reproducción y ambientes en los que habita podría ser considerada además un equivalente ecológico de aquella, ha sido propuesta y luego ampliamente empleada en bioensayos de toxicidad (Goodman *et al.*, 1985; USEPA, 1987; Hemmer *et al.*, 1992) y por lo tanto los detalles de las instalaciones y las condiciones para su cultivo son bien conocidas (Middaugh *et al.*, 1986) y pueden ser tomadas como punto de partida para establecer las propias para el "pejerrey". Otros trabajos que si bien fueron concebidos con miras a la acuicultura comercial o de repoblamiento del "pejerrey", pero que pueden ser tomados como punto de partida para establecer las condiciones de cría en el laboratorio, son los métodos descritos por Valette (1910) y Ringuelet (1943) para la obtención e incubación de ovas, los estudios sobre el efecto de la temperatura de incubación en la determinación sexual realizados por Strüssmann *et al.* (1996; 1997) o las descripciones sobre las condiciones de alimentación de los alevines llevados a cabo por Strussmann (1982) y Reartres (1995).

IV.b Objetivos particulares

El desarrollo de un sistema y el estudio de las condiciones de cultivo del pejerrey en condiciones de laboratorio no constituía un tema central respecto a los objetivos de la presente tesis, pero fueron sin embargo una condición necesaria para el logro de los objetivos propuestos y es por ésta razón que en el presente trabajo se ha decidido tratarlo como un capítulo separado.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Desarrollar un sistema para el cultivo del "pejerrey" en condiciones de laboratorio, capaz de contemplar el ciclo de vida completo de esta especie.

- Establecer las condiciones de cultivo de *O. bonariensis* en el laboratorio, sistematizando los conocimientos previos, seleccionando los métodos más adecuados y proponiendo mejoras para su obtención, cría y mantenimiento.
- Evaluar el grado de adaptación de los pejerreyes a las condiciones de laboratorio por medio de parámetros poblacionales y su comparación con los observados en otros tipos de cultivos o en sus ambientes naturales.
- Detectar los puntos críticos en el cultivo de *O. bonariensis* en el laboratorio y proponer posibles alternativas para ser evaluadas en futuros estudios.
- Elaborar un protocolo para la cría de *O. bonariensis* en condiciones de laboratorio.

Los contenidos de este capítulo se estructuran partiendo desde la descripción de la infraestructura generada para la crianza de los peces en el laboratorio, seguido, se detallan las condiciones de cría establecidas para el cultivo de los organismos, luego se exponen y discuten los resultados obtenidos durante los cuatro años de estudio y finalmente se presentan las conclusiones alcanzadas respecto al cultivo de *O. bonariensis* en condiciones de laboratorio.

IV.c Diseño de las instalaciones para la cría del O. bonariensis en el laboratorio.

IV.c.1. Instalaciones preexistentes

El presente estudio se llevó a cabo en instalaciones provistas por el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Para la cría y mantenimiento de los "pejerreyes" utilizados en los bioensayos se dispuso de una superficie total de 36 m² conformada por un cuarto de 24 m² cubiertos (72 m³), donde se ubicó el acuario, y un área descubierta de 12 m² utilizada para los cultivos externos de plancton.

IV.c.2. Consideraciones previas al diseño del sistema de cría

Atendiendo a las experiencias previas para el cultivo de *M beryllina* (Middaugh *et al.*, 1986; USEPA, 1987), y sobre la base de los recursos disponibles, se planteó la construcción de un sistema cerrado de cría para *O. bonariensis* capaz de albergar suficiente número de individuos y del tamaño adecuado para la realización de los experimentos propuestos.

De modo general podemos considerar que los peces requieren (expresado por g PH pez/d) para desarrollarse adecuadamente de alimento (20-50 mg) y oxígeno (400 mg), y que como contraparte generan en forma de desecho heces sólidas (10-40 mg), NH₃ (0,25-0,5 mg), compuestos orgánicos (0,25-1,5 mg), CO₂ (400 mg), H⁺ (3 µg) y bacterias (Coll Morales, 1986), en consecuencia un sistema de cultivo deberá ser capaz de proveer el alimento y O₂ requerido por los peces para llevar a cabo sus funciones vitales y mantener la calidad del agua por medio de la eliminación los productos de desecho generados.

En particular aquellos sistemas donde no existe un ingreso o egreso neto de agua sino que ésta se recircula permanentemente dentro del mismo, se denominan sistemas de cultivo cerrado (Coll Morrales, 1986). Si bien en la práctica no existen sistemas completamente cerrados, ya que se debe reponer el agua perdida por evaporación, durante la limpieza del mismo o en el manipuleo de los organismos, el requerimiento de agua por parte de éstos es mínimo. Este hecho, además del de economizar agua, es una característica muy propicia para el mantenimiento de los organismos en condiciones de laboratorio, donde el agua utilizada debe mantener constantemente características fisicoquímicas bien definidas.

Los elementos esenciales que conforman un sistema de éste tipo son: a) tanques de cría, b) bombas y c) filtros (Figura IV.1).

a) Los tanques que albergan los peces pueden ser de tamaños, formas y materiales variados dependiendo de la especie a cultivar y el espacio disponible. Los más

comunes son tanques circulares (para evitar bolsones residuales de aguas) construidos en fibra de vidrio.

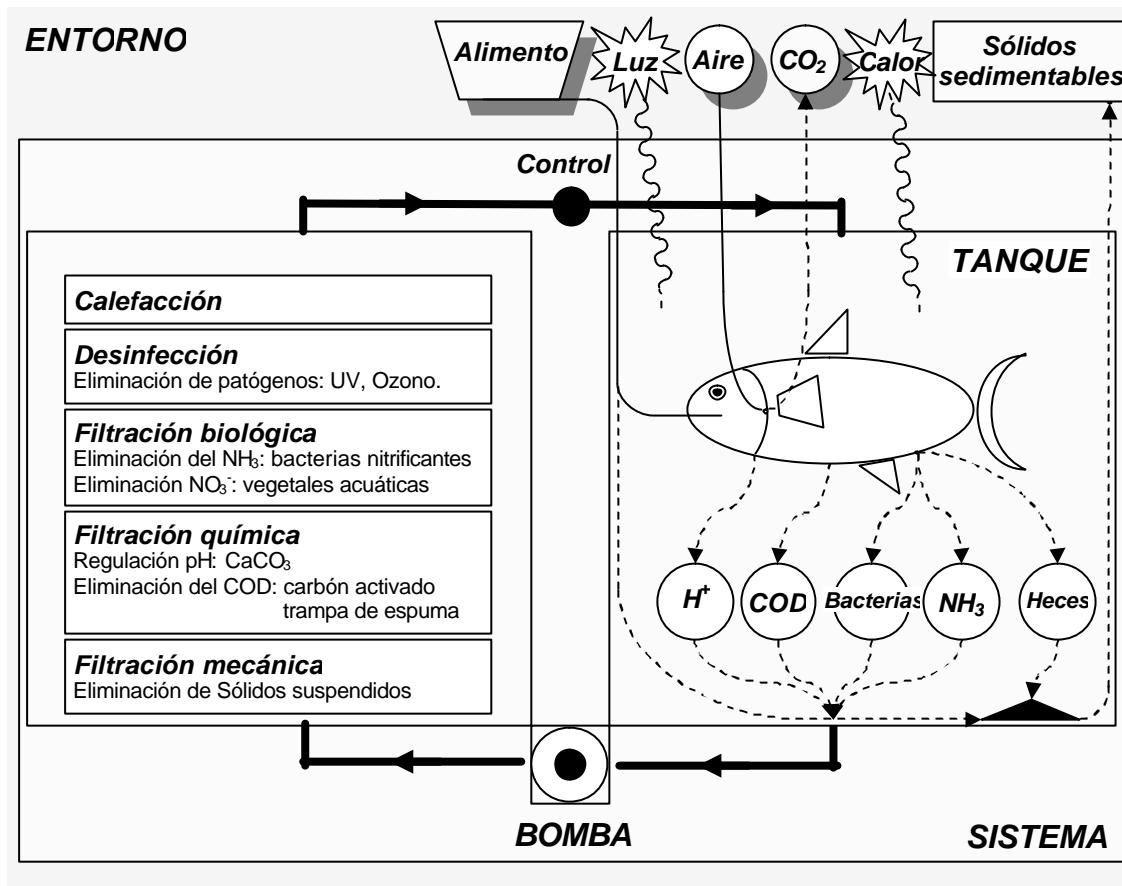


Figura IV.1. Esquema de un sistema de cultivo cerrado completo.

El sistema es cerrado en relación al agua ya que luego existe intercambio de materia y energía con el entorno. Los elementos básicos que lo componen son: tanque, bomba y filtro. El tanque aloja a los peces, la bomba hace circular el agua de los tanques a través del filtro y el filtro mantiene la calidad del agua eliminando los desechos producto del metabolismo de los peces y el alimento no ingerido.

b) Las bombas son empleadas para hacer circular el agua a través del sistema. El tipo de bomba a utilizar está determinado principalmente por la velocidad de recirculación (caudal) y la presión de bombeo que dependerán del diseño general. El tipo más comúnmente utilizado son las bombas centrífugas, pero también las hay rotatorias, alternativas, de aire o peristálticas (Coll Morales, 1986).

c) La función de los filtros es la de mantener la calidad del agua (NH₃, DQO, O₂, CO₂, pH) en óptimas condiciones para el desarrollo de los organismos. De acuerdo al tipo de sustancia que remuevan del sistema, éstos pueden dividirse en mecánicos, químicos o biológicos (Coll Morales, 1986).

Los filtros mecánicos se utilizan para retener el material sólido en suspensión (los sólidos sedimentables se eliminan haciendo sifón con una manguera) y de esa forma eliminar la turbidez y clarificar el agua. Su función no es simplemente estética, sino que debido a que éste material está constituido principalmente por el producto de desecho de los peces y el alimento no ingerido, contribuye a la obturación de otros filtros y su descomposición consume importantes cantidades de oxígeno y produce gran cantidad de amonio. Los filtros mecánicos pueden estar representados por simples filtros de grava, pantallas de filtración o sofisticados sistemas utilizando figuras aleatorias de plástico expandido como medio de filtración flotante (Losordo *et al.*, 1999).

Por otro lado, los filtros químicos y biológicos se encargan de la eliminación de las sustancias disueltas. Los primeros son utilizados para regular el pH (filtros de CaCO_3) y para retener compuestos orgánicos disueltos (COD) (filtros de carbón activado y trampas de espuma). Los segundos, son utilizados para la eliminación de NH_3 (bacterias nitrificantes).

Además, en un sistema cerrado pueden existir otros elementos accesorios que son de gran ayuda para mantener la calidad del agua y las condiciones del cultivo. Estos son los subsistemas de iluminación, de aireación (oxigenación y remoción de CO_2 , COD y NH_3), termostátización y de desinfección (UV, ozono),

Una vez definidos los elementos del sistema se procedió a su dimensionamiento. Las variables más importantes a considerar en ésta etapa son: 1) el peso final de peces que se desea obtener 2) cuán intensivo será el cultivo, 3) la velocidad de recirculación de agua y 4) el tipo de filtro y la superficie específica de filtración del material empleado para la filtración del agua. Los criterios de selección en cada caso se hicieron atendiendo razones de índole biológica, técnica y económica.

1) La biomasa final de peces a obtener viene dada por el número y tamaño de los individuos determinado por el diseño experimental y el número de ensayos a realizar. En este caso en particular se consideró satisfactorio contar con un número máximo de 1000 individuos de 10g de peso (entre 9 a 12 meses de edad). Esto equivale a una biomasa final de 10 Kg.

2) Cuán intensivo será el cultivo está condicionado por un lado, por la densidad máxima recomendada para sistemas cerrados de recirculación, y por otro por el espacio disponible y el costo del agua. Debido a que el rendimiento del sistema es un hecho empírico su dimensionamiento no es un cálculo matemático sino que es más bien una "elección educada", es siempre preferible sobredimensionar el sistema en la medida de lo posible (más aún si se carece de un grupo electrógeno propio). Si bien con la experiencia se puede optimizar el sistema para llegar a densidades máximas de 100 g/L (Coll Morales, 1986), lo recomendable en cultivos iniciales es no sobrepasar los 20 g/L (Masser *et al.*, 1999). Esto conduciría a un volumen mínimo de 500 L. Las dimensiones del laboratorio permitían un volumen máximo de hasta 3000 L, lo cual excedía con creces las necesidades mínimas. Por otro lado, el costo del litro de agua corriente declorinada y tratada para la eliminación de contaminantes orgánicos y metales pesados es de 1,25 centavos.

3) La capacidad de recirculación de agua del sistema puede ser muy variable, yendo desde sistemas muy lentos donde se recircula toda el agua cada 12h (mínimo recomendado), a muy rápidos donde toda el agua es recirculada en sólo 5 min. Lo recomendado es una renovación completa cada 1 o 2 h.

4) El dimensionamiento del sistema de filtración del agua y en especial el de filtración biológica es quizá el factor clave en un sistema cerrado de cultivo. La alta toxicidad del NH_3 (amoníaco o "amonio no ionizado"), producto de excreción de los peces y de la descomposición del alimento no ingerido, hace imprescindible un cálculo preciso del sistema de filtración. En general se recomienda que el nivel de NH_3 no supere los 0,5 mg/L (Losordo *et al.*, 1998). Debe considerarse que el NH_3 en solución se encuentra en equilibrio con el NH_4^+ y éste es afectado por el pH y la temperatura, a medida que el pH aumenta el equilibrio se desplaza hacia el NH_3 que es la forma tóxica. En consecuencia el pH del agua es una variable muy importante a tener en cuenta, por ejemplo a 22°C si el agua posee un pH igual a 7 el porcentaje de NH_3 es de 0.46 % mientras que si éste es de 8 el porcentaje será 4,37 (Losordo *et al.*, 1999). Tablas que muestran el porcentaje de NH_3 en función del pH y la T^0 pueden ser consultadas en la mayoría de los libros de acuicultura.

Básicamente el funcionamiento de un filtro biológico consiste en la transformación bacteriana del NH_3 en NO_3^- con consumo de oxígeno. Dos tipos de bacterias intervienen en éste proceso de nitrificación, las Nitrosomonas, que convierten el amoníaco en nitrito y las Nitrobacter que transforman el nitrito en nitrato. El nitrito es un compuesto relativamente tóxico, se recomienda que su concentración no supere los 10 mg/L, pero sólo se acumula al inicio del cultivo hasta que el sistema de filtración entra en régimen o si el sistema de filtración no está funcionando correctamente. Contrariamente el nitrato es relativamente inocuo ya que los peces pueden tolerar hasta 200 mg/L (Losordo *et al.*, 1998) pero su acumulación, en sistemas cerrados, incrementa sostenidamente en el tiempo.

Un filtro biológico debe estar construido de un material (medio de filtración) que posea una gran superficie de área específica por unidad de volumen que permita el establecimiento del mayor número de colonias posible por unidad de volumen. A su vez, este debe asegurar un adecuado suministro de oxígeno para la proliferación de bacterias nitrificantes (aerobias).

Los sistemas de filtración biológica existentes son muy diversos y de complejidad variable. Dependiendo del modo de funcionamiento, estos pueden ser: I) los tradicionales filtros sumergidos, II) filtros de tambor, III) filtros de drenaje o "wet dry", IV) los ya mencionados de figuras de plástico expandido flotantes y V) los de tipo cama fluida. Los medios de filtración más comúnmente utilizados son arena en I) y V), mayas de fibras de diferentes materiales y densidades en I) y III), esferas o figuras al azar de plástico en III) y IV), sustratos estructurados de PVC en II) y microesferas plásticas de densidad similar o levemente mayor al agua en V). De acuerdo a las consideraciones realizadas por Losordo *et al.* (1999) y a los precios de mercado, podemos concluir que cada uno de estos sistemas de filtración tiene sus ventajas y desventajas, siendo en general los de cama fluida los más eficientes, los estructurados los más prácticos y los sumergidos los más económicos.

Para el presente estudio en particular se escogió el tradicional filtro de grava y arena sumergido. Este filtro tiene la ventaja de poseer un muy bajo costo, de ser sencillo de armar y de realizar simultáneamente tanto la filtración mecánica, biológica y en parte química. Una desventaja es que, si bien la superficie específica de filtración de la arena

es muy elevada, entre 800 a 1500 m²/m³ dependiendo del tamaño del grano (Losordo, 1999), sólo los primeros 5 cm poseen actividad nitrificante debido a que más allá de ésta profundidad los tenores de oxígeno son insuficientes para el desarrollo las bacterias nitrificantes (Coll Morales, 1986). Esto trae aparejado que el área superficial, respecto al volumen del medio de filtrado, debe ser muy grande con el consecuente inconveniente de requerir mayor espacio para la misma capacidad de filtración. Otra desventaja es que tiende a obturarse rápidamente y requiere de un mantenimiento periódico, sin embargo su limpieza es relativamente sencilla y poco onerosa.

Una vez definido el tipo de filtración biológica se calculó su dimensión asumiendo que el alimento suministrado diariamente a peces de 10 g es de 5 % (Coll Morales, 1986; Messer et al, 1999) de la biomasa, que el 2,5 % del alimento suministrado se convierte en nitrógeno amoniacal total (NAT) (Losordo et al, 1999) y que la tasa volumétrica de nitrificación en los 5 cm superiores del filtro es 225 g NAT/m³/día (Losordo et al, 1999), de aquí se deduce que la producción diaria de NAT va a ser de 12,5 g/día y que para nitrificar esta cantidad de nitrógeno amoniacal haría falta un filtro que contenga 0.055 m³ de arena. Si consideramos que sólo los primeros 5 cm son funcionales, el área de filtración mínima debería ser de 1,11 m².

Como se ha mencionado anteriormente el producto de la nitrificación es el NO⁻³ y se dijo que su toxicidad es muy baja. Sin embargo, en los sistemas cerrados, el NO⁻³ y también el PO⁻⁴ pueden alcanzar concentraciones muy altas. La manera más sencilla y económica de eliminarlos fue colocando poblaciones de vegetales acuáticos dentro del sistema. Las plantas retienen grandes cantidades de los mencionados iones incorporándolos al tejido vegetal. El NO⁻³ y el PO⁻⁴ son eliminados del sistema al extraer periódicamente parte de la población vegetal. En particular, en este caso, se utilizaron "lentejas de agua" que son plantas vasculares flotantes de la familia de las Lemnaceas que forman una carpeta vegetal que puede ser cosechada periódicamente de un modo sencillo.

IV.c.3. Descripción del sistema de cría desarrollado

Como resultado del análisis previo, se construyó un sistema de cría (Figura IV.2) que funciona con un volumen total de agua de 2500 L y que está conformado por tres

tanques de cultivo de 500 L cada uno, una bomba centrífuga capaz de recircular toda el agua del sistema cada hora, un filtro de grava y arena con una superficie de 1,13 m² y un tanque de 1000 L que actúa como reserva de agua, decantación de sólidos sedimentables y cámara de cultivo de vegetales acuáticos (*Lemna* sp). El flujo del agua circula desde los tanques de cultivo hasta la bomba, de allí se divide en dos flujos que van en contra de la gravedad, uno a un recipiente de distribución y luego al tanque de reserva y el otro al filtro de grava y arena y de allí al tanque de reserva, desde este tanque el agua fluye por gravedad hasta los tanques de cultivo. El sistema está diseñado de modo tal que en casos de corte de energía eléctrica cada uno de los componentes encuentre su equilibrio sin que el agua se desborde.

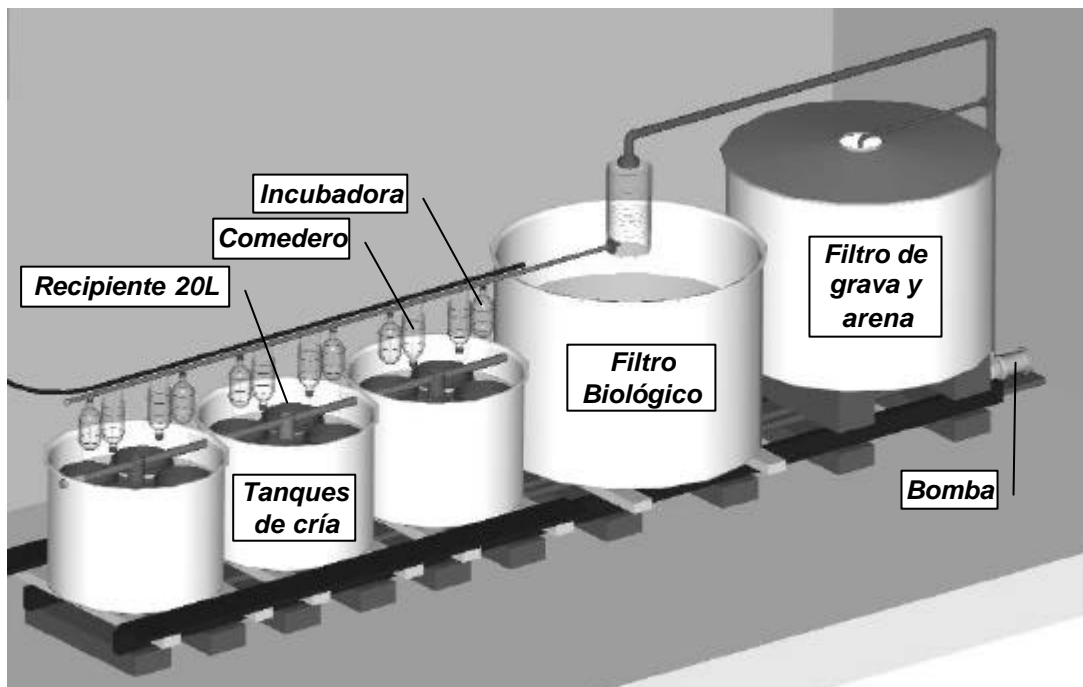


Figura IV.2 Sistema de cultivo integrado diseñado para la cría y el mantenimiento de *O. bonariensis* en el laboratorio durante todo su ciclo de vida.

Los tanques de cría son circulares construidos en fibra de vidrio de un diámetro de 0,8 m y una altura total de 0,6 m. El agua ingresa desde la parte superior y lateral del tanque por un sistema que regula el nivel máximo de agua, hace un recorrido circular, atraviesa un prefiltro que se encuentra en el centro y base del tanque, sube por un tubo central que sobrepasa la superficie y finalmente abandona el tanque por un caño concéntrico al primero que determina el nivel mínimo de agua.

Los tanques de cultivo se encuentran compartimentalizados para facilitar el manejo de los peces, optimizar el uso de los tanques y permitir ensayar diferentes condiciones de cría. Para ello cuatro baldes plásticos de 20 L que poseen su propio sub-sistema de circulación flotan dentro de cada tanque (Figura IV.3). El agua ingresa a los tarros por una manguera conectada a un caño que viene desde el recipiente de distribución o desde las incubadoras y luego desagua por una salida ubicada en el fondo del tarro hacia los tanques de cultivo. La salida posee un filtro formado por una maya de tamaño variable según el tamaño de los peces alojados.

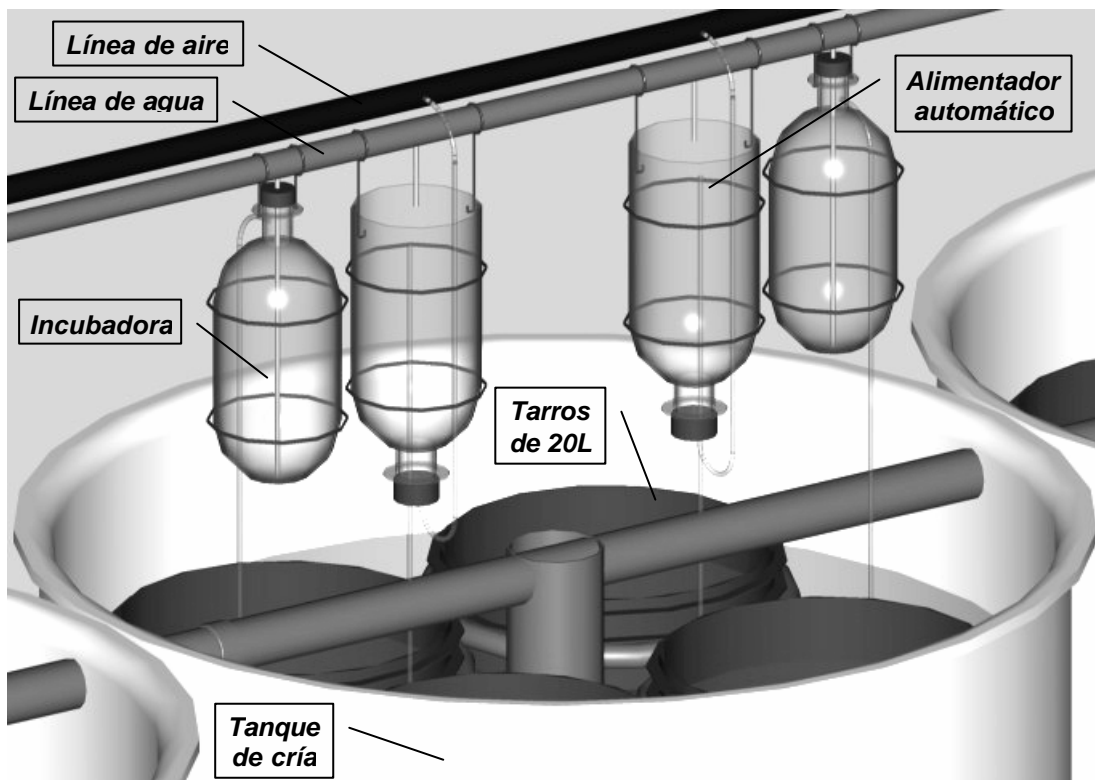


Figura IV.3 Detalle de los tanques de cría mostrando los recipientes de 20L, las incubadoras y comederos automáticos utilizados para el cultivo de *O. bonariensis* en el laboratorio.

El sistema posee integrado un sub-sistema de incubación (Figura IV.3) conformado por botellas de plástico de 2,5 L, colgadas sobre los tanques de cría, a las que se les hace ingresar agua por un tubo central que va hasta su base (removiendo y oxigenando las ovas fecundadas) y que luego abandona la botella por una manguera lateral conectada al cuello de la misma, drenando finalmente hacia los tarros de 20 L que compartimentalizan los tanques. Los huevos por su densidad permanecen suspendidos

en el fondo de la botella pero los alevines al nacer son arrastrados por la corriente de agua hasta los tarros.

Para circular el agua a través del sistema se utilizó una bomba centrífuga de 0,5 HP de potencia con un caudal y presión máximos de 140 L/min y 7 bar respectivamente.

El filtro de arena está construido dentro de un tanque de fibra de vidrio con un diámetro de 1,2m. Posee tres estratos de 15 cm de espesor, uno inferior de grava, uno medio de conchilla (regulación del pH) y otro superior de arena gruesa. Por sobre éste hay una capa de 10 cm de arena fina (filtración biológica).

IV.c.4. Instalaciones accesorias

El suministro de agua se obtuvo de la red de agua corriente de la ciudad de La Plata. Esta alimenta tres tanques de reserva de 250 L de capacidad cada uno, que están interconectados y que se ubican a 2m de altura en el interior del acuario. Aquí el agua es declorinada por medio del burbujeo de aire desde difusores ubicado en el fondo de cada tanque, conectados por una manguera al sistema de aireación, y estabilizada térmicamente. A la salida de los tanques de reserva un filtro de carbón activado elimina el cloro remanente, los compuestos orgánicos y los metales pesados que pudiera contener el agua, previo a que ésta ingrese al sistema de cría.

El sistema de aireación está conformado por una turbina (HP: 0,125, $Q_{\text{máx}}$: 0,85 m³/min; $P_{\text{máx}}$: 0,85 bar) y una red de caños y mangueras que suministra aire a cada tanque de cría, al filtro biológico y al resto del laboratorio de manera independiente al sistema de agua.

La temperatura del cuarto donde se ubica el sistema de cría y el área de bioensayos es regulada por medio de un sistema de aire acondicionado. Sobre cada tanque se colocó una parrilla de iluminación que consta de tubos fluorescentes que proporcionan una intensidad lumínica de 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 12 h al día. El fotoperíodo se reguló automáticamente por medio de un temporizador conectado a la línea eléctrica de las parrillas de iluminación.

En el último año se desarrolló un sistema automático de suministro de alimento vivo (Figura IV.3). Este consiste en una botella de plástico de volumen variable, según la cantidad y tamaño del alimento, a la cual se le corta la base y se le hacen dos perforaciones en la tapa, por una se conecta una manguera de entrada de aire de 3 mm de diámetro y de un largo igual o mayor al de la botella y por el otro atraviesa un tubo rígido también de 3 mm espesor y del doble de longitud de la botella, que se introduce en ésta llega hasta 2 cm antes de la base. Las botellas se cuelgan invertidas sobre los tanques por medio de un soporte que posee un anillo central por donde se coloca una manguera de 3 mm de diámetro conectada al caño que trae agua desde el recipiente de distribución y que se hace gotear a velocidad deseada. El agua entra a la botella por goteo y sale por rebalse e por el tubo rígido, el sistema de aireación oxigena al alimento vivo y lo mantiene en suspensión permanente.

Además del sistema de cría para los peces, fue necesario desarrollar un sistema de cultivo de plancton, alimento natural del "pejerrey". Para ello se instalaron dispositivos de producción de nauplii de *Artemia* sp. y de cladóceros (*Daphnia* sp.). Para la producción de nauplii de *Artemia* sp. la incubación de los huevos se realizó en botellas de 2 L de capacidad, a las cuales se les cortó la base y se les perforó la tapa, por donde se conectó una manguera de silicona de 3 mm de diámetro y de un largo igual a la longitud de la botella con una llave en el extremo. Las botellas cuelgan invertidas por medio de un soporte y las llaves se conectan a una manguera proveniente de la línea general de aireación. La producción de cladóceros fue realizado utilizando dos sistemas complementarios. Uno interno, dentro del acuario, conformado por dos tanques de 125 L de capacidad que son oxigenados por medio del sistema de aireación y que fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura e iluminación; y otro externo, constituido por cuatro piletas de 1,5 m³ de capacidad ubicadas en un invernáculo contiguo al acuario, sin control de las variables ambientales.

Otras instalaciones accesorias ubicadas dentro del acuario, fueron un área para el desarrollo de los bioensayos, constituida por una serie de estanterías donde se ubican peceras de 150 L y los tarros de 20 L donde se realizan los ensayos, un área de lavado y almacenamiento de materiales y un área ocupada por las mesadas de trabajo.

IV.c.5. Evaluación del funcionamiento del sistema de cría

El sistema se mantuvo en régimen ininterrumpidamente durante los cuatro años y medio de estudio. Durante ese período no se observaron inconvenientes en el funcionamiento aún con los frecuentes cortes de energía eléctrica. El mantenimiento del mismo se redujo a una limpieza completa del este cada primavera previamente a la recepción de nuevas partidas de huevos o alevines. Durante este período se aisló alternadamente cada tanque de cría, se lo vació (el agua era pasada a los otros tanques del sistema), limpió, desinfectó con cloro y luego se lo reconectó nuevamente al sistema. El filtro de arena se vació momentáneamente hasta 5 cm por debajo de la superficie de arena, se recogió ésta capa de arena fina en un balde, se lavó con abundante agua y se volvió a colocar en el filtro. Todo este trabajo de mantenimiento realizado por dos personas tomó sólo un día de trabajo al año. Luego, durante el resto del año sólo se realizaron mantenimientos menores y rutinarios del sistema tales como el sifoneado diario de las heces y del alimento no ingerido, o la limpieza semanal de los prefiltros de cada tanque de cría.

Respecto al funcionamiento del filtro biológico, el control periódico de los niveles de amonio mostró un correcto funcionamiento del mismo. Los niveles medios de amonio registrados fueron de $0,067 \pm 0,00093$ mg/L tomado en la base de los tanques y de $0,037 \pm 0,00059$ mg/L (media \pm error estándar, $n = 40$) en la salida del filtro biológico. El máximo valor se registró el 30/06/02 con una carga de 1,78 Kg de peces fue de 0,078 mg/L. El pH y temperatura ese día fueron 7,41 y 21,9 °C respectivamente. De acuerdo a esos valores el porcentaje de amonio no ionizado debería ser del 1.06 % (Masser *et al.*, 1999), de aquí que la concentración de NH_3 en ese momento debió ser de 0,83 $\mu\text{g/L}$ que representa sólo el 16,6% del valor recomendado (Coll Morales, 1986) y entre el 4,15 – 1,18 % de concentraciones que se ha encontrado provocan reducción del crecimiento o daño tisular en peces (Masser *et al.*, 1999). Estos resultados validan los cálculos estimados en el dimensionamiento del sistema de filtración ya que de acuerdo a los valores obtenidos, para elevar el NH_3 a 5 $\mu\text{g/L}$ (suponiendo el mismo rendimiento en el filtro) el sistema debería poseer una carga de 10,71 Kg de peces, valor que es coincidente con los 10 Kg planteados al diseñar el filtro.

Otra variable importante que se controló periódicamente con el objeto de seguir el comportamiento del sistema fue el tenor de oxígeno, observándose que durante los

cuatro años, este parámetro nunca descendió de 7,55 mg/L, probando así su adecuada oxigenación.

IV.d Condiciones de cría de O. bonariensis en el laboratorio.

IV.d.1. Obtención de los organismos

Los organismos utilizados para el desarrollo de las experiencias fueron obtenidos por medio de dos vías diferentes. Por un lado, se llevaron al laboratorio huevos obtenidos por fecundación a campo y por el otro los huevos o alevines, según las circunstancias, fueron provistos por la Estación Hidrobiológica de Chascomús, perteneciente a la Dirección Provincial de Pesca dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.

En los casos que los huevos fueron obtenidos por fertilización a campo, esta fue realizada en la laguna de Lobos, Provincia de Buenos Aires, utilizando individuos adultos capturados por medio de trampas sumergidas que se dejan colocadas durante toda la noche y se recogen a primera hora de la mañana. En cada campaña, se separaron los mejores ejemplares y las hembras se desovaron realizando un suave masaje abdominal, luego las ovas fueron fecundadas con el esperma obtenido de los machos en una relación de tres o cuatro hembras por macho. Los productos sexuales fueron mezclados utilizando la cola del pescado, se dejaron reposar y luego se hidrataron con agua del lugar. Al cabo de un par de horas, se procedió al cortado de los filamentos empleando una tijera y los huevos fueron finalmente colocados en una botella con agua fresca para su transporte definitivo al laboratorio.

Los huevos y alevines provenientes de la Estación Hidrobiológica de Chascomús fueron otorgados por el Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires, el marco del "Plan alevín". Las huevas fueron obtenidas a partir de la fecundación artificial de gametas pertenecientes a individuos de la laguna de Gómez, partido de Junín, provincia de Buenos Aires. Una excepción, fue la última partida de huevos (26/9 y 1/10 de 2002) que provino del desove natural de reproductores de cuatro años de edad criados en cautiverio en los estanques de la mencionada estación de piscicultura.

IV.d.2. Incubación

Los huevos obtenidos por cualquiera de las dos vías fueron incubados en el laboratorio utilizando el sistema previamente descrito. El agua de incubación fue la misma que circulaba a través del sistema de cría y que fuera bien oxigenada previo a su ingreso a las incubadoras. La temperatura de incubación se mantuvo entre los $20,6 \pm 0,2$ °C (media \pm error estándar). Diariamente las incubadoras fueron limpiadas y desinfectadas con cloro y los huevos muertos (adoptan un típico color blanco) eliminados.

Los grados acumulados de temperatura, el tiempo medio y el porcentaje de eclosión fueron seguidos diariamente en cápsulas de Petri donde simultáneamente era registrado el número de larvas recién nacidas y el número de huevos muertos. Se utilizaron 5 cápsulas con 20 huevos cada una por cada lote de huevos recibidos, a excepción de la primera partida de huevos donde sólo se estimó el porcentaje de eclosión directamente de las botellas de incubación. El agua de incubación en las cápsulas fue la misma que recirculaba en las botellas y ésta era renovada en un 100% diariamente y las cápsulas desinfectadas del mismo modo que las botellas de incubación.

IV.d.3. Condiciones de cría y mantenimiento

En el cultivo de peces pueden distinguirse cuatro etapas básicas, la de hatchery, nursery, levante y engorde (Coll Morales, 1986). En el caso del "pejerrey" esta clasificación general puede hacerse corresponder con cuatro estadíos de desarrollo claramente evidenciables luego de la eclosión. Estos son: el de larva: hasta la reabsorción del saco vitelino, el de alevín: desde que comienza a tomar alimento y hasta aproximadamente el mes de vida, el de juvenil: desde que el pez adquiere su típico aspecto fusiforme e iridiscencia plateada hasta el desarrollo de las gónadas (un año) y el de adulto: desde el momento que adquiere la capacidad de reproducirse hasta su muerte. Las condiciones de cría requeridas en cada uno de estos estadíos son diferentes y por consiguiente en este estudio se describen separadamente.

Fase 1: Las larvas recién nacidas se recibieron en los tarros de 20 L (que compartimentan al sistema de cultivo) manteniéndose a densidades iniciales de 0,05 a

0,1 litro por pez, con permanente circulación de agua, aireación suave y sin alimentación.

Fase 2: Luego de las primeras 48 hs de vida se comenzó con la alimentación de los alevines. El tipo y cantidad de alimento a suministrar durante este período, fue en principio obtenido a partir de la bibliografía y luego ajustado de acuerdo a la experiencia adquirida. La alimentación óptima para alevines planctófagos recomienda la utilización de alimento vivo y plantea una sucesión de etapas donde se va incrementando gradualmente el tamaño del alimento, partiendo de rotíferos pequeños durante la primer semana de vida (0,08 - 0,25 mm), pasando luego a nauplii de *Artemia* (0,35 mm) en la segunda y finalmente a copépodos (0,55 mm) o cladóceros (0,50 - 5,00 mm) a partir de la tercera (Coll Morales, 1986; Reartes, 1995). Sin embargo se ha observado que al igual que las larvas de *Menidia* sp. las larvas de "pejerrey" pueden ser alimentadas directamente con nauplios de *Artemia* de 24 hs de edad sin detrimento sustancial del crecimiento o la supervivencia (Reartes, 1995; USEPA, 1987). Debido a una limitación de mano de obra disponible y con el objeto de simplificar el protocolo para la cría de *O. bonariensis* en el laboratorio, en el presente trabajo, se ha implementado ésta última metodología. En consecuencia, los nauplios de 24 hs comenzaron a suministrarse en pequeñas cantidades a partir del segundo día de vida hasta notar que los alevines adquirieron la capacidad (apertura de la cavidad bucal) de tomar este alimento. Luego se alimentó a los alevines *ad libitum* (en el último año se utilizaron los comederos automáticos que se recargaban dos veces al día). A partir de los 15 días de vida (excepto para el primer año que fue a partir del mes) se les suplementó la dieta con crías de cladóceros y alimento en escama (Mac Shulet[®]) con un contenido proteico del 40%, 10% de lípidos, 5% de fibras, 12% de minerales y un 6% de humedad.

Fase 3: A partir del primer mes de vida los alevines son pasados a los tanques de cría (400L) donde son cultivados a una densidad inicial de 1 a 2 litros de agua por individuo y alimentados con adultos de *Daphnia* sp. (peso seco igual al 5% del peso húmedo, esto equivale a decir que aproximadamente el pejerrey come por día el equivalente a su peso de *Daphnia* sp.) y alimento balanceado en escamas (Mac Shulet[®]) a una ración aproximadamente igual al 5% del peso húmedo (PH) de los peces durante el

primer año de vida (la proporción de los dos componentes de la dieta varió dependiendo de la producción de *Daphnia* sp. en las piletas).

Fase 4: Los pejerreyes con más de un año de vida (no utilizados en los ensayos) se mantuvieron en un tanque independientemente del resto de los juveniles a densidades muy bajas (ej. en el año 2002, $\delta = 20$ L/pez) y fueron alimentados con pellets para trucha N° 1 (Ganave[®]) y adultos de *Daphnia* sp. a una ración diaria de 2,5 % PH de los peces.

El alimento vivo se obtuvo por dos vías complementarias:

a) Incubación de huevos de *Artemia* sp.: Los nauplii de *Artemia* sp. se obtuvieron incubando diariamente los huevos de esta especie a una densidad máxima de 10 g por litro de agua, a una concentración de NaCl de 5 ‰, un pH de 8, una iluminación de 1.000 lux y una temperatura de 25 - 30 °C por un período de aproximadamente 24 h (Sorgeloos *et al.*, 1980) en las incubadoras previamente descriptas. El número de incubadoras utilizadas fue variado de acuerdo al número y la edad de los alevines. Los nauplios se separaron de los huevos no eclosionados por diferencias de densidad y el fototaxismo positivo de las larvas. Los nauplios se administraron a los tarros de 20 L dos veces al día y en cantidad en exceso para asegurar la alimentación continua de los alevines.

b) Producción de *Daphnia* sp.: la producción de cladóceros se realizó de dos modos diferentes:

b.1) Cultivo externo que se llevó a cabo empleando un sistema de rotación, donde cuatro piletas de 1500 L cada una fueron mantenidas en distintas fases de producción (Figura IV.4). Mientras la pileta 1 era vaciada, limpiada, vuelta a llenar y abonada, la 2 se encontraba en la fase de crecimiento algal, la 3 en la fase de crecimiento de la población de cladóceros y la 4 en la fase de cosecha. Como abono se utilizaron los desechos obtenidos de la limpieza de los tanques de cultivo de peces y en ocasiones alimento balanceado molido. Por este método se obtuvieron producciones diarias y sostenidas de $55,6 \pm 6,64$ g peso húmedo (media \pm error estándar) por pileta (el

período 11/02 a 3/03 debido a la pérdida del plástico que cubría el invernadero la producción fue menor a 5 g peso húmedo diarios). La producción obtenida por éste método (259,5 g PH/semana/m³) tuvo un costo casi nulo y fue similar a la obtenida por otros autores abonando con heces de cerdo, caballo o utilizando algas como alimento (35-700 g PH/semana/m³) y representa sólo un tercio de la máxima producción alcanzada con salvado de arroz (500-900 g PH/semana/m³) (Coll Morales, 1986).

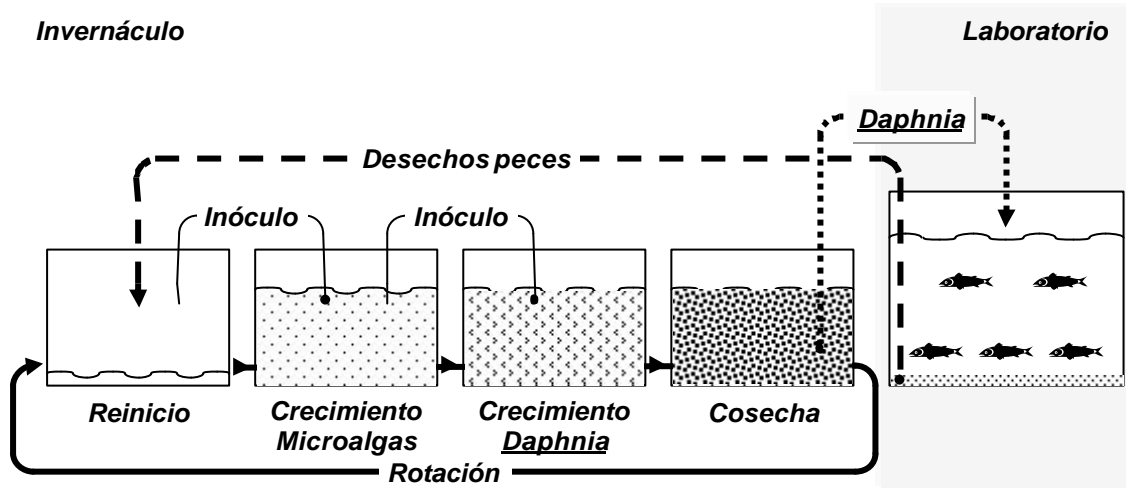


Figura IV.4 Sistema integrado para la el cultivo externo de *Daphnia* sp.

El sistema consiste en un cultivo rotativo que reduce al mínimo el subsidio externo con abono, bajando así los costos de producción de plancton. En una primera fase se inoculan microalgas (principalmente *Chlorela* sp. y *Scenedesmus* sp.) en una pileta con agua limpia abonada con los desechos producidos por los peces. Apenas el crecimiento abandona la fase exponencial se inocula con *Daphnia* provenientes de la pileta contigua. Cuando el cultivo está por llegar a su punto máximo, se comienza a cosechar, extrayendo el equivalente a la producción diaria. Cuando se agotan los nutrientes, el cultivo cae y entonces la pileta es reiniciada.

b.2) Cultivo interno (empleado sólo en el último año): Dos tanques con 100 L. de agua abonada periódicamente con levadura, harina de sangre y hueso, alimento balanceado molido y algas. El sistema fue aireado constantemente y mantenido a la temperatura del acuario.

El agua utilizada para el cultivo se obtuvo de la red de agua potable de la ciudad de La Plata, siendo posteriormente declorinada y filtrada por carbón activado para la eliminación del cloro residual, posibles contaminantes orgánicos y metales pesados. Las condiciones fisicoquímicas del agua se describen en la Tabla III.1.

La evaluación de la adaptación del pejerrey a las condiciones de cría en el laboratorio, durante todo el período de estudio se realizó mediante el seguimiento de los parámetros poblacionales, supervivencia, crecimiento, relación longitud peso e índice de condición en los individuos provenientes de las distintas partidas desde su nacimiento hasta su utilización en los ensayos de toxicidad. Los escasos organismos no utilizados en ensayos fueron conservados con el simple objeto de mantener el sistema de cría en régimen (especialmente el filtro biológico) y fueron aprovechados para evaluar la sobrevivencia y el crecimiento en el laboratorio.

La supervivencia se ajustó a un modelo exponencial negativo de tres constantes, dado por la función:

$$N_t = N_0 * e^{-(z * t)} + c$$

done:

N_t : número de individuos al tiempo t

N_0 : número inicial de peces (se utilizaron valores relativos respecto al número inicial de organismos de cada partida para simplificar las comparaciones)

z : tasa instantánea de mortalidad

c : asíntota que indica la estabilización de la supervivencia.

Este modelo, interpretó mejor la supervivencia en el laboratorio durante el primer año de vida (excepto para la partida Cha02) que el tradicional modelo donde la supervivencia se hace tender a cero, dejando ver algunas diferencias entre el comportamiento de la supervivencia del "pejerrey" en el laboratorio y en el campo.

Para evaluar el crecimiento de *O. bonariensis* en el laboratorio, 1701 medias de longitud estándar y 670 pesadas, expresadas respectivamente en milímetros y en gramos, fueron registradas para las diferentes partidas de alevines recibidas durante el periodo de estudio. Los valores de talla se ajustaron al modelo de crecimiento individual de von Bertalanffy dado por la ecuación:

$$Lst_t = Lst_{\infty} * [1 - e^{-k * (t+t_0)}]$$

donde,

Lst_t : longitud estándar al tiempo t (mm)

Lst_{∞} : asíntota que indica el crecimiento máximo a tiempo infinito (mm)

k : tasa de crecimiento (1/d)

t : tiempo (d)

t_0 : tiempo teórico si la talla fuese cero (d)

La relación longitud peso se ajustó a la función:

$$W = a * Lst^b$$

donde,

W : peso de los peces en gramos (g)

Lst : longitud estándar (mm)

a : constante de proporcionalidad (g/mm)

b : coeficiente de alometría

El índice de condición fue calculado como:

$$K = W/Lst^3 * 1 * 10^5$$

donde,

W : peso (g)

Lst : longitud estándar (mm)

La dependencia del índice de condición con la edad fue ajustada a un modelo lineal dado por:

$$K_t = b * t + a$$

donde,

K: índice de condición al tiempo *t*,

b: razón de cambio de *K* con el tiempo

a: ordenada al origen.

Todos los parámetros de las curvas respectivas fueron calculados utilizando programas de cálculo específicos.

IV.e Respuesta de los peces a las condiciones de cría en el laboratorio

IV.e.1. La obtención

La primera partida de alevines, provenientes de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, fue recibida el 28 de octubre de 1998 (Cha98I), en esta oportunidad luego de la aclimatación en el laboratorio se contaron 475 alevines de 24 - 48hs de vida. A ésta le siguió una partida de huevos provenientes de la laguna de Lobos (Lob98I) que, considerando 200 huevos/ml (Bonetto y Castello, 1985), comprendería a un total de 32000 huevos que fueron luego incubados en el laboratorio. Finalmente, ese mismo año se recibió una nueva partida de alevines de Chascomús (Cha98II) que resultó en 750 alevines aclimatados. En la primavera de 1999 se obtuvieron huevos provenientes de un desove realizado en la laguna de Lobos (Lob99I) y alevines cedidos por la estación de piscicultura de Chascomús (Cha99I). Este año se obtuvieron un total de 1100 alevines, 530 de la eclosión de los huevos y 570 de la partida de Chascomús. El año siguiente, la Estación Hidrobiológica otorgó dos partidas de alevines (Cha00I y Cha00II) que resultaron en 1207 y 219 alevines aclimatados respectivamente. En la primavera del año 2001 se recibió de Chascomús (Cha01I) una única partida que resultó en 1520 alevines aclimatados. Finalmente en el año 2002 se recibieron 2 partidas de huevos de la estación de piscicultura de Chascomús (Ch02I y Ch02II) de los cuales se obtuvieron 392 alevines.

Se expresa el número de alevines aclimatados y no recibidos debido a que durante el transporte y aclimatación de los mismos se producen mortalidades muy elevadas y variables que distorsionan los hechos que realmente han acontecido en el laboratorio

(ej. para un valor nominal de 4500 alevines en Cha98I sólo se contaron luego de las 48hs de aclimatación 475, esto equivale a un 89,4 % de mortalidad en ese período mientras que un valor nominal equivalente en Cha00I se obtuvieron 1207 alevines aclimatados representando un 73,1% de mortalidad en el mismo período).

IV.e.2. La eclosión

Los grados de temperatura acumulados, el tiempo medio y porcentaje de eclosión fueron evaluados para Lob99 I y para Cha02 I y II y se presentan en la Tabla IV.1. Puede observarse que los huevos eclosionan entre el octavo y décimo tercer día de fecundados cuando son incubados entre 20 y 22 °C, siendo el tiempo medio de eclosión de 10,3±0.44 días. En promedio los grados acumulados de temperatura por los huevos para su eclosión fue de 211±10,1 °C.

| Tiempo de incubación (d) | Porcentaje diario de eclosión | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|------|---------|------|---------|------|
| | Lob99I | | Cha02I | | Cha02II | |
| | Media | Err | Media | Err | Media | Err |
| 1 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 2 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 3 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 4 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 5 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 6 | 0,0 ± | 0,0 | 1,0 ± | 1,1 | 0,0 ± | 0,0 |
| 7 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 8 | 0,0 ± | 0,0 | 5,0 ± | 3,5 | 0,0 ± | 0,0 |
| 9 | 1,0 ± | 1,0 | 20,0 ± | 5,0 | 16,0 ± | 7,6 |
| 10 | 5,0 ± | 3,0 | 21,0 ± | 8,6 | 50,0 ± | 6,1 |
| 11 | 31,0 ± | 9,0 | 7,0 ± | 3,4 | 10,0 ± | 8,7 |
| 12 | 15,0 ± | 5,0 | 4,0 ± | 2,7 | 0,0 ± | 0,0 |
| 13 | 0,0 ± | 0,0 | 1,0 ± | 1,1 | 0,0 ± | 0,0 |
| 14 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| 15 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 | 0,0 ± | 0,0 |
| Porcentaje medio de eclosión | 52,0 ± | 5,7 | 68,75 ± | 9,54 | 76,0 ± | 6,8 |
| Grados acumulados promedio | 226,6 ± | 53,2 | 192,2 ± | 52,5 | 214,5 ± | 56,5 |
| Tiempo medio de eclosión | 11,2 ± | 0,2 | 9,8 ± | 0,3 | 9,9 ± | 0,2 |

Tabla IV.1. Porcentajes de eclosión de *O. bonariensis* (Lob99I y Cha02I y II) en el laboratorio.

Los datos para cada grupo experimental fueron obtenidos en experiencias de eclosión realizadas por triplicado incubando 20 huevos por cápsula de Petri a una temperatura de entre 20 y 22°C. Lob99I, Cha02I, Cha02II: nombre de cada grupo experimental.

El porcentaje medio de eclosión fue de 66,0±7,2 % y al igual que para los demás parámetros, no hubo diferencias significativas (ANOVA $p < 0,05$, $n = 5$) entre los diferentes lotes. Sin embargo, se observó una tendencia al incremento (20%) en el porcentaje de eclosión promedio desde 1998 a 2002 que podría deberse a variabilidad

inherente de las poblaciones utilizadas o más probablemente a la adquisición de experiencia en el manejo de las ovas. Los porcentajes de eclosión hallados fueron en promedio 10 a 20% mejores que los presentados por otros autores para experiencias realizadas en estaciones de piscicultura al pie de la laguna (Reartes, 1995) o de ciclo de vida completo (Strüssmann, 1982).

IV.e.3. La supervivencia

Luego de la eclosión, la supervivencia general de los alevines interpretada por el modelo exponencial negativo ($r^2 = 0,94$; $n = 35$), ajustado a los datos obtenidos del total de lotes de alevines criados en el laboratorio durante los cuatro años de estudio (Figura IV.5), estima una supervivencia promedio para el primer año de vida de $24,6 \pm 6,9 \%$ y una tasa de mortalidad igual a $16,6 \pm 3,5\%$ (media \pm error estándar, $n = 35$). Estos mismos parámetros para cada lote en particular (Tabla IV.3) muestran una supervivencia anual que va desde 29,3 a 10,1 % y una tasa instantánea de mortalidad (z) del 4,0 al 25,0%.

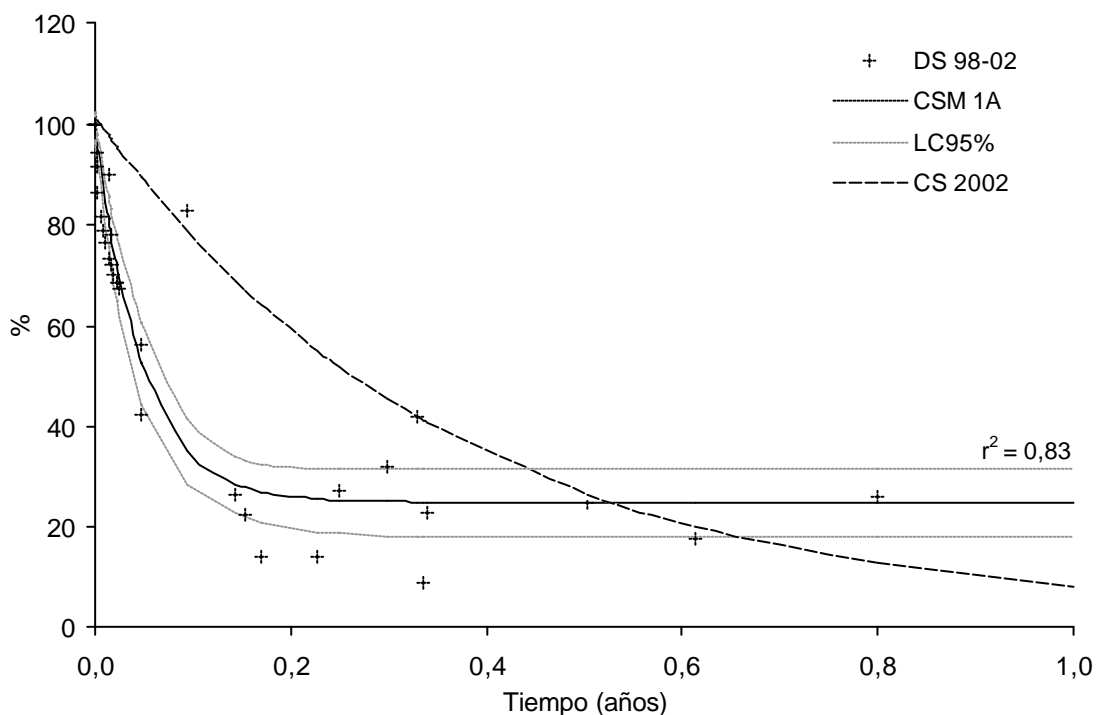


Figura IV.5. Supervivencia de *O. bonariensis* en condiciones de laboratorio.

DS 98-02: total de datos de supervivencia obtenidos a partir de las diferentes cohortes de pejerreyes cultivadas durante los cuatro años de estudio, CSM1A: curva de supervivencia media estimada para el primer año de vida, LC95%: límite de confianza obtenido para la curva de supervivencia estimada para el primer año de vida, CS 2002: curva de supervivencia estimada para la cohorte 2002.

Una mención especial merece el lote Cha02, este lote se ajusta mejor al modelo exponencial negativo tradicional y la tasa anual de supervivencia estimada fue de 7,1 % y z: 2,64. El valor de z estaría indicando una mejora en el manejo de los estadios tempranos respecto a años anteriores que se podría corresponder con la incorporación de comederos automáticos de *Artemia* sp. al sistema, que asegura una distribución más pareja y constante del alimento. Contrariamente, la supervivencia final fue la peor registrada en los cuatro años, esto es coincidente con el año que, por cuestiones climáticas y de infraestructura, se obtuvo la menor producción de plancton en las piletas externas.

| <i>Grupo Experimental</i> | <i>Tasa de Mortalidad</i> | <i>% Supervivencia</i> |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Cha98 I | 17,5 ± 0,68 | 12,0 ± 0,65 |
| Lob 99 I | 17,3 ± 2,84 | 22,5 ± 3,67 |
| Cha99 I | 21,3 ± 5,82 | 14,8 ± 4,57 |
| Cha00 I y II | 25,0 ± 2,52 | 25,8 ± 1,41 |
| Cha01 I | 24,1 ± 3,29 | 29,3 ± 2,51 |
| Cha02 I | 4,0 ± 4,43 | 10,1 ± 22,60 |

Tabla IV.2. Parámetros de las curvas de supervivencia estimadas para *O. bonariensis* en el laboratorio.

La tabla expone los parámetros z y S estimados a partir del ajuste del modelo exponencial ajustado a los datos de supervivencia observados para cada uno de los grupos experimentales de pejerreyes criadas en el laboratorio durante los cuatro años de estudio.

Al comparar estos resultados frente a experiencias realizadas por otros autores, un importante punto de referencia lo constituyen los estudios, realizados en las instalaciones de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, ubicada al pie de la laguna del mismo nombre que cuenta con recursos y personal específicamente asignados al desarrollo de la acuicultura del pejerrey. En ésta Estación se han venido realizando experiencias de cría de pejerreyes en cautiverio por más de una década con miras al repoblamiento de cuerpos de aguas naturales, selección de reproductores y mejoramiento de las condiciones de cultivo. En experiencias allí realizadas con alevines recién nacidos, alimentados con *nauplii* de *Artemia* sp durante los 30 primeros días de vida obtienen una supervivencia promedio de 75,6 % y de 32,8% en una experiencia posterior utilizando alevines de 2 meses de vida alimentados con alimento balanceado molido durante cuatro meses (Berasain et al, 2001). Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el laboratorio, observamos que en ensayos controlados realizados durante los 30 primeros por cuadruplicado utilizando frascos de 2,5 L con 20 alevines por frasco y en dos lotes de alevines diferente (Cha98 I y Lob98 I) alimentados únicamente con *nauplii* de *Artemia* sp (Figura IV.6), los valores de supervivencia son

coincidentes (70%), sin embargo si se estima la supervivencia del modelo obtenido a partir de los alevines (un promedio de 450) criados dentro del sistema de cultivo en los baldes de 20 L, la supervivencia cae a 42,4 %. De aquí se infiere que pequeños cambios en el grado de control de los alevines en esta fase del cultivo, impactan notablemente sobre la supervivencia de los mismos. Al contrastar la segunda experiencia vemos que para el mismo período el modelo de supervivencia en el laboratorio estima un 82 % de sobrevivida que es sustancialmente mayor a la hallada por estos autores.

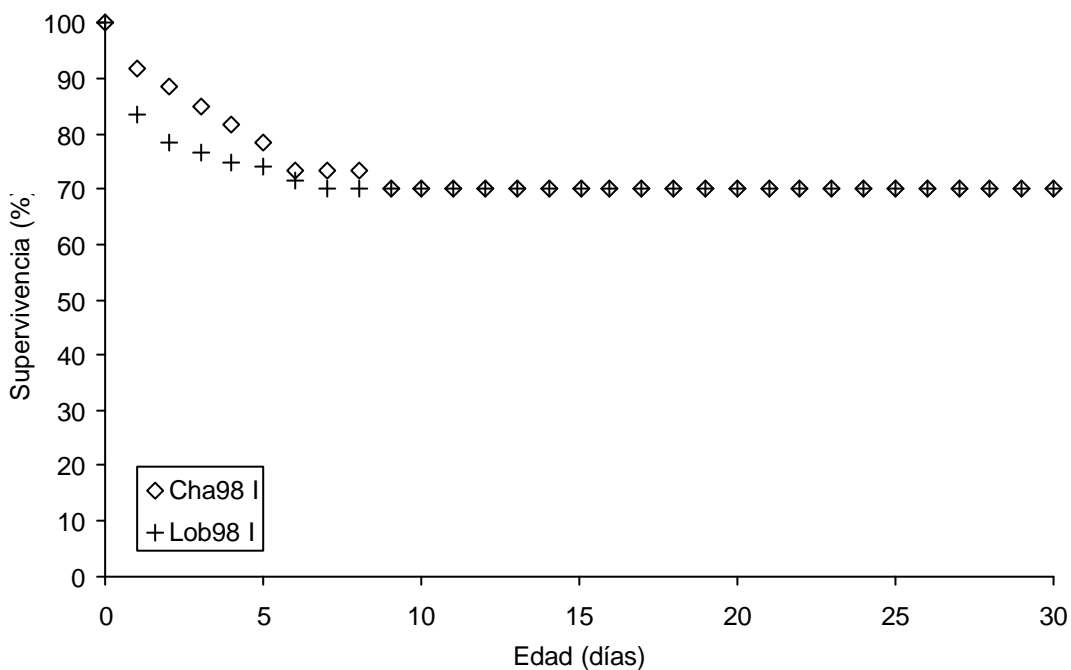


Figura IV.6. Ensayo de Supervivencia de *O. bonariensis* en Condiciones de Laboratorio.

El gráfico muestra el porcentaje de sobrevivientes en dos experiencias realizadas con peces de las partidas Cha98 I y Lob98 I. En cada experimento se colocaron 20 larvas en frascos de vidrio de 2,5 L y se alimentaron "ad libitum" con nauplii de *Artemia* sp. de 24h durante los 30 primeros días. Diariamente se les renovó el agua y se registró el número de sobrevivientes.

Otros estudios realizados en el Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), utilizando alevines de un mes de vida alimentados con zooplancton, alimento balanceado o hígado molido, durante 2 semanas, obtienen supervivencias promedio del 97,5, 58,5 y 65,2 % respectivamente (Reartes, 1995). Al comparar estos resultados con los valores de supervivencia estimados por el modelo para los alevines del laboratorio alimentados con metanauplios de *Artemia* sp., crías de *Daphnia* sp. y alimento balanceado en escamas, se observa que la supervivencia esperada es de 76,9 %, que se ubican entre los grupos con mejor sobrevivida presentados por estos

autores, indicando así que las condiciones de cría logradas en el laboratorio para esta fase del desarrollo han sido muy satisfactorias en lo que respecta a la supervivencia.

Por otro lado si cotejamos los resultados obtenidos en el laboratorio respecto a la cría de alevines a escala semi-intensiva en estanques, vemos que es difícil establecer una comparación general debido a los muy variados valores de supervivencia hallados en este tipo de cultivo. En una experiencia de 15 días realizada en la estación de piscicultura de "Llago Güemes" del partido de Azul, utilizando alevines de 6 días alimentados con perifiton, perifiton más alimento balanceado o alimento balanceado solo, la supervivencia obtenida fue de 43,75, 51,87 y 24,73 % respectivamente (Grosman y Castelain, 1995/6), mientras que en estanques abonados e inoculados con plancton en la estación de piscicultura del Dique San Roque en la provincia de Córdoba, esta fue de 89,2 y 44,0 % a los 135 días (Reartes, 1987) y de 22,0 % para otra experiencia similar pero de 200 días realizadas en el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) (Luchini *et al.*, 1984). De acuerdo al modelo de supervivencia en condiciones de laboratorio, la supervivencia estimada para un período equivalente de 15 días fue de 64,9 % y de 22,5 % para un período de 200 días. Nuevamente observamos que respecto a la supervivencia, las condiciones han sido muy aceptables.

Ahora si comparamos los valores de supervivencia obtenidos en el laboratorio con algunos estudios realizados en ambientes naturales donde se estiman las tasas anuales de supervivencia y tasas instantáneas de mortalidad para poblaciones de "pejerreyes" en cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires, vemos que para la laguna de Lobos la tasa de supervivencia (S) y tasas instantáneas de mortalidad (z) para el año 1972 y 1987 fue: S: 5,4 %, z: 2,9 y S:11,8 % z:: 2,2 respectivamente (Freyre et al, 1997). Los mismos parámetros para el lago municipal de Colón en Junio de 1992 fueron S: 4,5 %, z:: 3.1 (Freyre et al, 1993) y S: 8,4 %, z: 2,5 para la laguna Blanca Grande en Diciembre de 1991. Al compara estos parámetros con los obtenidos para la curva de supervivencia de *O. bonariensis* en condiciones de laboratorio, observamos que aunque las tasas de mortalidad instantáneas en los ambientes naturales son entre cuatro a ocho veces menores a las del laboratorio (z: 16,6), las tasa anuales de supervivencia son entre 2 a cuatro veces menores. Esto se debe a que la mortalidad en el laboratorio es mayor para las edades tempranas pero luego se

estabiliza reduciéndose casi a cero luego de los 100 días de vida. Este fenómeno explica porque el modelo exponencial negativo tradicionalmente utilizado en las poblaciones de campo no se ajustó satisfactoriamente a las condiciones del laboratorio. Si se calcula z para el modelo tradicional a partir de los 3 pejerreyes que sobrevivieron desde 1998 (cuatro años y medio de edad), recordando que para esa partida $N_0 = 475$, el valor obtenido es 1,3 que representa la mitad del valor de z estimado para las poblaciones naturales.

En resumen podemos resaltar respecto a la supervivencia en el laboratorio que :

- las supervivencias obtenidas en el laboratorio han sido equivalentes o mejores a los obtenidos por otros autores en otros tipos de cultivo, indicando que al respecto las condiciones de cría logradas han sido adecuadas.
- las edades tempranas han sido la fase más crítica y sobre la cual se debiera poner más énfasis de modo tal de reducir las mortalidades iniciales (hecho mejorado el último año de estudio con la incorporación de los comederos automáticos).
- la supervivencia en el laboratorio ha seguido un modelo diferente a la estimada para ambientes naturales, con una mayor mortalidad inicial pero una supervivencia final muy estabilizada, resultando de 2 a 4 veces mayor.

IV.e.4. El crecimiento

Al analizar el crecimiento (Figura IV.7) como indicador del grado de adaptación de los pejerreyes a las condiciones de laboratorio, observamos que el modelo de Von Bertalanffy se ajustó satisfactoriamente ($R^2 = 0,89$) a las 1701 mediciones de longitud estándar obtenidas de los peces pertenecientes a los diferentes lotes criados en el laboratorio. A partir de este modelo se estimó una talla máxima teórica (L_∞) igual a 266,5 mm, un coeficiente de crecimiento (k) de 0,34 y un tiempo hipotético en el cual la talla es cero (t_0) de -0,09. Los valores de estos parámetros para cada partida de "pejerreyes" en particular se muestran en la Tabla IV.4. La relación longitud peso

obtenida fue $W = 3,42 \cdot 10^{-6} \cdot Lst^{3,2}$ ($R^2 = 0,98$; $n = 670$). El índice de condición (K) promedio fue de $0,92 \pm 0,01$ (media \pm error estándar, $n = 670$) con un valor máximo de 1,60 y uno mínimo de 0,62, presentando una tendencia creciente en función de la edad, desde los juveniles de cuatro meses ($0,82 \pm 0,01$; $n = 118$) a los adultos de cuatro años y medio ($1,19 \pm 0,04$; $n = 2$).

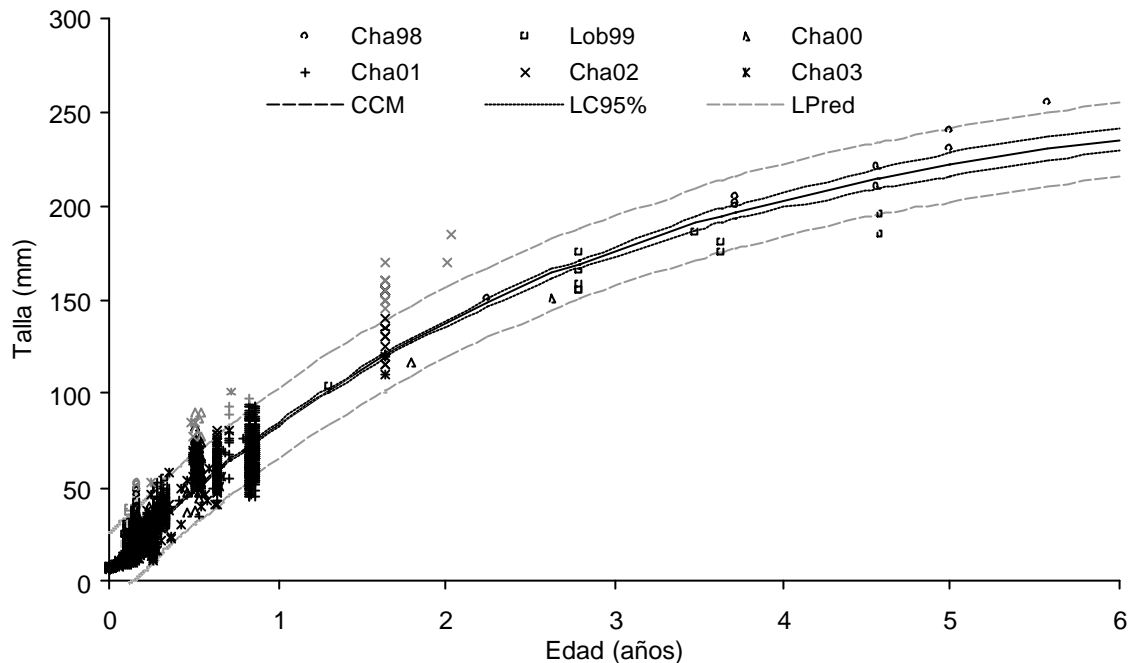


Figura IV.7. Crecimiento de *O. bonariensis* en Condiciones de Laboratorio.

Curva de crecimiento promedio para *O. bonariensis* cultivado en condiciones de laboratorio, obtenida ajustando el modelo de crecimiento en talla de von Bertalanffy a los datos de crecimiento observados durante casi seis años de estudio. Puntos con diferentes símbolos: representan datos de crecimiento de los diferentes grupos experimentales, CCM: curva de crecimiento estimada, LC50%: límites de confianza del 95%, LPed: límites de predicción del modelo.

En experiencias semejantes realizadas en la Estación Hidrobiológica de Chascomús durante los 30 primeros días de vida, con alevines criados en peceras y alimentados únicamente con *nauplii* de *Artemia* sp., se han obtenido individuos con una talla media de 16,36 mm. Luego, en una etapa intermedia, alevines de 25 días alimentados con alimento balanceado durante tres meses (89d) alcanzaron una longitud estándar de 51,85 mm con un índice de condición (K) de 1,18. Finalmente en una etapa de cría en tanques hasta los 188 días de vida, los alevines lograron una talla media de 87,6 mm con un K que va desde 1,02 al inicio de la experiencia (65 días de vida) hasta 1,52 en su finalización. Los parámetros más relevantes de la curva de crecimiento obtenida a partir de estos estudios, sumados a otra etapa ulterior donde los pejerreyes fueron cultivados en estanques rectangulares de 100 m² y alimentados con alimento balanceado, fueron L_{∞} : 317,6 mm y k : 0,45 (Berasain *et al.*, 2001). Al comparar estos

resultados con los obtenidos en el presente estudio, observamos que al primer mes de vida los peces en el laboratorio presentaban una talla promedio de 15,11 mm, al cabo de 90 días de 28,6 mm y a los 200 días es de 51,6 mm. Por otro lado, los valores de índices de condición a los 90 y 200 días fueron 0,82 y 0,93 respectivamente, y los parámetros de la curva de crecimiento fueron L_{∞} : 266,8 y k : 0,34. Esto quiere decir que el crecimiento esperado en el laboratorio fue un 16% menor en talla y un 25% más lento (tiempo para alcanzar la talla teórica máxima dado por el valor de k) y con un índice de condición sensiblemente menor respecto al obtenido en la estación de piscicultura.

| Grupo Experimental | L_{∞} | LC95% | k | LC95% | t_0 | LC95% |
|--------------------|--------------|---------------|-------|---------------|--------|-----------------|
| Cha98 I | 247,4 | 233,1 - 261,6 | 0,438 | 0,384 - 0,492 | -0,024 | -0,037 - -0,011 |
| Lob 99 I | 239,8 | 208,6 - 271,0 | 0,388 | 0,310 - 0,466 | -0,134 | -0,162 - -0,106 |
| Cha00 I y II | 213,4 | 161,8 - 264,9 | 0,585 | 0,412 - 0,758 | -0,053 | -0,063 - -0,043 |
| Cha01 I | 322,0 | 104,4 - 539,7 | 0,254 | 0,054 - 0,453 | -0,089 | -0,116 - -0,062 |
| Cha02 I | 283,2 | 205,3 - 361,2 | 0,353 | 0,284 - 0,422 | -0,074 | -0,148 - 0,000 |

Tabla IV.3. Parámetros de las curvas de crecimiento estimadas para *O. bonariensis* criado en condiciones de laboratorio.

La tabla expone los parámetros del modelo de von Bertalanffy estimados para cada uno de los lotes de pejerreyes criados en el laboratorio. L_{∞} : talla hipotética máxima, k : coeficiente de crecimiento, t_0 : tiempo hipotético al cual la talla es cero, LC50%: límite de confianza del 95%

En estudios de crecimiento realizados en el INTECH, partiendo de alevines de un mes de vida alimentados a zooplancton, alimento balanceado ó hígado molido, al cabo de quince días obtienen una talla promedio - longitud total, (L_t) - de $24,45 \pm 1,48$, $18,15 \pm 0,21$ y $18,3 \pm 2,26$ respectivamente para cada dieta (Reartes, 1995). En comparación, la talla (expresada como L_t) obtenida en el laboratorio para los 45 días de edad fue de $21,10 \pm 0,53$, que se halla entre los grupos que presentaron mejor crecimiento.

Las experiencias llevadas a cabo en los estanques de $15,4 \text{ m}^2$ de la estación de piscicultura del Lago Güemes del partido de Azul con alevines criados con alimento natural, lograron a los 102 días alevines con una longitud total de 45,0 mm. (Grosman, y Castelain, 1996). En otra experiencia realizadas por el INIDEP empleando estanques con abonado orgánico e inorgánico y con o sin adición de alimento balanceado, obtienen un crecimiento (longitud total) mínimo de 109 mm al cabo de 310 días con un K de 0,74 y un crecimiento máximo de 123 mm luego de 436 días con un K de 0,98 (Luchini *et al.*, 1984). El crecimiento de los pejerreyes en el laboratorio para igual lapso de tiempo fue: $L_t = 35,9$ para los 102 días, $L_t = 106,3$ mm y $K = 0,91$ a los 436 días y L_t

= 82,14 y $K = 0,86$ a los 310. Al comparar observamos que respecto a este estudio el crecimiento obtenido fue en conjunto un 20 % menor, sin embargo el índice de condición de los individuos fue en promedio, equivalente al reportado por estos autores.

Quizás el mayor avance en la acuicultura en cautiverio del pejerrey se haya dado en Japón donde desde el año 1966 se ha venido trabajando en el establecimiento del cultivo de esta especie con fines comerciales (López y García, 2001; Tadasi, 2001; Strüssmann, 1982). El crecimiento anual obtenido para pejerreyes criados en la Estación de Piscicultura de Peces de Agua dulce de la Prefectura de Kanagawa ha sido de 150 mm (Strüssmann, 1982) y representa 1,8 veces el crecimiento obtenido en el laboratorio.

Si atendemos al crecimiento del pejerrey en algunos ambientes naturales, encontramos que por ejemplo para la laguna de Lobos las longitudes máximas (L_{∞}) y coeficientes de crecimiento (k) hallados el año 1972 y 1987 fueron L_{∞} : 400,0 mm; k : 0,378 y L_{∞} : 446,5 mm; k : 0,3876 respectivamente (Freyre et al, 1997). Los mismos parámetros pero para la laguna Blanca Grande en el mes de Diciembre de 1991 fueron 500 y 0,548 con un K que varía desde 0,95 a 1,50 (Freyre y Sendra, 1993) y para el lago Municipal de Colón en Junio de 1992 de 582 y 0,10165, con un K que oscila desde 0,7 a 1,4 (Freyre et al, 1993). Los mismos parámetros en el laboratorio fueron: L_{∞} : 266.8; k : 0,34 y K : 0,6 - 1,2, de donde se observa claramente el menor crecimiento y en general una condición más baja de los "pejerreyes" criados en el laboratorio respecto a los ambientes naturales.

En resumen podemos afirmar que:

- el crecimiento obtenido en las condiciones de laboratorio ensayadas ha sido similar o levemente menor al hallado en otras experiencias realizadas en estaciones de piscicultura, y substancialmente más bajo que el observado en los ambientes naturales.
- si bien los pejerreyes mostraban abundante reserva lipídica rodeando el sistema digestivo al ser disectados y no presentaron síntomas de malnutrición (excepto en

el año 1998), siendo además la tasa de supervivencia aceptable, el índice de condición de los pejerreyes en el laboratorio ha sido, en promedio, menor al observado en las estaciones de piscicultura y en los ambientes naturales citados.

IV.e.5. *La reproducción*

El 21/09/2000 y el 18/10/2001 dos de los pejerreyes correspondientes al lote Cha98 desovaron espontáneamente en el laboratorio, aproximadamente 4 y 6 mililitros de huevos respectivamente, cada año. Sin embargo ninguna de las ovas fue fecundada. Este hecho puede atribuirse a la ausencia de machos, puesto que debido a la temperatura de incubación debiera esperarse menos de un 5 % de machos a partir de los alevines nacidos en el laboratorio (Strüssmann *et al.*, 1996; 1997). El año 2002 no se observó desove alguno, probablemente debido a una deficiente alimentación de los adultos causada por la escasez de cladóceros.

A pesar de fallidos, la observación de estos desoves espontáneos de pejerreyes nacidos y criados por 2 y 3 años en el laboratorio es muy interesante ya que demuestran la potencial habilidad de estos peces de reproducirse en dichas condiciones. De todos modos, de la simple observación del fenómeno hasta el logro de la inducción del desove sincronizado y su posterior fecundación hay un arduo trabajo por desarrollar. En tal sentido son muy promisorios los estudios sobre la endocrinología reproductiva de la especie que han sido realizados en los últimos 10 años, entre otros, por Stefano *et al.* (1995), Stefano *et al.* (1997), Vissio *et al.* (1997), Somoza *et al.* (2002) y Miranda *et al.* (2003).

IV.e.6. *El estado sanitario*

La aparición de enfermedades en sistemas de cultivo intensivo es un hecho frecuente debido fundamentalmente al hacinamiento, la reducción y estabilización de las variables ambientales, fenómenos de consanguinidad y aumento de la supervivencia de aquellos organismos que no hubieran sido aptos para sobrevivir en la naturaleza (Speare, 1998). Durante los casi cinco años de estudio, sólo se observaron, en los "pejerreyes" criados en condiciones de laboratorio, infestaciones por hongos del género *Saprolegnia* y deformaciones corporales.

La aparición de hongos se ha observado en individuos de todas las edades pero generalmente la frecuencia ha sido mayor cuanto menor es la edad de los peces, pudiendo causar mortalidades importantes (10 – 20 %) hasta el primer mes de vida, aunque en general es posible erradicarla fácil y rápidamente si es tomada a tiempo. Las causas de esta afección no son claras, en general no se trata de una entidad nosológica primaria sino que podría estar relacionado con algún daño mecánico, ambiental ó biológico previo que predispone al organismo a ser colonizado (Bruno y Wood, 1999; Romero, 2001), sin embargo en este caso particular parecería corresponderse más con infecciones de tipo primarias (Pickering y Christie, 1980). La infección se detecta tempranamente debido a la forma circular característica del micelio color blanco en forma de minúsculo copo de algodón en la superficie corporal (Bruno y Wood, 1999) hecho que lo hace muy notable en contraste al fondo oscuro del tanque. La identificación del hongo se realizó tomando una impresión de la zona afectada (Krishna *et al.*, 1990), tiñéndola con azul de metileno (Bruno y Stamps, 1987) y luego observándola al microscopio óptico. El tratamiento recomendado para la saprolegniasis es el baño con verde de malaquita (Bruno y Wood, 1999) pero en este estudio, aprovechando la eurihalinidad del "pejerrey", ha resultado más eficiente y de menor costo la utilización del baño con NaCl (Bruno y Wood, 1999; Strüssmann, 1982). Tan pronto como la aparición del hongo fue detectada, y en algunos casos preventivamente, se aisló del sistema al tanque afectado, se redujo al máximo el volumen de agua y luego se agregó salmuera hasta alcanzar la salinidad del 5-10 ‰. El baño se prolonga 2 a 3 días hasta la desaparición del hongo. Durante ese período se alimentó a los peces sólo con alimento vivo. Finalmente se eliminó el agua salada y se reemplazó nuevamente con agua dulce.

Las deformaciones corporales son un fenómeno frecuente en los peces, observándose fundamentalmente producidas durante la etapa de desarrollo (Brown y Nuñez, 1998). En general es difícil asignar las causas de su aparición a un factor específico ya que su ocurrencia puede ser de origen genético (herencia, consanguinidad), ambiental (físico, químico o biológico) ó nutricional (Brown y Nuñez, 1998). Durante los cuatro años de estudio se observaron cuatro tipos principales de deformaciones corporales: a) aparición de una o dos curvaturas de la columna vertebral en el plano sagital, b) curvatura repentina de la columna vertebral el plano longitudinal, justo detrás de la cabeza y presentando edematisación, c) deformaciones mandibulares y d) deformaciones operculares.

a) El primer tipo de deformación se observó sólo durante los años 1998 y 1999, mientras que en los años subsiguientes se observaron sólo organismos desproporcionadamente cortos pero no curvados. Esta malformación afectó a alevines de entre uno y dos meses de vida en una proporción de sólo $1,32 \pm 0,07$ % (media \pm error estándar $n = 392$) y en general no poseía consecuencias letales. Debido a que la carencia de aminoácidos esenciales como el triptófano (Akiyama et al., 1986; Post, 1993) es uno de los factores responsables de malformaciones óseas en peces y que es conocida la deficiencia de los *nauplii* de *Artemia* sp en histidina, fenilalanina, treonina y metionina (Claus et al. 1979; Coll Morales, 1986) se asumió que el problema era de índole nutricional. Por tal motivo, se resolvió acortar el período de alimentación exclusiva a *nauplii* de *Artemia* sp. comenzando a adicionar el alimento balanceado en la dieta a partir de los 15 días de vida en lugar de a partir de los 30 días como había sido realizado hasta el momento. Los resultados fueron positivos ya que esta afección no fue observada en los años posteriores.

b) El segundo tipo de malformación, se observó con mayor predominancia en los años 2001 y 2002 en alevines de mayor edad (entre dos y tres meses) y coincidió con un exceso en la alimentación de los peces con alimento balanceado en escamas para suplementar deficiencias en la producción de alimento vivo. En cuestión de pocos días, los peces (en general los de mayor tamaño y mejor índice de condición) se tornan mucho más sensibles al estrés causado por el manejo (sifoneado del fondo, alimentación, encendido de luces, etc.) y repentinamente pareciera quebrársele la columna en una región cercana a la parte posterior de la cabeza, con formación de un edema en la región anterior del lomo (se inflama y oscurece debido a un aumento de la irrigación, los vasos sanguíneos pueden observarse a simple vista) e inmediatamente los peces pierden la coordinación natatoria, manteniéndose a flote sólo por el movimiento de las aletas y movimientos bruscos y asincrónicos del cuerpo. Cuanto más anterior es la "quebradura" mayor el grado de inmovilidad y la mortalidad. Este fenómeno, en la mayoría de los casos letal, puede causar mortalidades de hasta un 10 % en sólo un par de días. La supresión inmediata del alimento balanceado ha demostrado devolver a los peces a su conducta normal en uno o dos días. Aunque no se ha realizado un estudio más profundo de las causas de esta malformación es evidente que el exceso de alimento balanceado genera algún tipo de disturbio metabólico en estos peces que los predispone al estrés que causa el quiebre de la

columna vertebral y produce una disrupción en el sistema nervioso que coordina el movimiento natatorio.

c) Las malformaciones mandibulares suelen ser muy frecuentes en los sistemas de cultivo intensivo (Brown y Nuñez, 1998). De los juveniles inspeccionados ($n = 392$), el 5,2 % presentó algún tipo de deformación mandibular. A pesar de ello, la condición (K) de estos individuos fue normal para el grupo indicando que esta afección no parecería estar afectando la capacidad para tomar el alimento. Sin embargo es sabido que tal deformación es responsable de un porcentaje importante de las mortalidades en etapas tempranas de los alevines (Coll Morales, 1986), por lo que es probable que sólo sobrevivieran aquellos individuos donde ésta afección no fuera tan severa y por lo tanto su frecuencia sea mayor a la que se ha podido determinar. Las causas parecieran ser de índole genético, aunque también podrían ser atribuidas a las condiciones de iluminación (Bolla y Holmefjord, 1988). Los posibles efectos causados por cambios en la temperatura descritos por otros autores (Pittman et al., 1990) son descartados debido a la estabilidad térmica de las condiciones del laboratorio.

d) El $1,59 \pm 0,2$ % (media \pm error estándar, $n = 392$) de los organismos presentó algún tipo de deformación opercular. Las observaciones más frecuentes fueron, opérculos cortos y opérculos replegados. Esta afección no pareció tener gran incidencia en la mortalidad, crecimiento ni índice de condición de los peces.

IV.f Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los objetivos particulares planteados y a los resultados obtenidos, durante estos cuatro años de estudio, respecto al cultivo de *O. bonariensis* en el laboratorio podemos resaltar que:

- El sistema cerrado de cría diseñado resultó adecuado para los objetivos propuestos sobresaliendo i) su costo reducido, ii) mínimo requerimiento de mano de obra para su operación y mantenimiento, iii) estabilidad y confiabilidad, iv) versatilidad, y v) capacidad de carga acorde a las necesidades planteadas. En otras palabras, el costo total del sistema fue equivalente al de tres pipetas

automáticas o un destilador de agua, su operación y mantenimiento requirió en promedio de una hora/hombre por día, su funcionamiento fue ininterrumpido durante cuatro años sin inconvenientes y en el momento de mayor carga, con casi dos kilos de peces (1/5 de su carga máxima teórica), mantuvo los niveles de amonio casi 10 veces por debajo del límite recomendado y las concentraciones de oxígeno y COD dentro de los valores normales.

- El método más adecuado de obtención de pejerreyes para su utilización en bioensayos fue por medio de la fecundación a campo o la obtención de ovas fecundadas y su posterior incubación en el laboratorio, este proceso demostró ser más eficiente que el transporte y aclimatación de los alevines. Así de 1000 huevos (la mitad de huevos del desove de una hembra de un año, Bonetto y Castello, 1985) se obtendrían 660 alevines, en contraposición de los 116 que sobrevivirían en promedio de una partida de igual número de huevos, pero de alevines recién nacidos.
- Los "pejerreyes" se adaptaron correctamente a las condiciones del laboratorio, quedando esto verificado en los valores de supervivencia obtenidos. Sin embargo la obtención de alimento de calidad y en cantidad suficiente para asegurar un crecimiento semejante al presentado en ambientes naturales fue un punto crítico. Para exponer un ejemplo tangible de lo que esto significa, si se quisiera mantener 1000 juveniles de 5 g por un período de un mes a una ración diaria igual al 5% PH del pez, se necesitarían 7,5 Kg. (0,5 Kg/d) de alimento balanceado o su equivalente aproximado, 140 Kg. (4,7 Kg/d) de cladóceros, para lo cual, si se contara con una excelente producción de cladóceros (900 g/semana/m³, Coll Morales, 1986), se necesitaría un volumen de cultivo de 36,6 m³. De ésta conclusión se deriva una regla interesante, que indica: que para obtener un desarrollo adecuado de un pejerrey alimentado únicamente a plancton, se necesitará un volumen mínimo de cultivo de plancton capaz de producir diariamente entre una (antes del año) o media (luego del año) vez su propio peso. La recíproca es igualmente válida, la capacidad de carga máxima de pejerreyes (alimentados sólo a plancton) de un sistema de cría será, en gramos, equivalente a una o dos veces la producción diaria de plancton que este posea.

- La supervivencia y el crecimiento de los pejerreyes en el laboratorio fueron interpretados por las ecuaciones $N = N_0 * e^{-(16,61*t)} + 21,5$ ($N = N_0 * e^{-(2,64*t)}$, para Cha02) y $Lst = 266,48 * [1 - e^{-0,336*(t+0,09)}]$ respectivamente y con una relación entre la longitud y el peso dada por $W = 3,42 \times 10^{-6} \times Lst^{3,22}$. Esto significa que por ejemplo si necesitara realizar un ensayo con 1000 juveniles de 5 g, debería partirse al menos de 7048 huevos o 4652 alevines aclimatados y criarlos durante 366 días (un año y un día).

Las reflexiones previamente expuestas, no deben ser tomadas como conclusiones definitivas, sino más bien como una base para el desarrollo de un sistema de cultivo de ciclo de vida completo del "pejerrey" en condiciones de laboratorio. Al respecto dos temas pueden ser señalados como prioritarios para futuros estudios:

- El desarrollo de alimentos balanceados con características apropiadas - nutritivas, palatales, texturales (color, tamaño, flotación)- para los diferentes estadios de crecimiento y a costos accesibles.
- El desarrollo de un método de inducción y sincronización de la reproducción en cautiverio.

Como comentario final puede agregarse que contrariamente a la creencia general que sostiene que el pejerrey es un pez que no puede ser mantenido en condiciones de laboratorio por períodos prolongados, el presente estudio ha demostrado que con un manejo y entrenamiento adecuados esto es factible, abriendo un nuevo campo a la biología experimental de esta especie tan relevante para nuestra región.

IV.g Protocolo para la Cría de O. bonariensis en el Laboratorio

El siguiente protocolo tiene como objeto sistematizar las etapas y condiciones de cría para el cultivo de *O. bonariensis* en condiciones de laboratorio de acuerdo a los antecedentes bibliográficos y los resultados obtenidos a partir del presente estudio.

IV.g.1. Obtención

Se recomienda la obtención de ovas a partir de alguna estación de piscicultura o directamente del campo. Para la fecundación a campo el método más eficiente y menos dañino es el uso de trampas. Estas deberán ser tendidas durante toda la noche y revisadas a primera hora de la madrugada. El copo de la trampa se abrirá sobre el piso del bote y rápidamente se deberá realizar una selección de los pejerreyes adultos (machos y hembras de mayor tamaño y mejor aspecto) que serán colocados en un tanque o baldes con agua. Luego se devolverá el resto de los peces al agua para evitar mortalidades innecesarias. Las ovas deberán obtenerse sólo de hembras maduras (huevos grandes, cristalinos y de característico color verdoso) para evitar huevos no fecundados que luego puedan contaminar con hongos al resto. Los huevos se obtienen realizando un suave masaje abdominal de adelante hacia atrás a las hembras seleccionadas, y colocándolos en un plato hondo o recipiente equivalente. El número de hembras utilizadas dependerá del número de huevos que se requiere (la relación entre N° de ovas y longitud estándar es de 107 a 33,4 ovas/cm en septiembre y febrero respectivamente, Calvo y Dadone, 1972) y la relación de fecundación es de un macho cada tres o cuatro hembras. El esperma, también extraído por masaje abdominal, se mezcla con los huevos utilizando la cola del pescado y se dejan reposar por un minuto. Luego se les agrega agua para la hidratación de los huevos y se los deja por dos a tres horas hasta que toman una consistencia coriácea. Seguido se procede al corte de los filamentos a tijera, se lavan y se hace el recuento volumétrico (aproximadamente 200 huevos/ml). Los huevos se colocan en botellas de plástico semi-llenas con agua fresca y son transportados hasta el laboratorio, refrigerados a una temperatura próxima a los 15 °C.

IV.g.2. Incubación

Al llegar al laboratorio los huevos son incubados a una densidad no mayor de 4500 huevos por litro y con un flujo de 50 L/h controlando que todos los huevos sean resuspendidos por el paso del agua. Todos los días se deberán sacar los huevos muertos, cortar filamentos de huevos que se hayan aglutinado nuevamente y desinfectar las incubadoras lavándolas con cloro y enjuagando con abundante agua.

IV.g.3. Fase 1

Durante las primeras 48 h los alevines serán mantenidos en recipientes de 20 L sin alimentación y a densidades iniciales de hasta 20 larvas/L. Debe asegurarse un flujo constante de agua de 50 L/h. Puede agregarse una aireación suave en el recipiente pero es preferible oxigenación del agua previo a su entrada al recipiente. Haciendo sifón con una manguera pequeña, eliminar diariamente las larvas muertas en el fondo.

IV.g.4. Fase 2

Luego de las 48 h se comienza a suministrar *nauplii* de *Artemia* sp de 24 h de vida (la edad de la *Artemia* sp es un factor crítico) primero en pequeñas cantidades hasta verificar que está siendo tomada por los alevines y luego *ad libitum*. Aquí es conveniente usar comederos automáticos (ver en "Descripción del sistema de cría...") y airear el recipiente para mantener resuspendida la *Artemia* sp., que tiende a sedimentar en el fondo del recipiente. Luego del día 15 de vida comenzar a ofrecer a los alevines alimento balanceado en escamas molido (preferentemente alimentos que posea al menos un 47 % de proteínas pero su costo suele ser muy elevado, ej. Tetramin Babe[®]) y crías de *Daphnia* sp en lo posible cuatro veces al día (ej. 8, 11, 14, 17h) ó en su defecto dos (ej. 8 y 17h). La ración diaria debe ser igual al 5% PH de los peces. Por sifón eliminar diariamente los alevines muertos y los restos de alimento del fondo.

IV.g.5. Fase 3

Cumplido el mes de vida, los juveniles son trasferidos a los tanques de cría a una densidad de hasta 1 individuo/L y son alimentados con alimento balanceado en escamas y adultos de *Daphnia* sp. El alimento es suministrado a una ración igual al 5 % PH de los peces dos veces al día. La proporción alimento balanceado: alimento vivo puede ser variable según la disponibilidad del último pero en general una buena relación es 3:2 respectivamente. Los juveniles muertos y los restos de alimento del fondo deben ser eliminados diariamente por sifón.

IV.g.6. Fase 4:

Luego del año los pejerreyes son mantenidos en los tanques a densidades de 0,1 pez/L y se les ofrece alimento balanceado para truchas en pellets N°1 y adultos de *Daphnia*

sp. La ración diaria es de 2,5 % PH del pez y las proporciones entre los dos tipos de alimentos son 2,4 : 0,1 balanceado/*Daphnia* sp.

El resumen de las condiciones previamente descritas junto a las curvas de supervivencia y crecimiento esperadas para las diferentes fases de cultivo del "pejerrey" en el laboratorio, se muestran en la Figura IV.8. Estas pueden constituir una guía útil para quienes intenten emprender estudios experimentales con ésta especie.

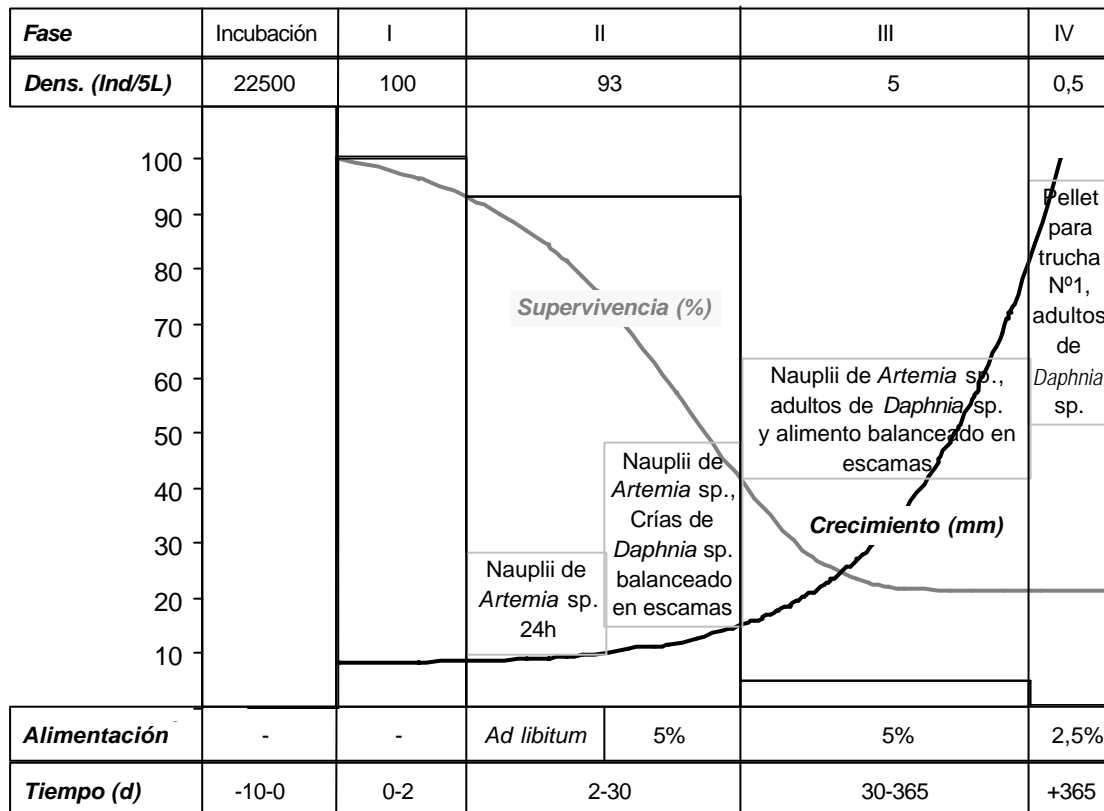


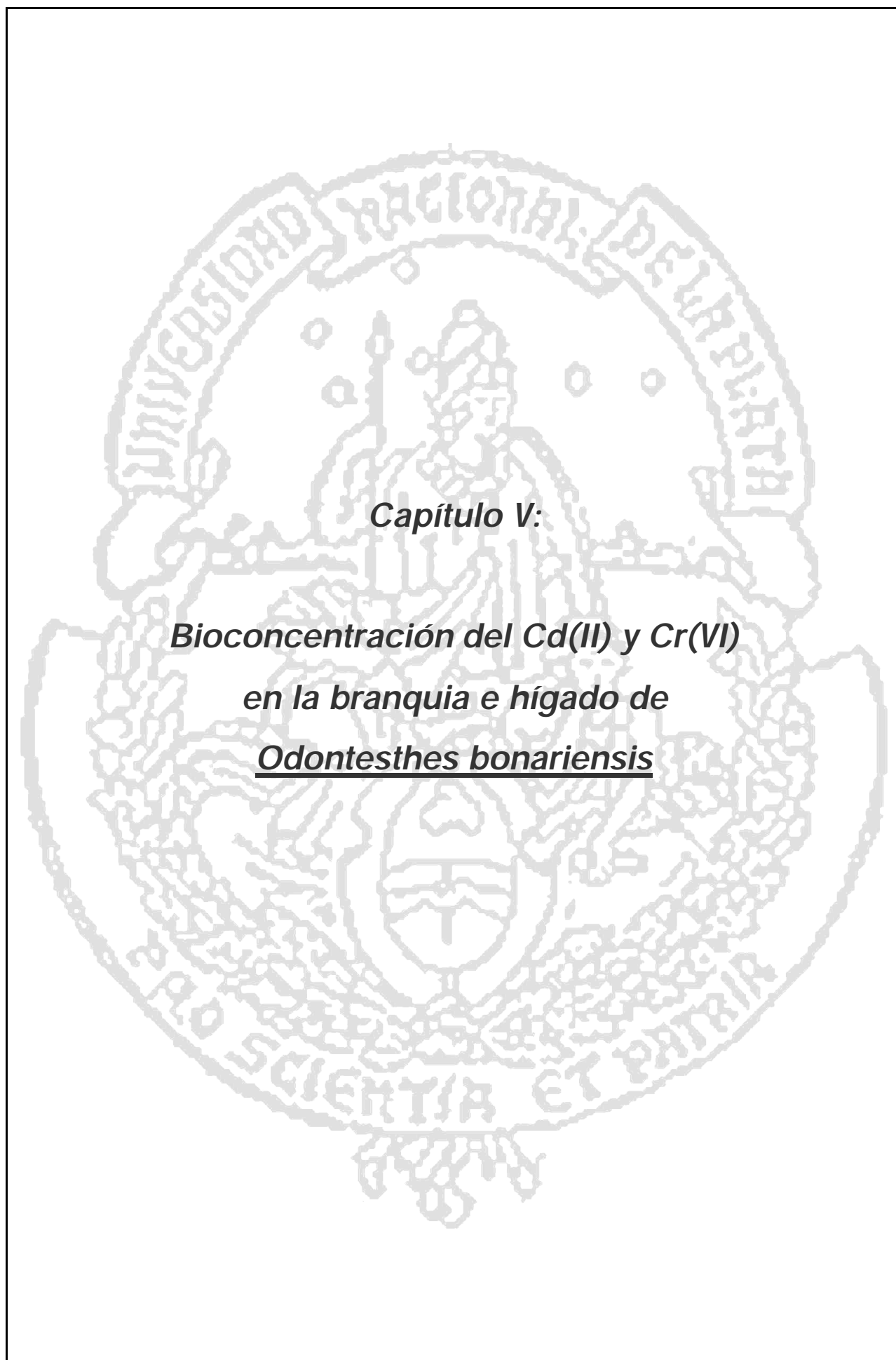
Figura IV.8 Resumen de las condiciones de cría empleadas y las curvas de supervivencia y crecimiento esperadas para las diferentes fases de cultivo de *O. bonariensis* en el laboratorio.

En la figura, se muestran las condiciones de cría, que van variando de acuerdo con cada fase del cultivo, conjuntamente con la evolución de la supervivencia y el crecimiento a medida que avanza el cultivo. Nótese que la densidad está expresada como huevos o individuos por cada 5 litros de agua para una mejor visualización de los valores, y que el eje temporal se encuentra en escala logarítmica para amplificar las fases más cortas.

IV.g.7. Condiciones de laboratorio

Debido al costo de preparar agua sintética, para el cultivo, se recomienda el uso de agua corriente de clorinada y filtrada a través de carbón activado. La temperatura del agua puede mantenerse entre 15 a 25 °C según las necesidades (la tasa metabólica aumenta con la temperatura y con ella el consumo de O₂ y alimento además de la tasa excreción), siendo 21±1 °C una temperatura recomendable. Los niveles de NH₃

(amonio no ionizado), NO_2^- y NO_3^- nunca deben ser superiores a 0,005, 10 y 200 mg/L, respectivamente, el pH debe mantenerse cercano a 7,4, la dureza debe ser entre 50 y 100 mg CaCO_3/L y el OD no debe ser inferior a 5 mg/L. El sistema tendrá que ser capaz de recircular toda el agua de los tanques de cría cada 1 o 2 h. La intensidad de iluminación debe mantenerse entre 10 o 20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y el fotoperíodo se regulará según las necesidades, los valores más comúnmente utilizados son 12:12 o 16:8 luz/oscuridad.



Capítulo V:

**Bioconcentración del Cd(II) y Cr(VI)
en la branquia e hígado de
Odontesthes bonariensis**

Capítulo V. Bioconcentración del Cd(II) y Cr(VI) en la branquia e hígado de Odontesthes bonariensis.

V.a Introducción

V.a.1. Generalidades y definiciones

Los seres vivos son sistemas abiertos que permanentemente están intercambiando materia y energía con su entorno. Dicho intercambio, es altamente selectivo y se encuentra finamente regulado por los organismos para mantener la homeóstasis interna y así lograr permanecer en un equilibrio dinámico con el ambiente. Esta regulación activa de la homeostasis, requiere de energía que a su vez es obtenida en última instancia del entorno. Algunos contaminantes (ver definición de contaminante en el Capítulo I) tienen la capacidad de "burlar" tales sistemas de control, ya sea por ser sustancias comunes a los seres vivos, pero en cantidades anormalmente altas (ej. NaCl, Cu^{+2}), por poseer una estructura semejante a compuestos comunes del metabolismo y mimetizarse con ellos (ej Cd^{+2} y Cs^{+} son respectivamente análogo del Ca^{+2} y K^{+} ; Newman y Unger 2003) o por tratarse de sustancias xenobióticas, completamente "desconocidas" para los controles normales metabolismo (ej. bifenilos policlorados, dioxinas). De ésta manera, algunos tóxicos son capaz de ingresar al organismo y allí acumularse.

El modo en que un contaminante se bioacumule dependerá principalmente de sus propiedades fisicoquímicas y de la ruta de exposición. Así, los compuestos orgánicos con gran afinidad por moléculas hidrofóbicas se acumularán en relación a los lípidos, mientras que los metales, con gran afinidad por moléculas ricas en grupos electronegativos (ej. sulfidrilos), tenderán a hacerlo vinculados a las proteínas. Por otro lado, la distribución de un contaminante en los distintos tejidos de un organismo acuático será diferente si este es incorporado con el alimento o si lo es a través del agua. Por ejemplo en truchas expuestas a Cd a través del alimento, la acumulación relativa del metal será mayor en el intestino, mientras que en aquellas expuestas a través del agua esta será mayor en la branquia (Handy, 1992a y b)

A la acumulación neta de un contaminante en (o sobre) un organismo, considerando todas las posibles fuentes de exposición, se lo define con el término de *bioacumulación*, mientras que con el término *bioconcentración* (más restringido) se

define a la acumulación neta de un contaminante en (o sobre) un organismo pero cuando este proviene únicamente desde el agua circundante (Newman y Unger, 2003).

V.a.2. Factores que afectan la bioconcentración

La acumulación de los contaminantes depende principalmente de cuan biodisponibles se encuentren. En el caso particular de los metales en el medio acuático, la biodisponibilidad está en relación a la especie química (forma fisicoquímica en la que se presenta un determinado elemento) que este presente y que variará según las características químicas del agua. Los metales solubles (forma iónica) pueden dividirse en tres categorías según su especiación: i) libres, ii) complejados a un anión inorgánico ó iii) complejados a un ligando orgánico (Olsson, 1989). Las principales características químicas del agua que afectan la especiación de los metales son la dureza, el pH, la salinidad, el contenido de materia orgánica y la presencia de agentes complejantes (Tabla V.1.).

Tabla V.1. Características químicas del agua que condicionan la especiación química de los metales (Olson, 1998).

| <i>Variable ambiental</i> | <i>Factor modulador</i> | <i>Efecto</i> | <i>Biodisponibilidad</i> |
|---------------------------|-------------------------------|---|--------------------------|
| Dureza | Ca ⁺⁺ | agonista del Cd ⁺² y el Zn ⁺² por competencia con los sitios de unión del Ca ⁺⁺ en canales y bombas proteicas. | disminuye |
| | CO ₃ ⁻² | forma complejos con los metales que reducen su biodisponibilidad. | disminuye |
| Salinidad | Cl ⁻ | incrementa la formación de cloruros del metal | disminuye |
| pH | H ⁺ | incrementa la forma iónica libre del metal | aumenta |
| | OH ⁻ | incrementa la formación de hidóxidos del metal | disminuye |
| Materia orgánica | Sustancias húmicas | incrementa la formación de complejos orgánicos | disminuye |
| Agentes complejantes | EDTA, NTA | incrementa la formación de complejos orgánicos que secuestran el metal | disminuye |
| | Xantatos | incrementa la formación de complejos orgánicos que aumentan la lipofilicidad del metal | aumenta |

V.a.3. Descripción biológica del proceso

La bioconcentración de un contaminante puede ser conceptualizada cómo la resultante entre los procesos de i) incorporación, ii) biotransformación y iii) eliminación del tóxico.

i) Desde el punto de vista biológico, el *proceso de incorporación* implica un transporte del contaminante desde el medio exterior hacia la superficie o el interior del organismo. Los fenómenos fisicoquímicos más comúnmente asociados a este proceso son:

a) *Adsorción*, que puede definirse como la acumulación de una sustancia ente el límite de dos fases (ej. sólido-líquido) y que se expresa formalmente a partir de la ecuación empírica de las isotermas de Freundlich o de la expresión teórica de las isotermas de Langmuir. La teoría de la adsorción ha resultado útil para interpretar el comportamiento de los metales en la branquia de los peces (Pagenkopf, 1983; Playle 1998).

b) *Difusión simple*, se define como el movimiento neto de un compuesto en favor del gradiente electroquímico y se describe formalmente por la Ley de Fick. Cuando la difusión es a través de una membrana el proceso se conoce con el nombre de *diálisis*. La *diálisis* de una sustancia a través de las membranas biológicas (de permeabilidad selectiva) dependerá de su polaridad o lipofilidad, peso molecular, tamaño y carga. En particular, la incorporación de metales disueltos a nivel de la branquia de los peces ha sido explicada en parte como un fenómeno de difusión facilitada utilizando canales proteicos o proteínas transportadoras (Verbost *et al.*, 1989; Hollis *et al.*, 1997; Playle, 1998; Wood *et al.*, 1999), este transporte se caracteriza por presentar una cinética de saturación.

c) *Transporte activo*, es el movimiento de una sustancia a través de una membrana en contra del gradiente electroquímico, ayudada por una molécula transportadora que consume energía durante el proceso. En este tipo de transporte están involucrados canales proteicos o proteínas transportadoras que transfieren sustancias a través de la membrana plasmática a expensas de la hidrólisis de ATP. Se ha demostrado que iones de metales "pesados" como el Ag^+ , Cu^{+2} , Cd^{+2} , con una estructura similar a iones intrínsecos del metabolismo celular como el Na^+ , K^+ , y Ca^{+2} , son capaces de interferir con los canales proteicos que normalmente bombean estos iones para mantener la homeostasis en el organismo (Beckman y Zaugg 1988; Verbost *et al.* 1989; Newman, 1995).

d) *Endocitosis*, este proceso consiste en invaginaciones de la membrana plasmática que engloban material sólido (fagocitosis) o líquido (pinocitosis) del medio, siendo transportados hacia el interior de la célula a expensas del consumo de ATP. Este transporte ha sido descrito como un mecanismo de incorporación de metales análogos al Fe mediado por la transferrina (Simkiss, 1996), sin embargo no parece haber estudios sobre su relevancia como mecanismo de incorporación del metal en la branquia de los peces.

Los procesos antes descritos, en general ocurren simultáneamente, así por ejemplo metales como la Ag^+ , el Cu^{++} o el Cd^{++} son adsorbidos rápidamente sobre la branquia de los peces, luego son incorporados a las células epiteliales por difusión a través de las membranas apicales y finalmente interaccionan con los canales proteicos ubicados en las membranas basolaterales (Smikiss y Taylor, 1989; Simkiss, 1996, Wood *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 1997).

ii) *El proceso de biotransformación*, puede definirse como la transformación enzimática del tóxico en otro compuesto que puede conducir a su mejor eliminación, detoxificación, secuestro, redistribución o activación (Newman y Unger, 2003). Al ser enzimático, este proceso está sujeto a una cinética de saturación e inhibición competitiva. El término fue originalmente acuñado a la transformación metabólica de los contaminantes orgánicos ya que en el caso particular de los metales, al ser indestructibles, no sería posible su degradación metabólica (Olsson, 1998). Sin embargo, empleando su significado en sentido amplio, algunos autores consideran que los metales también son susceptibles de algún tipo de "biotransformación" ya que pueden ser modificados biológicamente en su estado de oxidación, unidos a grupos metilos o etilos, ligados a compuestos orgánicos (como proteínas y azúcares) para reducir su toxicidad y favorecer su eliminación, o ser biomineralizados e incorporados en estructuras esqueléticas (Newman y Unger, 2003).

iii) *El proceso de eliminación*, es el resultado de la excreción y biotransformación del tóxico que se traduce finalmente en una reducción de los niveles del mismo en el organismo (Newman y Unger, 2003). En el caso de los metales la única forma en que éstos pueden ser eliminados del organismo es por medio de su excreción. Las principales rutas de excreción en peces son las branquias, el hígado (bilis), el intestino,

el riñón y la piel (mucus) (Olsson, 1998). De acuerdo a la escasa información hallada, queda claro que las rutas y mecanismos de excreción de los metales en peces son procesos que han sido mucho menos estudiados, que el de su incorporación. Por ejemplo para el Cd, se observa que durante el período de recuperación los tejidos con mayor porcentaje del metal son el riñón y el hígado indicando que probablemente éstas sean las vías de eliminación del mismo (Norey *et al.*, 1990; Handy, 1992a y b).

V.a.4. Interpretación matemática del proceso de bioconcentración - Modelización

Desde el punto de vista matemático, en su visión más simple, el proceso de bioacumulación puede modelarse como un sistema de una caja, donde los coeficientes se asumen constantes en el tiempo (Newman y Unger, 2003). En este modelo tanto la incorporación (desde una única fuente) como la eliminación (desde un único compartimiento, ej. organismo completo) del tóxico responden a ecuaciones primer orden cuya resultante es la función de bioacumulación dada por la ecuación $dC_t/dt = k_a \times C_a - k_e \times C_t$; donde: dC_t = diferencial de la concentración en el tejido, dt = diferencial de tiempo, C_a = concentración en el agua, k_a = constante de incorporación, C_t = concentración en el tejido y k_e = tasa de eliminación. En la ecuación puede verse que la velocidad de incorporación del tóxico depende de la concentración del mismo en el agua mientras que la velocidad de eliminación depende de la concentración del tóxico en el tejido. Al integrar la ecuación se obtiene $C_t = C_a (k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t})$, donde el término (k_a/k_e) define la concentración en el estado estacionario y representa la estimación del factor de bioconcentración (FBC). k_e puede relacionarse con $t_{1/2}$ (tiempo en el cuál el tejido alcanza la mitad de la concentración máxima o de saturación) por medio de la ecuación $k_e = \ln 2 / t_{1/2}$.

V.a.5. Antecedentes sobre la bioconcentración del Cd

Existe una extensa lista bibliográfica sobre el estudio del efecto del cadmio en peces. En particular, respecto a la bioconcentración del metal en el organismo, pueden mencionarse estudios realizados en una especie afín al pejerrey (*Menidia beryllina*) donde se ha evaluado la dependencia de este proceso en con la salinidad del agua (Jackson *et al.*, 2003). Otros estudios, pero en la carpa común (*Cyprinus carpio*), evaluaron la bioacumulación del metal durante exposiciones crónicas (de Conto Cinier, 1997) y como era afectada por sustancias húmicas presentes en el agua (Van

Ginneken *et al.* 2001). También pueden citarse el estudio sobre los perfiles de acumulación del metal en *Oreochromis aureus* (Allen, 1995) o la comparación de los perfiles de acumulación y excreción entre *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus*, *Noemacheilus barbatulus* y *Esox lucicus* (Norey *et al.*, 1990). También puede mencionarse una interesante publicación sobre el efecto de los pulsos de exposición en la acumulación y eliminación del metal en los diferentes tejidos de *Oncorhynchus mykiss* (Handy, 1992a). Hay dos trabajos realizados por Mc Geer *et al.* (2000a y b), en los que se vincula el patrón de bioconcentración del Cd en la branquia, hígado y riñón de *O. mykiss* bajo exposiciones subletales crónicas al metal con respuestas fisiológicas tales como la regulación iónica y el costo metabólico. Estos estudios representan un importante punto de partida en la vinculación de los niveles del tóxico en los tejidos con respuestas metabólicas.

Numerosos trabajos han sido orientados al estudio del mecanismo de incorporación del Cd a través de la branquia. En tal sentido, se han evaluado sustancias que reducen (pez cebra *Brachydanio rerio*, Ca^{+2} , Verapamil, La; Wicklund Glynn *et al.*, 1994) o que estimulan (*Salmo gairdneri*, ditiocarbamato, etilxantato, isopropil xantato; Block y Pärt 1986) la incorporación de Cd al organismo. Especialmente interesante es la serie de trabajos realizados en *O. mykiss* con el objeto de desarrollar un modelo de ligando biótico que prediga la interacción del metal a nivel de la branquia. Este método está basado en la obtención de la constante de equilibrio condicional de estabilidad para la fuerza de unión entre el metal y la branquia, que se calcula a partir de técnicas de equilibrio competitivo de ligandos, y que luego permiten calcular el número de sitios de unión para el metal en el tejido utilizando las Isotermas de Langmuir. Estos datos son volcados finalmente a programas desarrollados para el estudio de la química y geoquímica del agua (ej MINEQL⁺; Allison *et al.*, 1991; MINTEQA2; Schecher y Mc Avoy, 1992) y que permiten estudiar la especiación de los metales en función de diferentes variables fisicoquímicas del agua (pH, Ca^{++} , MO) y predecir su distribución en los diferentes compartimientos de los sistemas acuáticos, siendo particularmente estudiado en estos casos el compartimiento biológico, la branquia (Playle, 1998).

Una vez ingresado al organismo el metal es transportado por vía sanguínea y acumulado principalmente en el riñón y el hígado, tal capacidad de acumulación en estos tejidos puede ser adjudicada a su capacidad para sintetizar metalotioneínas, una proteína de bajo peso molecular que posee gran afinidad por el Cd y que se cree es el

mecanismo natural que posee la célula para la detoxificación del metal (Klaassen *et al.*, 1999). Su acumulación y síntesis de novo se ha probado en el hígado y riñón de truchas expuestas a este metal (Olsoson, 1989). El mecanismo de excreción es mucho menos claro y aunque en peces la orina y la bilis deberían ser la vía de eliminación, la mayoría de los trabajos coinciden en que este es un proceso muy lento (Calamari *et al.*, 1982; Norey *et al.*, 1990; Wicklund Glynn 1991), a tal punto que McGeer *et al.* (2000b) consideran que este sería un proceso más bien de tipo pasivo, que conduce a la acumulación del metal, que un mecanismo de regulación fisiológica y de eliminación activa. Otras vías de excreción a considerarse sería la eliminación de mucus corporal (Varanasi y Markey 1978; Sorensen, 1991) y algunos autores opinan que la branquia también podría estar vinculada a este proceso (McGeer *et al.*, 2000b).

V.a.6. Antecedentes sobre la bioconcentración del Cr

A diferencia del Cd, la bioacumulación del Cr y los mecanismos a través de los cuales este metal es incorporado en los peces han sido mucho menos estudiados. Respecto a la bioconcentración, distribución y eliminación del Cr se ha observado, en individuos de *O. mykiss* expuestos a concentraciones que fueron de 2 a 50 mg Cr/L durante 2 y 4 días y luego seguido por un período sin exposición, que la acumulación ocurre principalmente en la branquia, el hígado, el riñón y el tracto digestivo, y que durante la fase de recuperación se produce una eliminación rápida del metal de la sangre, la branquia y el tracto digestivo, pero que los niveles permanecen altos en el hígado y el riñón (Van Der Putte *et al.*, 1981). Otro estudio realizado con *Carassius auratus* también se encuentra un incremento de los niveles de Cr en la branquia, sin embargo estos no guardan una clara relación con la dosis (Riva *et al.*, 1981).

La mayoría de los modelos farmacocinéticas de bioconcentración de cromo han sido realizados a partir de estudios en humanos o roedores de laboratorio, estos últimos sometidos a exposiciones por vía digestiva, (principalmente por la incorporación de diferentes formas de Cr en el agua de bebida), inhalatoria o intravenosa (Visek *et al.*, 1953; MacKenzie *et al.*, 1958; MacKenzie *et al.*, 1959; Mertz *et al.*, 1965; Hopkins, 1965; Langård *et al.*, 1978; Bragt y Van Dura, 1983; Weber, 1983; Edel y Sabbione, 1985; Thomann *et al.*, 1994; Kerger *et al.*, 1996; O'Flaherty, 1996). En líneas generales todos ellos coinciden en que el Cr(VI) es incorporado más rápidamente que el Cr(III) y que el primero es rápidamente reducido a Cr(III). El Cr(VI) pasa rápidamente a la

sangre y, de una forma similar a lo observado en los peces (Van Der Putte *et al.*, 1981), es acumulado preferentemente en el riñón, el hígado y los huesos (MacKenzie *et al.*, 1958; Thomann *et al.*, 1994) de los individuos expuestos. La excreción del Cr en el hombre y los roedores es rápida y sería vehiculizada tanto por la orina como por las heces (Kerger *et al.*, 1996; O'Flaherty, 1996), siendo la sangre el primer compartimento en depurarse, luego el hígado y riñón y finalmente los huesos (Thomann *et al.*, 1994).

No se han hallado publicaciones sobre los mecanismos de incorporación del Cr específicamente descrito para los peces. El primer modelo que explicó como el Cr(VI) es incorporado y reducido en una célula fue realizado en microsomas hepáticos (Wetterhahn, 1979). Luego se comprobó en eritrocitos humanos que el Cr(VI) ingresaba por la vía de los canales del anión sulfato y fosfato (Wiegand *et al.*, 1985; Ottenwaelder y Wiegand, 1988; De Flora y Wetterhahn, 1989). Una vez ingresado y reducido, la acumulación del Cr(III) en el riñón y el hígado podría ser explicada por su unión con proteínas (LMWCr) de bajo peso molecular (1,5KDa) similares en su composición a las metalotioneínas, ricas en glutamato, glicina, cisteína y aspartato (Stearns, 2000). No se describen los mecanismos moleculares para su excreción pero de acuerdo a lo anterior debiera producirse a nivel de los hepatocitos junto a la secreción biliar en el hígado y a nivel de la filtración glomerular en los glomérulos del riñón.

V.a.7. Niveles de bioconcentración de metales en los tejidos y su relación con efectos biológicos adversos.

La acumulación de un metal en tejidos específicos ha sido propuesta como un indicador clave de exposición crónica (Bergman y Dorward-King 1997) y la comprensión de la toxicocinética de dicha acumulación durante exposiciones subletales crónicas es un elemento crítico para el establecimiento de vínculos entre toxicidad y exposición en evaluaciones de riesgo (McCarty and MacKay, 1993). Además, recientemente se ha recomendado la elaboración de modelos de predicción de toxicidad crónica basados en los niveles residuales del metal en tejidos específicos luego de exposiciones prolongadas (Bergman y Dorward-King 1997). Sin embargo algunos autores han advertido que para ciertos metales esenciales la acumulación en tejidos específicos puede no ser un buen indicador de exposición crónica o de impacto fisiológico a largo plazo (McGeer *et al.*, 2000b). Los mismos autores consideran a la los niveles de Cd en tejidos específicos, por ser un metal no esencial, como un buen indicador de exposición

crónica. El Cr, por ser discutida su esencialidad en el metabolismo normal (Stearns, 2000; review), podría también cumplir con la condición de indicador.

Un punto importante a considerar entre la relación bioconcentración-efecto a niveles subletales es el concepto de aclimatación al metal. De acuerdo al modelo de "daño-reparación" (McDonald y Wood 1993), el metal causa un "shock" inicial, producido por el daño físico inducido a nivel de la branquia y que es responsable de causar la perturbación de la homeostasis fisiológica interna. Este efecto agudo es observado sólo por unos pocos días. Luego le sigue una fase de recuperación, donde se incrementarían los procesos biosintéticos (mitosis, aumento de la síntesis proteica) que reparan el daño y corrigen los disturbios fisiológicos, como por ejemplo a través de la movilización de metalotioneinas (Bradley *et al.*, 1985; Hogstrand y Wood, 1996) o de un aumento de la expresión de genes dirigidos a enmendar la ionoregulación (Laurén y McDonald, 1987a,b; Hogstrand *et al.*, 1995; Pelgrom *et al.*, 1995). Finalmente la fisiología del animal retorna a la condición previa a la exposición o a un nuevo punto de equilibrio que termina por incrementar la tolerancia al metal. Un ejemplo interesante que grafica la relación entre exposición-respuesta-aclimatación es el caso de la exposición crónica de *O. mykiss* al Cd, donde la hipocalcemia producida por el metal al comienzo de la exposición es revertida luego de los 20-30d, coincidentemente la acumulación del metal en la branquia alcanza su punto de saturación (fase de recuperación) aproximadamente en el mismo período mostrando así el nuevo estado de equilibrio alcanzado (Mc Geer *et al.*, 2000a y b).

V.b Objetivos particulares

El presente capítulo tiene por objeto:

- Evidenciar la presencia de Cd y el Cr en la branquia y el hígado de individuos de *O. bonariensis* expuestos a concentraciones subletales de estos metales, para la posterior interpretación de las respuestas biológicas aquí estudiadas.
- Evaluar los niveles de concentración de Cd y Cr en la branquia y el hígado en relación con los del agua dentro de los tiempos de exposición ensayados.

- Describir el proceso de acumulación del Cd y Cr en los mencionados tejidos utilizando modelos sencillos (Wicklund Glynn, 1991; Newman y Unger, 2003) que permitan estimar parámetros útiles para una mejor comprensión de los procesos fisiológicos involucrados en la acumulación de los metales durante exposiciones subletales.

Los contenidos del presente capítulo se estructuran partiendo de la descripción de la metodología utilizada para la determinación de las concentraciones de Cd y Cr en el agua de ensayo, la branquia y el hígado de los pejerreyes, seguido por los resultados hallados de la concentración medida de cada uno de los metales estudiados, culminando con las conclusiones particulares elaboradas en relación a la bioconcentración en función de los niveles de exposición a los metales y tiempos ensayados.

V.c Materiales y métodos

V.c.1. Determinación de la concentración de Cd y Cr en el agua

En los ensayos estáticos con renovación de agua la concentración del tóxico evaluado puede variar entre cada recambio. Con el objeto de conocer con exactitud los niveles de concentración a los cuales habían estado expuestos los organismos durante las experiencias, se recolectaron muestras de agua al inicio y al final de cada recambio, para la determinación de la concentración de los metales ensayados. Los métodos utilizados (ASTM, 1994; APHA-AWWA-WEF, 1998) para la determinación de las concentraciones del Cd y el Cr en el agua de ensayo se describen en la siguiente sección.

V.c.1.1. Toma y preparación de las muestras

Durante el ensayo se extrajeron dos pares de muestras, uno correspondiente al primer recambio de agua (0 y 48h) y otro al último (336 y 384h). Para cada uno de los tratamientos ensayados, se muestrearon 500ml de agua de ensayo tomando partes iguales de cada una de las tres réplicas.

Todas las muestras fueron acidificadas con el agregado de 5 ml de ácido nítrico concentrado por litro de muestra al momento de su recolección. Las muestras para la determinación de Cr fueron digeridas calentando 100 ml de muestra acidificada a reflujos en baño de arena hasta la desaparición de vapores pardos. Luego fueron llevadas a volumen con agua deionizada. En particular, las muestras correspondientes a Cr 100 µg/L se concentraron diez veces por evaporación llevando a un volumen final de 10 ml. Las determinaciones de Cd se realizaron directamente a partir de las muestras aciduladas.

V.c.1.2. Determinaciones

Las muestras para la determinación de Cr total, fueron analizadas utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica con atomizador de llama de aire-acetileno (Varian), empleando una lámpara multicátodo (Varian) y de acuerdo a las recomendaciones del manual del equipo. Las determinaciones de Cd se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica electrotérmico provisto de un inyector automático de muestra (GBC Cientific Equipment PTY. LTD. Modelo: AA902 con un atomizador GF2000), empleando una lámpara multicátodo (Varian), utilizando argón como gas inerte y atendiendo a las condiciones de lectura recomendadas en el manual del fabricante, con algunas modificaciones menores (Tabla V.2.).

V.c.2. Determinación de la concentración de Cd y Cr en los tejidos

Los detalles sobre el diseño experimental y los organismos utilizados fueron descritos en el capítulo correspondiente a las bases experimentales, en consecuencia en ésta sección sólo se describirá la metodología utilizada para determinar los niveles de Cr y Cd en la branquia e hígado de *O. bonariensis* a los tiempos y niveles de exposición oportunamente especificados. De modo general se siguió el procedimiento descrito por Handy y Depledge (1999), con algunas modificaciones menores.

V.c.2.1. Obtención de los tejidos

Con el objeto de determinar las concentraciones de los mencionados metales en los tejidos estudiados, se sacrificaron seis peces por tratamiento a cada tiempo de exposición. De cada pez se disectó la branquia y el hígado completos, cada tejido se enjuagó con abundante agua deionizada y se colocó sobre un portaobjetos

previamente pesado y limpio. En cada portaobjetos se agrupó el tejido proveniente de dos individuos, obteniéndose así, para el análisis, tres muestras de cada tejido por tratamiento.

V.c.2.2. Secado

Los portaobjetos con las muestras se dejaron orear y luego se pesaron en una balanza analítica con una precisión de ± 1 mg. A continuación, se secaron en la estufa durante toda la noche a 105 °C, se enfriaron en desecador y se pesaron hasta verificar que llegaran a masa constante. Los tejidos se trasvasaron a un tubo de plástico (polipropileno) de 5ml y los portaobjetos fueron nuevamente pesados. Todos los pesados se realizaron utilizando siempre la misma balanza.

V.c.2.3. Digestión

La digestión de los tejidos se realizó agregando 5 volúmenes de ácido nítrico concentrado a cada tubo conteniendo aproximadamente 0.3 g de tejido, tapándolos con una esfera de vidrio y calentándolos a reflujo en baño de agua a una temperatura de 60 °C durante 4h. Los tubos, que habían sido previamente pesados, se llevaron a aproximadamente a 5ml con agua deionizada y se volvieron a pesar.

Tabla V.2. Condiciones de operación del espectrofotómetro de absorción electrotérmica con horno de grafito, utilizadas para la determinación de Cd y Cr.

| Etapa | Cd | | | Cr | | |
|-------|------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| | Temperatura final (°C) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo sostenido (s) | Temperatura final (°C) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo sostenido (s) |
| 1 | 85 | 5 | 0 | 85 | 5 | 0 |
| 2 | 95 | 40 | 0 | 95 | 40 | 0 |
| 3 | 120 | 20 | 0 | 120 | 20 | 0 |
| 4 | 300 | 5 | 1 | 1000 | 5 | 1 |
| 5 | 300 | 0 | 2 | 1000 | 0 | 2 |
| 6* | 1800 | 1,2 | 2 | 2600 | 1,2 | 2 |
| 7 | 1800 | 0 | 2 | 2600 | 0 | 2 |

* Etapa de lectura, durante la misma el flujo de gas inerte se detuvo.

V.c.2.4. Determinaciones

La concentración de cada metal en las soluciones obtenidas de la digestión ácida de las muestras se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito e inyección automática de muestra (ver descripción anterior). La condiciones de lectura para Cr y Cd se obtuvieron siguiendo las recomendaciones del manual del fabricante, sólo introduciendo modificaciones menores en el tiempo de secado y la temperatura de llevado a cenizas (Tabla V.2.).

V.c.3. Reactivos, calibración, controles de calidad, cálculos y métodos estadísticos

En todos los casos, el material fue lavado previamente con detergente y enjuagado, luego tratado con ácido nítrico al 10% y finalmente enjuagado con agua deionizada. Para las digestiones, se utilizó ácido nítrico concentrado JT Baker calidad ultrapuro. El agua deionizada utilizada se correspondió con las características de un agua Tipo I (ASTM, 1994).

Las curvas de calibración se construyeron utilizando patrones comerciales (1000 mg/L, JT Baker). Los porcentajes de recuperación del método para el análisis de las concentraciones de Cd y Cr en el agua de ensayo y para las determinaciones de Cr en la branquia e hígado, se obtuvieron sobreagregando cantidades conocidas de cada metal (dos concentraciones) a las muestras provenientes de los controles. Para las determinaciones de Cd en los tejidos se utilizó una muestra certificada de hígado bovino (NIST 1577b, US Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899) como material de referencia. La concentración promedio de Cd determinada en la muestra de referencia fue de $0,475 \pm 0.015$ (3) μg Cd/g peso seco, que representó el 95,1% respecto al valor certificado (0,5 μg Cd/g peso seco).

El peso húmedo se calculó como la diferencia entre el peso del portaobjetos con el tejido húmedo menos el peso inicial del portaobjetos. El peso seco se obtuvo de la diferencia entre el peso del portaobjetos con la muestra seca menos el peso final del portaobjetos "sucio". El porcentaje de humedad se calculó como 1 menos el cociente entre el peso seco y húmedo multiplicado todo por 100

El volumen de dilución se obtuvo gravimétricamente por diferencia de pesada entre el peso del tubo llevado a volumen y el tubo vacío (P), utilizando la fórmula $V_d = P/\delta$, donde V_d : volumen de dilución, P: diferencia de pesada y δ : densidad del agua a la temperatura ambiente.

El límite de detección del método se calculó como 3,14 veces el desvío estándar de la concentración más baja que produce señal respecto al blanco y cuyo valor no fuese mayor a 5 veces el límite de detección del instrumento (APHA-AWWA-WEF, 1998). Los valores obtenidos fueron de 0,81 $\mu\text{g/L}$ para el Cr y de 0,17 $\mu\text{g/L}$ para el Cd en las muestras de agua. Para el Cr en la branquia y el hígado los límites de detección fueron de 0,75 y 0,40 $\mu\text{g/g}$ y para el Cd de 0,81 y 0,16 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

La concentración final en el agua se calculó como:

$$C_a = (C_e \times V_d / 1000) \times F_c \quad (1)$$

donde:

C_a = concentración en el agua [$\mu\text{g/L}$]

C_e = concentración medida en el espectrofotómetro [$\mu\text{g/L}$]

V_d = volumen de dilución [ml]

F_c = factor de concentración.

La concentración final en el tejido se expresó en μg metal/g peso húmedo del tejido (salvo que se especifique lo contrario) y se calculó como sigue:

$$C_t = (C_e \times V_d) / (P_t \times 1000) \quad (2)$$

donde:

C_t = concentración en el tejido [$\mu\text{g/g}$]

C_e = concentración medida en el espectrofotómetro [$\mu\text{g/L}$]

V_d = volumen de dilución [ml]

P_t = peso húmedo [g].

La tasa de acumulación de Cd en ambos tejidos fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$TA = ([Cd]_{ci} - [Cd]_{bl})/t \quad (3)$$

donde:

TA = tasa de acumulación de Cd en el tejido [$\mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{h}$]

[Cd]_{ci} = concentración de Cd en la branquia de los individuos expuestos a la concentración iésima [$\mu\text{g}/\text{Kg}$]

[Cd]_{bl} = concentración en la branquia de los individuos control [$\mu\text{g}/\text{Kg}$]

t = tiempo de exposición [h].

Los valores de tasa de acumulación en función de la concentración de Cd en el agua, se ajustaron luego a un modelo de reacción reversible de segundo orden para transporte facilitado (Weiss, 1996) explicado por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$TA_{[Cd]} = (V_{\max} \times [Cd]_A)/(K_M + [Cd]_A) \quad (4)$$

donde:

TA[Cd] = tasa de acumulación de Cd en el tejido

V_{max} = tasa máxima de acumulación en el tejido [$\mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{h}$]

K_M = concentración de Cd a la cual TA[Cd] = ½ de V_{max}

[Cd]_A = concentración de Cd en el agua.

La bioconcentración en función del tiempo se ajustó al modelo clásico de un compartimiento con tasas de acumulación y eliminación de primer orden (Newman y Unger, 2003), según la ecuación:

$$C_t = C_a \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{(-k_e t)}) + C_i \quad (5)$$

donde:

C_t = concentración de Cd en el tejido

C_a: concentración de Cd en el agua [$\mu\text{g}/\text{L}$]

k_a = cte de acumulación [$\text{L} \times (\text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1})$]

k_e = cte. de eliminación [h^{-1}]

k_e , puede expresarse en función del tiempo para alcanzar la mitad de la concentración de saturación ($t_{1/2}$) según la siguiente relación:

$$K_e = \ln 2 / t_{1/2} \quad (6)$$

donde:

t = tiempo (h)

C_i = nivel basal de Cd en el tejido.

En la expresión anterior $(k_a/k_e) \times 1000$ representa la bioconcentración (BC) del tejido respecto al agua y $C_a \times (k_a/k_e)$ estima la concentración en el tejido cuando este se ha saturado (C_s). El factor de acumulación (FA) se estimó como $(C_s / C_i) \times 100$.

Todos los ajustes a los datos experimentales y estimaciones de los parámetros de los diferentes modelos se realizaron utilizando el programa específico para el análisis de datos por regresión no lineal.

El efecto de los factores estudiados y el de su interacción fueron evaluados utilizando Análisis de la Varianza (ANOVA) Factorial seguido de la prueba de la Menor Diferencia Significativa de Fisher (LSD) para la comparación múltiple entre pares de tratamientos. En todos los casos el límite de significancia considerado fue $p < 0,05$. Los valores se expresan como la media \pm error estándar (n). Para la realización de los cálculos se utilizó un programa de cálculo estadístico.

V.d Bioconcentración del Cd(II)

V.d.1. Concentración de Cd en el agua de ensayo

Las concentraciones promedio de Cd medidas en el agua de ensayo y la variación de las mismas al inicio y final de los recambio de agua se muestran en la Figura V.1. Allí se observa que la concentración de Cd decae significativamente durante las 48h entre recambios para las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/L}$, presentando una reducción del 40 y 22% respectivamente. La concentración más baja ensayada (1 $\mu\text{g/L}$) si bien no presentó una diferencia estadísticamente significativa (debido a una mayor variabilidad en sus valores) mostró el mayor decaimiento desde el punto de vista del porcentaje con una reducción del 47% luego de las 40 h.

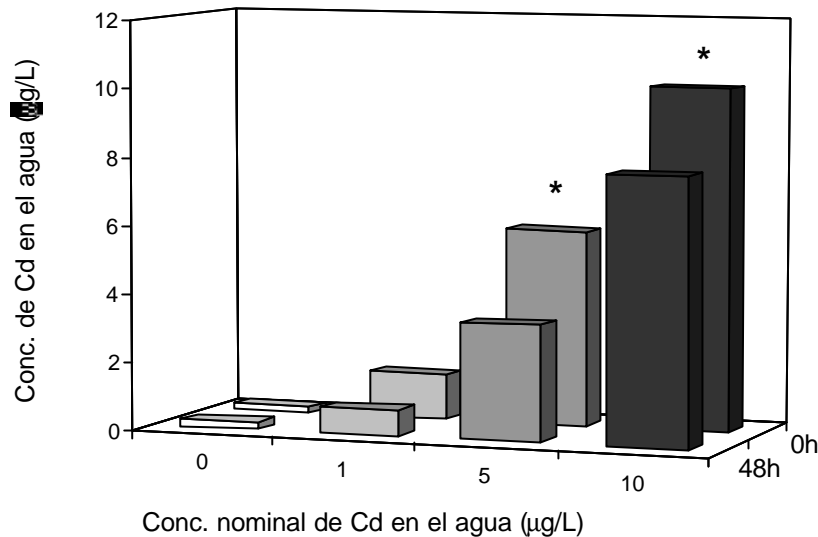


Figura V.1. Variación de la concentración de Cd en el agua de ensayo entre los períodos de recambio.

Los asteriscos indican diferencias significativas (Prueba t de Student, $p < 0,05$) entre las concentraciones del metal medida al inicio y final del período de recambio.

La reducción de los valores de concentración entre recambios de agua podría explicarse ya sea por una adsorción del Cd a las paredes del recipiente o a la incorporación del metal. El primer caso es poco probable ya que los recipientes se mantuvieron con las respectivas soluciones de Cd 24 h, previo al ensayo para permitir que las soluciones alcancen un equilibrio con las paredes del mismo. Por consiguiente, lo más probable es que tal reducción se deba principalmente a la incorporación del metal por los organismos.

V.d.2. Bioconcentración en la branquia

La Concentración de Cd en la branquia de *O. bonariensis* fue afectada significativamente por la concentración de Cd en el agua, por el tiempo de exposición y por la interacción entre ambos factores (ANOVA $p < 0,05$, $n = 48$), evidenciándose un incremento significativo respecto al control desde las 48h de exposición en los individuos expuestos a 5 y 10 µg Cd/L o a partir de la concentración más baja (1 µg Cd/L) en los individuos expuestos durante 384h (Figura V.2.). El valor basal de Cd en la branquia (controles) fue de $0,278 \pm 0,065$ (12) µg Cd/g, mientras que en el grupo que presentó mayores niveles de Cd (10 µg Cr/L y 384h) fue de $11,111 \pm 1,096$ (6) µg Cd/g,

esto es unas 40,0 veces más Cd por gramo de tejido en la branquia de los peses expuestos a la máxima concentración del metal.

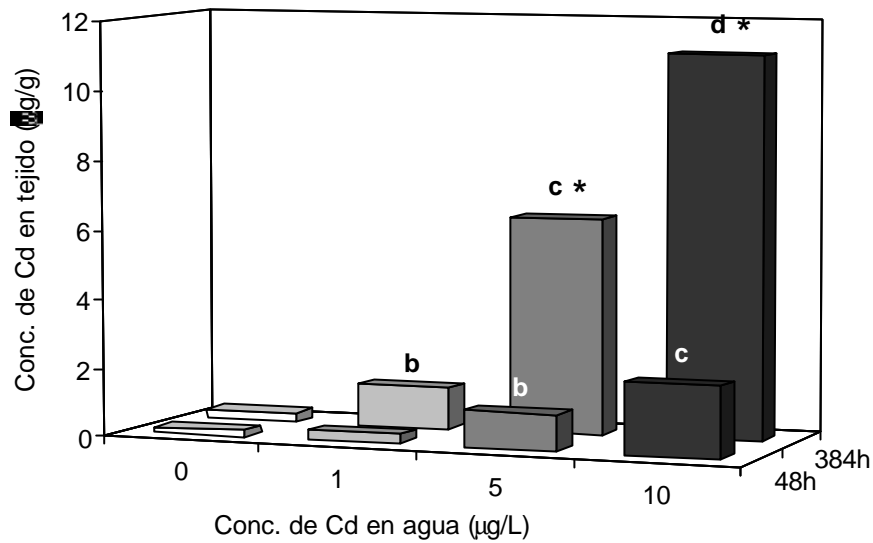


Figura V.2. Acumulación del Cd en la branquia de *O. bonariensis* en función de la concentración del metal en el agua.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre las concentraciones del metal en función del tiempo y letras diferentes implican diferencias significativas entre concentraciones (Prueba LSD, $p < 0,05$).

Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados en especies "sensibles" al Cd como *Oncorhynchus mykiss*, donde se ha evaluado el efecto de los niveles de Ca^{+2} sobre la bioconcentración del Cd en la branquia. Por ejemplo, los niveles de Cd publicados para organismos de 338 g, expuestos durante 18h a 16,8 µg/L de Cd en agua con una concentración de Ca de 1,6 y 41,6 mg/L, fueron de 9,5 y 4 µg Cd/g (peso húmedo) de branquia respectivamente (Richards y Playle, 1999). Otro trabajo realizado con la misma especie donde individuos de 138g fueron expuestos por períodos cortos (6h) pero a concentraciones relativamente altas (100 y 2300 µg Cd(II)/L) mencionan niveles entre 0,5 y 3,5 µg Cd/g (peso húmedo) de branquia (Handy, 1992a). Los niveles de Cd en la branquia de individuos de 30g pertenecientes una especie más tolerante como lo es *Ciprinus carpio*, expuestos durante 4 y 29 días a concentraciones de 90, 450 y 2250 µg Cd/L fueron también similares, oscilando entre 2,6 y 31,8 5 µg Cd/g (peso húmedo) de branquia (Smet y Blust, 2001) mientras que para individuos de *Oreochromis aureus* expuestos a 100 µg Cd/L los niveles de Cd en la branquia al cabo de 1 y 7 días fueron 0,67 y 1,18 µg Cd/g peso húmedo (Allen, 1995), sensiblemente menores a los observados para *O. bonariensis*.

La acumulación del Cd en la branquia en función de la concentración se ajustó a una función lineal para ambos tiempos de exposición ensayados ($[Cd]_{\text{branquia}48h} = 0,19 [Cd]_A + 0,15$, $R^2 = 0,96 + 0,59$; $R^2 = 0,97$ y $384h$: $[Cd]_{\text{branquia}384h} = 1,09 [Cd]_A + 0,36$, $R^2 = 0,97$). La tasa de acumulación (Tabla V.3.) en función de la concentración siguió una cinética del tipo de la de Michaelis-Menten ($R^2=0,95$) para la exposición a 384h mientras que a 48 si bien también se ajustó al modelo ($r^2 = 0,93$) los valores de los parámetros fueron extremadamente grandes, careciendo de sentido biológico. De acuerdo a los valores estimados de los parámetros del modelo (Tabla V.3.), para ambos tiempos de exposición, queda en evidencia que las concentraciones ensayadas se encontraron muy lejos de la capacidad de saturación del tejido (según lo explicaría una cinética de segundo orden en respuesta a un transporte facilitado del Cd por los canales de Ca), indicando que a las concentraciones ensayadas aún existe un exceso de sitios libres para la unión del Cd en la branquia de *O. bonariensis*.

Tabla V.3. Tasa de acumulación del Cd en la branquia de *O. bonariensis* y su relación con la concentración de Cd en el agua y el tiempo de exposición.

| T. exp (h) | Tasa de acumulación ($\mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{h}$) | | | Parámetros ecuación Michaelis-Menten | |
|------------|--|------------------|------------------|---|----------------------------------|
| | 1 | 5 | 10 | V_{max} ($\mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{h}$) | K_M ($\mu\text{g}/\text{L}$) |
| 48 | $1,71 \pm 1,00$ | $18,63 \pm 4,51$ | $42,89 \pm 1,49$ | $3,E+13 \pm 6,E+21$ | $7,E+12 \pm 1,E+21$ |
| 384 | $2,28 \pm 0,50$ | $15,45 \pm 0,94$ | $28,03 \pm 2,43$ | $209,08 \pm 0,69$ | $64,34 \pm 0,61$ |

Al analizar la bioconcentración del Cd en función del tiempo (Figura V.3.), observamos que la dosis mayor ($10 \mu\text{g Cd/L}$) se ajustó satisfactoriamente (ver Tabla V.4.) al modelo de bioacumulación utilizado (de incremento exponencial a un máximo), mostrando un aumento de la acumulación inicial rápido que luego se fue haciendo más lento con el tiempo a medida que se acercaba a la concentración de saturación. Por otra parte la acumulación en los organismos expuestos a la dosis intermedia ($5 \mu\text{g Cd/L}$), si bien se ajustó al modelo tradicional, correlacionó mejor con un modelo de regresión lineal debido a que la velocidad de acumulación fue sostenida durante todo el experimento.

En consecuencia, de acuerdo a la interpretación del modelo de bioconcentración (Newman y Unger, 2003), en los organismos expuestos a $10 \mu\text{g/L}$ ambos procesos, el de acumulación y eliminación, estarían siendo evidenciable, mientras que en los individuos expuestos a $5 \mu\text{g/L}$, habría un predominio del proceso acumulación sobre el de eliminación que pareciera ser despreciable. Por otro lado, de acuerdo a $t_{1/2}$ y a los observado en *O. mykiss* para condiciones similares de exposición (McGeer *et al.*,

2000a), ambas concentraciones parecieran estar actuando aún en la fase de daño según el modelo de aclimatación de McDonald y Wood (1993).

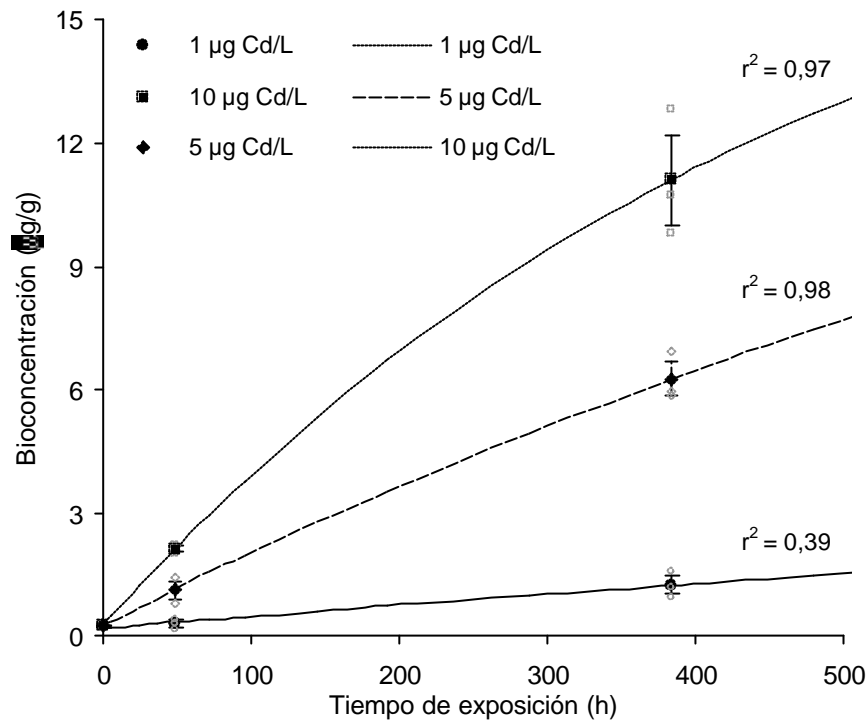


Figura V.3. Acumulación del Cd en la branquia de *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

Para cada concentración y tiempos ensayados, las figuras geométricas de la leyenda representan los valores promedio de concentración de Cd observados en la branquia y su correspondiente error estándar (barras), las líneas representan las curvas de bioconcentración ajustadas, con sus respectivos coeficientes de determinación (r^2).

Al analizar $t_{1/2}$ (ver Tabla V.4.), observamos que este parámetro guarda una estrecha relación con los niveles de Cd en el agua, necesitando casi el doble de tiempo para alcanzar la mitad de la concentración de saturación en el tejido cuando la concentración del agua es el doble (5 respecto a los de 10 µg Cd /L). Por otro lado los valores de $t_{1/2}$ en la branquia son relativamente cortos. Los niveles de bioconcentración (BC; Tabla V.3.) son independientes de la concentración de Cd en el agua pareciendo indicar un nivel de saturación natural para la branquia que a su vez estaría señalando la existencia de un mecanismo activo de regulación. Además, coincidentemente con lo observado por otros autores (McGeer *et al.*, 2000b), los elevados valores de BC ponen en evidencia la gran capacidad de la branquia para acumular grandes cantidades de Cd en tiempos cortos, reduciendo la cantidad de Cd disponible para ser transferido a la sangre, actuando así a modo de barrera para la entrada del metal en el organismo, que podría resultar un mecanismo eficaz defensa para el organismo durante exposiciones agudas.

Tabla V.4. Modelización de la bioconcentración del Cd en la branquia de *O. bonariensis*

| Conc. Nominal [µg Cd/L] | Modelo Ajustado | r^2 | Parámetros modelo | | | | | FA % | BC |
|-------------------------------|--|-------|--|-----------------------------|--------------------|------------------|------|---------|----|
| | | | k_a [L×(g ⁻¹ ×h ⁻¹)] | k_e [h ⁻¹] | C_i [µg Cd/L] | $t_{1/2}$ [d] | | | |
| 10 | $C_t = 10 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-(k_e \times t)}) + C_i$ | 0,97 | 0,00411 | 0,0021 | 0,234 | 13,9 | 8556 | 1981 | |
| 5 | $C_t = 5 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-(k_e \times t)}) + C_i$ | 0,99 | 0,00378 | 0,0010 | 0,223 | 29,9 | 8859 | 3906 | |
| 1 | $C_t = 5 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-(k_e \times t)}) + C_i$ | 0,39 | 0,00276 | 1,9E-04 | 0,1957 | 152,9 | 7579 | 14637 | |

r^2 : coeficiente de determinación, k_a : tasa de acumulación, k_e : tasa de eliminación, C_i : concentración inicial en el tejido, $t_{1/2}$: tiempo para alcanzar 1/2 de la concentración máxima (C_s), FA: factor de acumulación ($C_s/C_i \times 100$), BC: factor de bioconcentración ($k_a/k_e \times 1000$)

A diferencia de las concentraciones anteriores, la dosis menor (1 µg/L) mostró una respuesta completamente diferente, ajustándose, para los tiempos ensayados, a un modelo exponencial, lo cual indica un retardo en la acumulación esperada a las 48 respecto de las 384h (según lo predeciría el modelo de bioacumulación tradicional de un compartimiento). Tal retardo podría manifestar a la acción de algún tipo de mecanismo protector como por ejemplo la secreción mucosa (Varanasi y Markey 1978; Sorensen, 1991) que actuaría como un compartimiento extra, cuyo efecto fuere significativo a bajos niveles de exposición y que pudiera proteger al organismo durante exposiciones a corto plazo (ocasionales).

V.d.3. Bioconcentración en el hígado

Al igual que en la branquia, la acumulación de Cd en el hígado también fue afectada significativamente por: la concentración del metal en el agua, el tiempo de exposición y la interacción entre ambos factores (ANOVA $p < 0,05$, $n = 48$). Sin embargo, los valores absolutos fueron mucho menores y el efecto fue más retardado (Figura V.4). A las 48h, sólo los individuos expuestos a la máxima concentración (10 µg Cr/L) presentaron un incremento significativo, mientras que la menor concentración que produjo un aumento significativo al final del experimento (384h) fue 5 µg Cd/L. Los individuos expuestos a 1 µg Cd/g no presentaron diferencias respecto de los controles para ninguno de los tiempos de exposición ensayados. El valor basal de Cd en la branquia los pejerreyes control fue de $0,215 \pm 0,064$ (12) µg Cd/g, mientras que en el grupo con mayores niveles de Cd en el tejido (10 µg Cr/L y 384h) fue de $0,625 \pm 0,039$ (6) µg Cd/g, sólo unas 2,9 veces mayor.

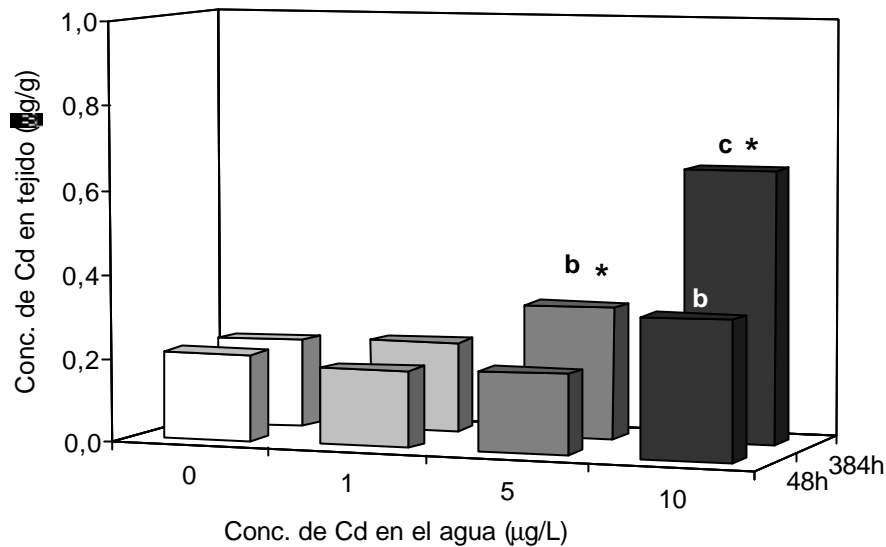


Figura V.4. Acumulación del Cd en el hígado de *O. bonariensis* en función de la concentración del metal en el agua.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre las concentraciones del metal en función del tiempo y letras diferentes implican diferencias significativas entre concentraciones (Prueba LSD, $p < 0,05$).

En comparación a otros trabajos podemos ver que los valores de bioconcentración de Cd en el hígado de *O. bonariensis* son similares a los hallados para individuos de *O. mykiss* de 338 g expuestos a 16,8 µg Cd/L durante 18h en agua de distinta dureza (0,219 – 0,019 µg Cd/g peso húmedo; Richards y Playle, 1999) o individuos de la misma especie pero de 138 g tras exposiciones agudas a 100 y 2300 µg Cd/L durante 6h (0,3 – 1 µg Cd/g; Handy, 1992a). Por otro lado al comparar los valores de acumulación en el hígado de individuos de *C. carpio* de 30g expuestos de 4 a 29 días a un intervalo de concentraciones de 90 a 2259 µg Cd/L, vemos que los valores en esta especie llegan a ser hasta 70 veces mayores (0,93 – 44,4 µg Cd/g peso húmedo; De Smet y Blust, 2001) a los observados para en el pejerrey. Un patrón similar presentan los individuos de *O. aureus* luego de 1 y 7 días de exposición a 100 µg Cd/L con niveles de Cd en el hígado de 0,92 y 12,77 µg/g peso húmedo (Allen, 1995), 20 veces mayor que en *O. bonariensis*.

Tabla V.5. Tasa de acumulación del Cd en el hígado de *O. bonariensis* y su relación con la concentración de Cd en el agua y el tiempo de exposición.

| T. exp (h) | Tasa de acumulación (µg/Kg*h) | | | Parámetros ecuación Michaelis-Menten | |
|------------|-------------------------------|--------------|-------------|--------------------------------------|-----------------|
| | 1 | 5 | 10 | V_{max} (µg/Kg*h) | K_M (µg/L) |
| 48 | -0,50 ± 1,01 | -0,33 ± 0,94 | 2,60 ± 1,03 | 5,E+14 ± 1,92 | 2,E+18 ± 2,E-05 |
| 384 | 0,03 ± 0,17 | 0,37 ± 0,09 | 1,08 ± 0,12 | 8,E+19 ± 2,E-09 | 7,E+20 ± 2,E-09 |

La acumulación del Cd en el hígado en función de la concentración del agua, como en la branquia, siguió un comportamiento lineal ($\text{Conc. Cd}_{\text{hígado}384\text{h}} = 0,042 \text{ Conc. Cd}_{\text{agua}} + 0,1842$, $R^2 = 0,9218$). La tasa de acumulación (Tabla V.5.) en el hígado para ambos tiempos de exposición (al igual que en la branquia para las 48h) no pudo ser explicada por el modelo de Michaelis Menten debido a la carencia de sentido biológico de los valores extremadamente altos predichos para V_{max} y K_M , sugiriendo entonces el mismo comportamiento que en la branquia, lejos de los niveles de saturación.

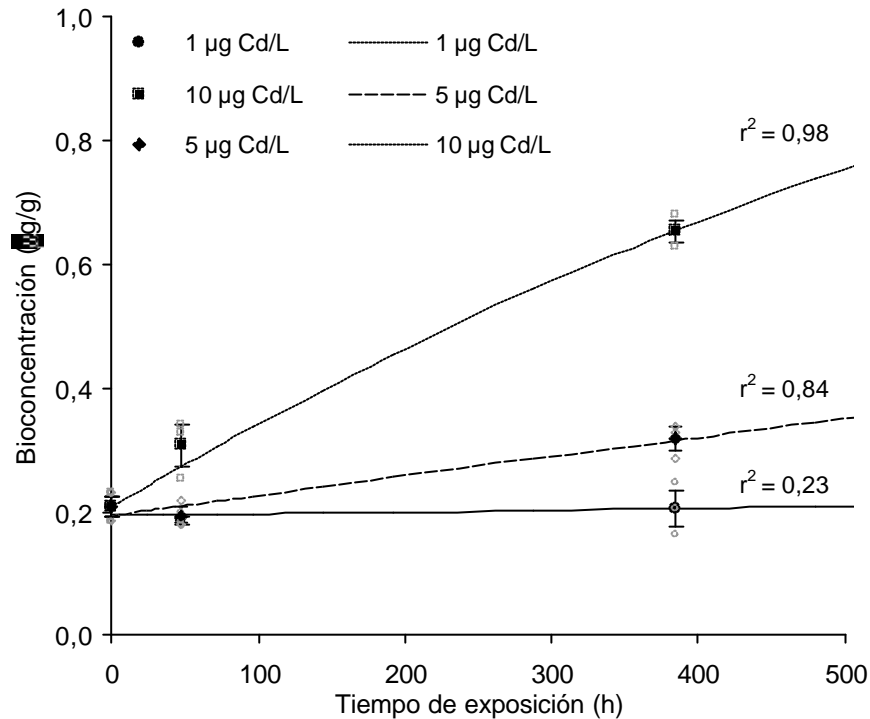


Figura V.5. Acumulación del Cd en el hígado de *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

Para cada concentración y tiempos ensayados, las figuras geométricas de la leyenda representan los valores promedio de concentración de Cd observados en el hígado y su correspondiente error estándar (barras), las líneas representan las curvas de bioconcentración ajustadas, con sus respectivos coeficientes de determinación (r^2).

La bioconcentración del Cd en el hígado en función del tiempo (Figura V.5.) se comportó también de un modo similar a lo observado para la branquia, la máxima concentración responde al modelo típico, mostrando la acción conjunta de los procesos de acumulación y eliminación (parámetros estimados: $k_a = 0,0039$ y $K_e = 0,0018$ a = 0,3278) con una reducción paulatina de la velocidad de acumulación a medida que alcanza la concentración de saturación. La concentración media, se ajusta a la fase lineal del modelo y está dominada por el fenómeno de acumulación. La concentración más baja no difirió de los controles a ninguno de los tiempos ensayados.

A diferencia de lo observado en la branquia, los valores estimados de $t_{1/2}$, FA y BC (Tabla V.6.) muestran una variación importante con los niveles de Cd en el agua. Para los individuos expuestos a la mayor concentración el modelo predijo un $t_{1/2}$ muy corto y valores de FA y BC muy bajos, en relación a la branquia y a lo observado para *O. mykiss* expuesta a 3 $\mu\text{g Cd/L}$ (McGeer *et al.*, 2000b). Para los individuos expuestos a 5 $\mu\text{g Cd/L}$, el modelo predice valores similares de FA y BC con un $t_{1/2}$ mucho más prolongado que los observados para la branquia, aunque mayores en valor absoluto en la misma dirección que lo observado por McGeer *et al.* (2000b). La discrepancia en el modelo para los individuos expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$ podría deberse a la variabilidad intrínseca del experimento, la diferencia de valores de FA en la branquia observada por McGeer *et al.* (2000b) entre dos experimentos gemelos fue del 421 %, o a que luego de determinado umbral de concentración se gatille un mecanismo de regulación que limite la acumulación neta en el tejido. De acuerdo a la reducida tasa de excreción en el hígado observada por otros autores (Haux y Larsson, 1984; Norey *et al.*, 1990) la última hipótesis sería menos factible, además los valores de BC estimados para el hígado de los individuos expuestos a 5 $\mu\text{g Cd/L}$ es coincidente con los estimados para la branquia, por lo cual si bien estos son un poco más altos que los publicados por McGeer *et al.* (2000b), sustentarían el mismo mecanismo de acción y concordarían con la baja tasa de excreción ya mencionada y la falta de un mecanismo activo de excreción propuesta por estos últimos autores.

Tabla V.6. Modelización de la bioconcentración del Cd en el hígado de *O. bonariensis*

| Conc. Nominal [$\mu\text{g Cd/L}$] | Modelo Ajustado | r^2 | Parámetros modelo | | | | | |
|--|--|-------|---|------------------------------|---------------------------------|------------------|---------|-------|
| | | | k_a [$\text{L} \times (\text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1})$] | k_e [h^{-1}] | C_i [$\mu\text{g Cd/L}$] | $t_{1/2}$ [d] | FA % | BC |
| 10 | $C_t = 10 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{(-k_e \times t)}) + C_i$ | 0,99 | 0,000143 | 0,0011 | 0,208 | 25,8 | 713 | 127,7 |
| 5 | $C_t = 5 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{(-k_e \times t)}) + C_i$ | 0,87 | 6,66E-05 | 0,0003 | 0,195 | 112,1 | 763 | 258,4 |
| 1 | no se observó diferencia significativa respecto al control a ningún tiempo de exposición | | | | | | | |

r^2 : coeficiente de determinación, k_a : tasa de acumulación, k_e : tasa de eliminación, C_i : concentración inicial en el tejido, $t_{1/2}$: tiempo para alcanzar 1/2 de la concentración máxima (C_s), FA: factor de acumulación ($C_s/C_i \times 100$), BC: factor de bioconcentración ($k_a/k_e \times 1000$)

Durante la experiencia, los pejerreyes expuestos a 1 $\mu\text{g Cd/L}$ no mostraron una acumulación significativa de Cd en el hígado. Este hecho pareciera apoyar la idea propuesta sobre el papel de la branquia como barrera a la entrada del metal. En tal sentido los valores mínimos de Cd en la branquia que produjeron un aumento

significativo de la concentración del metal en el hígado fueron 6,28 y 2,11 a las 48 y 384h de exposición, probablemente alrededor de estos valores se encuentre el nivel en el cual la capacidad de retención de la branquia empiece a verse saturada.

V.d.4. Relación entre los niveles de Cd en la branquia y el hígado

Los niveles de Cd hallados en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* expuesto a 1, 5 y 10 µg/L durante 48 y 384h son en promedio comparables a los valores observados en individuos de *Menidia beryllina* (su especie equivalente en el hemisferio norte) de siete meses de vida expuestos a 35 µg/L de CdCl₂·2,5H₂O durante 29 días, en agua dulce (Jackson *et al.*, 2003; efecto de la salinidad sobre la bioconcentración del Cd).

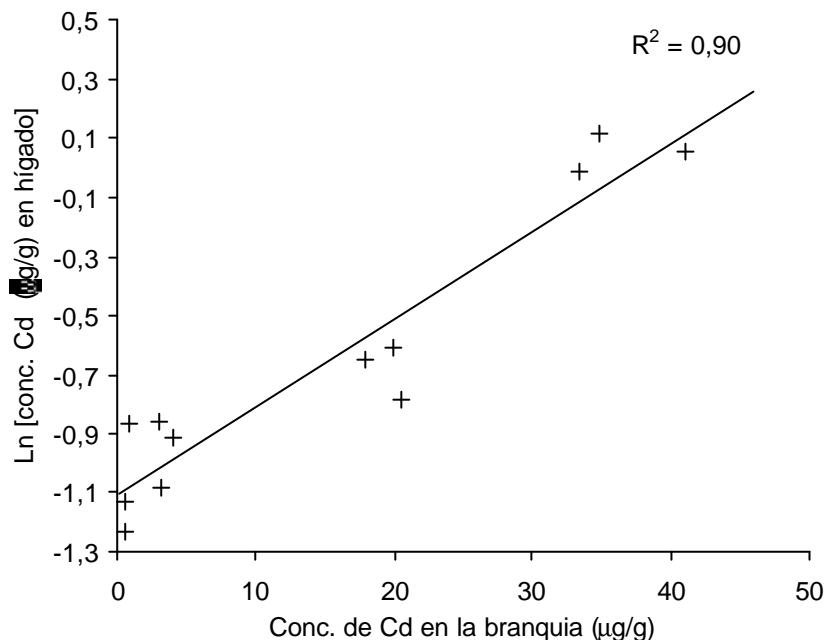


Figura V.6. Relación entre los niveles de Cd en el hígado y la branquia de *O. bonariensis* expuestos durante 384 h a 10 mg Cd/L

La relación entre los valores de Cd en la branquia y el hígado otorga una confirmación adicional de la llegada del metal a los tejidos estudiados (Figura V.6.). Esta dependencia también es útil para establecer los posibles mecanismos de de acumulación (de Conto Cinier *et al.*, 1997) así como el tiempo y tipo de exposición al que han sido sometido los organismos (Haux y Larson, 1984). En el presente trabajo, a las 384h de exposición, observamos una correlación lineal entre la concentración de Cd en la branquia y el logaritmo natural de los niveles de Cd en el hígado ($r^2 = 0,94$ $p < 0,05$). Esto confirmaría la relación dosis respuesta de los niveles de Cd en los tejidos

y deja ver además que la velocidad de acumulación en la branquia fue mayor que la velocidad de acumulación en el hígado. Nuevamente pareciera que la branquia estuviese actuando como barrera para la entrada del Cd o que el metal esté siendo retenido o eliminado directamente desde la sangre por alguna otra vía como por ejemplo el riñón (de Conto Cinier *et al.*, 1997).

Tabla V.7. Relación entre la concentración de Cd en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* en función de las concentraciones del metal en el agua y tiempos de exposición ensayados.

| Conc. Cd (µg/L) | 48 h | | 384 h | |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | Med | Error Std | Med | Error Std |
| 0 | 1,22 ± 0,45 ^a | | 1,65 ± 0,03 ^a | |
| 1 | 1,59 ± 0,42 ^b | | 5,76 ± 1,05 ^{a *} | |
| 5 | 5,60 ± 0,58 ^c | | 17,89 ± 1,59 ^{b *} | |
| 10 | 6,52 ± 0,78 ^c | | 17,77 ± 1,09 ^{b *} | |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de exposición a Cd, los asteriscos indican diferencias significativas entre tiempos de exposición diferentes (LSD, p<0,05)

Al analizar la relación entre la bioconcentración de Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* (Tabla V.7.), vemos que los niveles relativos de Cd se incrementan significativamente en la branquia respecto del hígado tanto en función de las concentraciones de Cd en el agua como del tiempo de exposición y de la interacción entre ambos factores (ANOVA $p < 0,05$; $n = 24$). En el pejerrey, la branquia pareciera ser el órgano blanco por excelencia de este metal.

El estudio de la relación entre los niveles de Cd en la branquia y el hígado han sido útiles como indicadores para detectar de manera relativa en que fase de exposición se encuentran los organismos. Por ejemplo en experiencias donde se sometió a truchas a pulsos en los niveles de Cd en el agua, se observó que la relación entre los niveles de Cd en el hígado y en la branquia de los controles fue aproximadamente igual a 1, que en la fase correspondiente al pulso de exposición la branquia triplica los valores de concentración en el hígado y que en el período de recuperación, la concentración en el hígado duplica a la de la branquia (Handy, 1992a). En el presente trabajo la relación entre los niveles de concentración en la branquia y el hígado pone claramente de manifiesto la fase de exposición en la que se encontraban los pejerreyes.

Además, se ha demostrado que la relación entre la acumulación del Cd en los distintos órganos del cuerpo se vincula con la sensibilidad de la especie al metal, diferenciando entre aquellas tolerantes (ej. *Noemachelus barbatulus*), donde el metal tiende a acumularse predominantemente en el hígado, y aquellas sensibles (ej. *Salmo gairdneri*), donde tiende a hacerlo predominantemente en la branquia (Norey *et al.*, 1990). El patrón de acumulación hallado en presente estudio (con un marcado predominio en la branquia) sugeriría entonces que *O. bonariensis* correspondería al grupo de especies sensible al Cd.

V.e Bioconcentración del Cr(VI)

V.e.1. Niveles de Cr el agua de ensayo

En la Figura V.7., se muestran las concentraciones medias de Cr determinadas en el agua de ensayo al comienzo y final de los recambios de agua para cada uno de los tratamientos. El análisis estadístico arrojó como resultado que el tiempo entre recambios no produjo efecto significativo sobre los niveles de Cr en el agua (ANOVA, $p < 0.005$, $n = 16$). Sin embargo puede observarse que para la concentración más alta los valores de Cr en el agua son un 17% menor al fin del período. Las posibles causas de tal reducción serán discutidas más adelante.

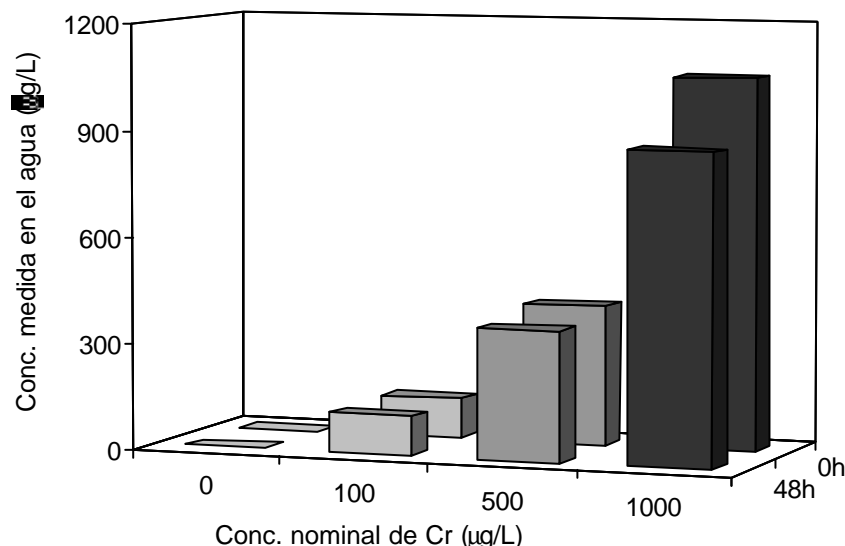


Figura V.7. Variación de la concentración de Cr en el agua de ensayo entre los periodos de recambio

V.e.2. Bioconcentración del Cr en la branquia

La acumulación del Cr en la branquia (Figura V.8.) fue afectada por la concentración del metal en el agua de ensayo, por el tiempo de exposición y por la interacción de estos dos factores (ANOVA $p < 0,05$, $n = 48$). Los niveles de Cr en este tejido se incrementaron significativamente ya desde las 48h en los individuos expuestos a 1000 $\mu\text{g Cr/L}$ y a partir de las 384h en los expuestos a 500 $\mu\text{g Cr/L}$. Los individuos expuestos a 100 $\mu\text{g Cr/L}$ no presentaron diferencias significativas respecto a los niveles de Cr en la branquia respecto a los individuos control en ninguno de los tiempos ensayados (Figura V.8.). El valor basal de Cr en la branquia (controles) fue de $0,447 \pm 0,062$ (12) $\mu\text{g Cr/g}$, mientras que en el grupo que presentó mayores niveles de Cr (1000 $\mu\text{g Cr/L}$ y 384h) fue de $2,571 \pm 0,262$ (6) $\mu\text{g Cr/g}$, representando un incremento de 5,8 veces.

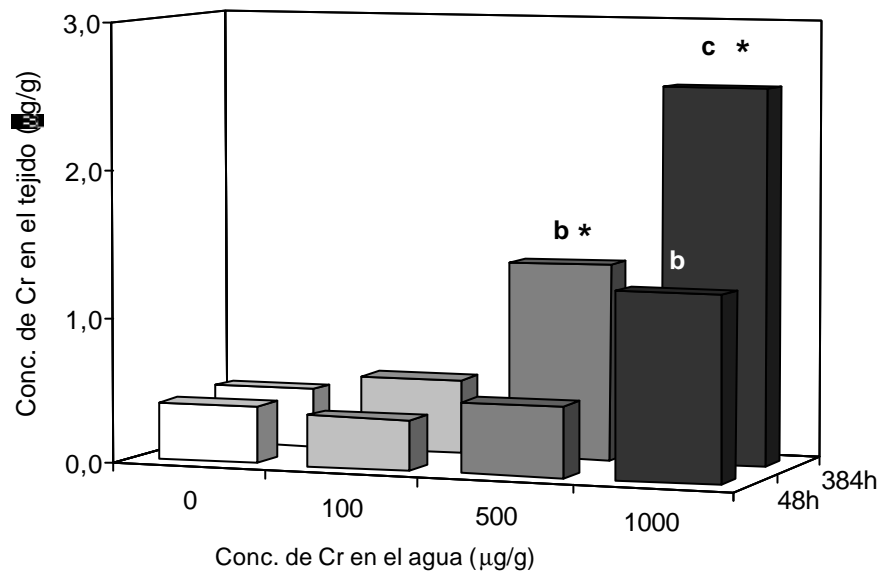


Figura V.8. Acumulación del Cr en la branquia de *O. bonariensis* en función de la concentración del metal en el agua.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre las concentraciones del metal en función del tiempo y letras diferentes implican diferencias significativas entre concentraciones (Prueba LSD, $p < 0,05$).

Los escasos trabajos hallados sobre la toxicocinética del Cr en peces también encuentran un aumento significativo de los niveles del metal en la branquia que junto al hígado y riñón son los tejidos con mayores niveles de acumulación (Van Der Putte *et al.*, 1981; Riva *et al.*, 1981; Calamari *et al.*, 1982).

La acumulación del Cr en la branquia guardó una relación lineal con su concentración en el agua ($[Cr]_{\text{branquia } 48} = 0,0014 \times [Cr]_{\text{agua}} + 0,317$ $r^2 = 0,91$ y $[Cr]_{\text{branquia } 384} = 0,0032 \times [Cr]_{\text{agua}} + 0,4686$; $r^2 = 0,99$). La variación de la velocidad de acumulación en función de la concentración de Cr en el agua luego de 384h si bien se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten los valores de las constantes fueron extremadamente grandes ($V_{\text{max}} = 3,97E+10$, $K_M = 4,76E+12$ $r^2 = 0,89$) careciendo de significado biológico. Nuevamente se pone en evidencia una exposición muy por debajo de la capacidad de saturación de este tejido, según se explicaría sobre la base del modelo propuesto para la incorporación del Cr(VI) en diferentes tipos celulares de vertebrados a través de canales transportadores de aniones sulfato y fosfato (Debetto *et al.*, 1988; Ottenwaelder y Wiegand, 1988; Markovich y James, 1999).

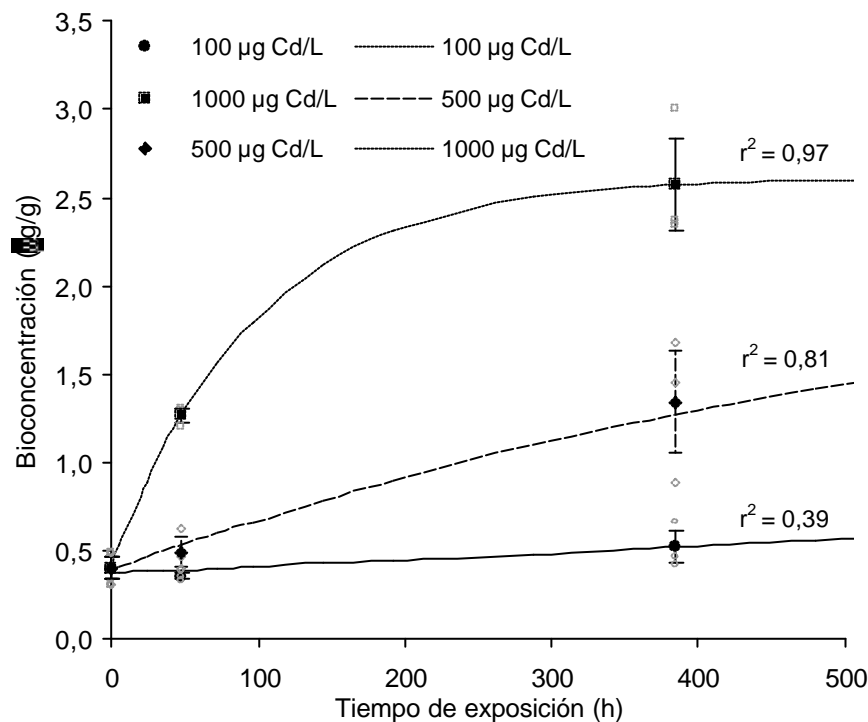


Figura V.9. Acumulación del Cr en la branquia de *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

Para cada concentración y tiempos ensayados, las figuras geométricas de la leyenda representan los valores promedio de concentración de Cd observados en la branquia y su correspondiente error estándar (barras), las líneas representan las curvas de bioconcentración ajustadas, con sus respectivos coeficientes de determinación (r^2).

La bioconcentración del Cr en la branquia en función del tiempo (Figura V.9.) se ajustó al modelo clásico de bioacumulación en los individuos expuestos a 1000 µg/L poniendo en evidencia que tanto los procesos de incorporación como los de eliminación del

tóxico se encontraban funcionando activamente. En los individuos expuestos a 5 µg/L el ajuste al modelo de bioacumulación clásico fue comparable al obtenido para un modelo lineal, de modo que allí la fase de incorporación del tóxico fue predominante sobre la de eliminación en las condiciones ensayadas.

Tabla V.8. Modelización de la bioconcentración del Cr en la branquia de *O. bonariensis*

| Conc. Nominal [µg Cr/L] | Modelo Ajustado | r ² | Parámetros modelo | | | | FA % | BC |
|-------------------------------|--|----------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------|-------|
| | | | k _a [L×(g ⁻¹ ×h ⁻¹)] | k _e [h ⁻¹] | C _i [µg Cd/L] | t _{1/2} [d] | | |
| 1000 | $C_t = 1000 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t}) + C_i$ | 0,94 | 2,31E-05 | 0,0104 | 0,398 | 2,8 | 656 | 2,213 |
| 500 | $C_t = 500 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t}) + C_i$ | 0,84 | 6,3E-06 | 0,0017 | 0,448 | 17,2 | 503 | 3,739 |
| 100 | no se observó diferencia significativa respecto al control a ningún tiempo de exposición | | | | | | | |

r²: coeficiente de determinación, k_a: tasa de acumulación, k_e: tasa de eliminación, C_i: concentración inicial en el tejido, t_{1/2}: tiempo para alcanzar 1/2 de la concentración máxima (C_s), FA: factor de acumulación (C_s/C_i×100), BC: factor de bioconcentración (k_a/k_e×1000)

El t_{1/2} varió en función de los niveles de exposición, el valor estimado para los organismos expuestos a 1000 µg Cr/L fue cuatro veces menor que el estimado para los expuestos a 5000 µg Cr/L (Tabla V.8.). El FA y BC fueron mayores para los individuos expuestos a la mayor concentración pero no llegó a ser el doble. La concentración de saturación (C_s) estimada fue 3,90 y 3,07 para los peces expuestos a 1000 y 500 µg Cr/L. Todo esto, indicaría que la concentración de equilibrio sería aproximadamente la misma independientemente de los niveles de exposición y que sólo cambiaría el tiempo para alcanzarla, lo cual sugeriría un sistema de regulación de los niveles de Cr en la branquia.

V.e.3. Bioconcentración en el hígado

Respecto a la bioconcentración del Cr (Figura V.10.), el hígado se comportó de un modo similar al de la branquia. Los dos factores ensayados y su interacción afectaron significativamente la acumulación del Cr en este tejido (ANOVA p<0,05, n = 48). Las menores concentraciones de Cr en el agua de ensayo que incrementaron significativamente los niveles del metal en el hígado de *O. bonariensis* luego de 48 y 384h de exposición fueron 1000 y 500 µg/L respectivamente. Como en la branquia, los individuos expuestos a 100 µg/L no presentaron diferencias significativas en los niveles de Cr en el hígado respecto a los controles a ninguno de los tiempos ensayados. Los niveles basales del metal en este tejido fueron 0,070±0,015 (12) µg Cr/g y el máximo

tenor, correspondiente a los individuos expuestos a 1000 $\mu\text{g/L}$ durante 384h, fue $1,282 \pm 0,149$ (6) $\mu\text{g Cr/g}$ (18,31 veces mayor).

En concordancia con los resultados obtenidos, los escasos los trabajos donde se reporten valores de los niveles de Cr en el hígado de peces expuestos en condiciones de laboratorio, hallan un aumento significativo de la acumulación del metal en función de su concentración en el agua, siendo justamente el hígado uno de los tejidos donde la bioconcentración es mayor (Van Der Putte *et al.*, 1981; Riva *et al.*, 1981; Calamari *et al.*, 1982). En un estudio donde se evaluó el efecto del Cr sobre el sistema inmune de *Saccobranchus fossilis*, se halló que organismos expuestos a concentraciones de 0, 100, 1000 y 3200 $\mu\text{g/L}$ durante 28 d (Khangarot *et al.*, 1999), presentaron niveles de Cr en el hígado sustancialmente mayores que los hallados para el pejerrey. A pesar de ello, si se calcula la relación entre los individuos expuestos a 1000 $\mu\text{g/L}$ y los controles, los resultados son comparables, indicando la existencia de alguna relación entre nivel de exposición y el incremento relativo de la concentración del metal en el tejido.

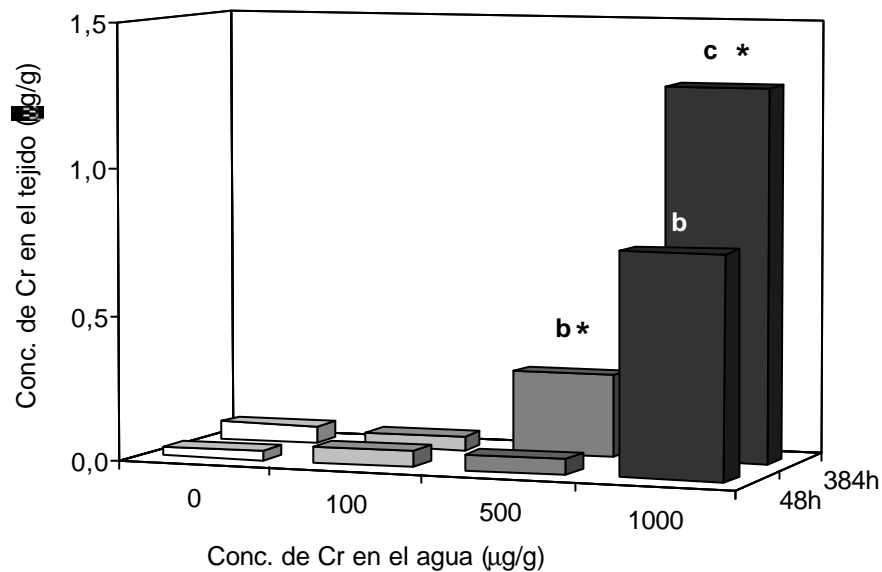


Figura V.10. Acumulación del Cr en el hígado de *O. bonariensis* en función de la concentración del metal en el agua.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre las concentraciones del metal en función del tiempo y letras diferentes implican diferencias significativas entre concentraciones (Prueba LSD, $p < 0,05$).

El patrón de bioconcentración observado en el hígado en función de los niveles de Cr en el agua fue muy diferente al de la branquia. Los valores no se ajustaron a un modelo

lineal sino que lo hicieron a uno de tipo exponencial ($[Cr]_{\text{hígado } 48h} = 0,0298 \times e^{0,0028 \times [Cr]_{\text{agua}}}$; $r^2 = 0,83$ y $[Cr]_{\text{hígado } 384h} = 0,0511 \times e^{0,0032 \times [Cr]_{\text{agua}}}$ $r^2 = 0,98$). Esto indica que la acumulación en el hígado no responde a una ecuación de primer orden donde la relación $\Delta [Cr]_{\text{tejido}} / \Delta [Cr]_{\text{agua}}$ es constante. La velocidad de bioconcentración el hígado en función de los niveles del metal en el agua luego de 384h, también presentó un comportamiento diferente al de la branquia, el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten fue aceptable ($r^2 = 0,85$) pero los parámetros nuevamente mostraron valores sin sentido biológico. El modelo lineal respondió igualmente bien ($R^2 = 0,88$) indicando una vez más que a los tiempos ensayados las concentraciones de trabajo se encontraron muy por debajo de los niveles de saturación del tejido para la incorporación del metal.

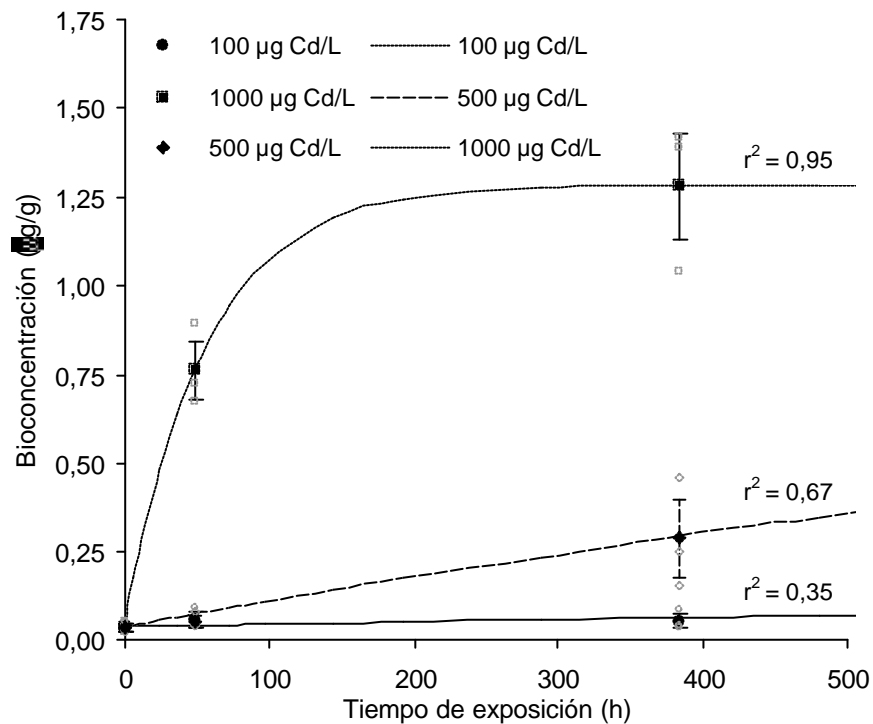


Figura V.11. Acumulación del Cr en el hígado de *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

Para cada concentración y tiempos ensayados, las figuras geométricas de la leyenda representan los valores promedio de concentración de Cd observados en el hígado y su correspondiente error estándar (barras), las líneas representan las curvas de bioconcentración ajustadas, con sus respectivos coeficientes de determinación (r^2).

La bioconcentración en función del tiempo, se ajustó al modelo tradicional (Figura V.11.) en los organismos expuestos a la máxima concentración mientras que para los individuos expuestos a la concentración intermedia el ajuste no fue tan bueno y fue equivalente al ajuste obtenido para una recta ($R^2 = 0,67$). Nuevamente, observamos

que la concentración más alta, luego de las 384 h de exposición, fue capaz de poner de manifiesto tanto los procesos de acumulación como los de eliminación, mientras que en la concentración media predominan los procesos de incorporación del metal.

Tabla V.9. Modelización de la bioconcentración del Cr en el hígado de *O. bonariensis*

| Conc. Nominal [µg Cr/L] | Modelo Ajustado | r ² | Parámetros modelo | | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------|-------|
| | | | k _a [L×(g ⁻¹ ×h ⁻¹)] | k _e [h ⁻¹] | C _i [µg Cd/L] | t _{1/2} [d] | FA % | BC |
| 1000 | $C_t = 1000 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t}) + C_i$ | 0,95 | 2,22E-05 | 0,0181 | 0,050 | 1,6 | 2546 | 1,233 |
| 500 | $C_t = 500 \times (k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t}) + C_i$ | 0,67 | 1,49E-06 | 0,0006 | 0,037 | 48,0 | 3359 | 2,471 |
| 100 | no se observó diferencia significativa respecto al control a ningún tiempo de exposición | | | | | | | |

r²: coeficiente de determinación, k_a: tasa de acumulación, k_e: tasa de eliminación, C_i: concentración inicial en el tejido, t_{1/2}: tiempo para alcanzar 1/2 de la concentración máxima (C_s), FA: factor de acumulación (C_s/C_i×100), BC: factor de bioconcentración (k_a/k_e×1000)

Los parámetros del modelo (Tabla V.9.) que interpretan la acumulación del Cr en los organismos muestran una gran diferencia entre aquellos expuestos a 1000 y 500 µg/L. Para los primeros, el modelo alcanza t_{1/2} rápidamente y los valores de FA, BC y Cs (1,28µg/g) son bajos, por el contrario en los últimos t_{1/2}, FA, BC y Cs (35,7 µg/g) toman valores muy altos de difícil realismo biológico. Nuevamente, como para el Cd, se plantea el dilema entre la existencia de un sistema regulado, sin regulación o la coexistencia de ambos con un mecanismo disparador entre uno y otro dependiente de los niveles de Cr. Sin embargo, a diferencia de la clara evidencia hallada para el Cd en favor de un sistema no regulado basado en una acumulación pasiva, para el Cr ésta es ambigua. Por un lado, Van Der Putte *et al.* (1981) hallan en truchas (*Salmo gairdneri*) expuesta a concentraciones de Cr entre 2 y 50 mg/L por un período de entre 2 y 4 d seguido de un período de recuperación que durante ésta última fase los niveles de Cr en el hígado permanecían altos cuando en otros tejidos como la branquia y la sangre volvían rápidamente a sus niveles basales aportando evidencia sobre la inexistencia de un sistema regulador. Por el otro, estudios realizados en humanos y ratones, proponen una eliminación rápida del Cr en el hígado durante la fase de recuperación (Kerger *et al.*, 1996; O'Flaherty, 1996; Thomann *et al.*, 1994) lo cual implicaría la existencia de una regulación activa de la excreción.

V.e.4. Relación entre los niveles de Cr en la branquia y el hígado

Los niveles de Cr en la branquia luego de 384 h de exposición presentaron una buena correlación ($R^2 = 0,93$, $n = 12$) con el logaritmo natural de los niveles del metal en el hígado (Figura V.12.). Este hecho confirma por un lado que los tenores de Cr en los tejidos respondieron a los niveles de exposición y por otro deja ver que el modo en que respondió la acumulación en cada tejido no fue igual, aumentando la tasa de acumulación en el hígado a medida que aumentan los valores de Cr en la branquia.

Desafortunadamente no se han hallado trabajos previos donde se comparen en condiciones de laboratorio las concentraciones de Cr en diferentes tejidos del cuerpo y las relaciones en función de los niveles y tiempos de exposición.

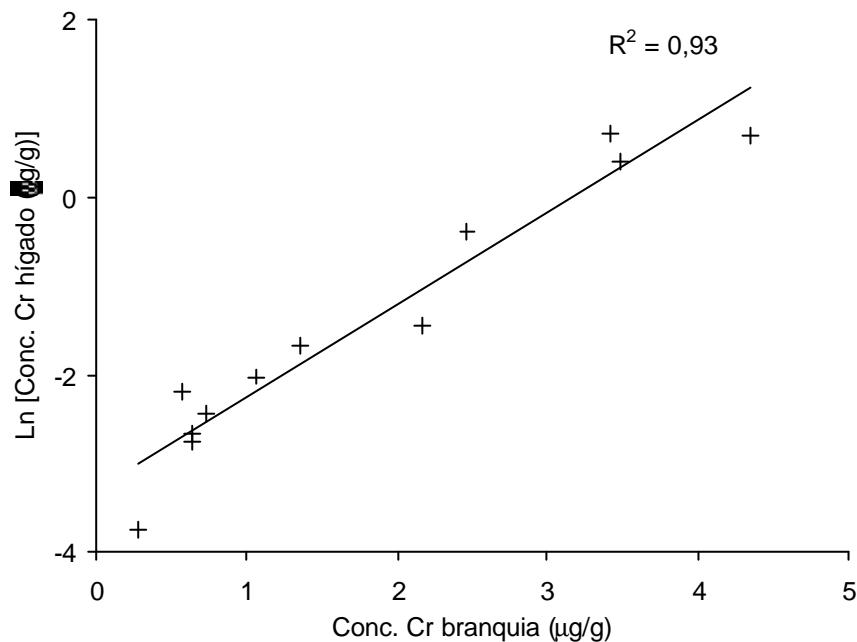


Figura V.12. Relación entre los niveles de Cr en el hígado y la branquia de *O. bonariensis* expuestos durante 384 h a 1000 mg Cr/L.

Al analizar la relación entre la bioconcentración de Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* (Tabla V.10.), observamos que los niveles relativos de Cr en la branquia disminuyeron significativamente respecto de los del hígado en función de la concentración y esa relación fue independiente del tiempo de exposición (ANOVA $p < 0,05$; $n = 24$). Esto significa que la concentración en ambos tejidos se encontraría en equilibrio para cada una de las concentraciones ensayadas ya desde las 48 h,

pudiendo representar entonces esta relación un interesante indicador del nivel de exposición al que se encuentran sometidos los peces.

Tabla V.10. Relación entre la concentración de Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* en función de las concentraciones del metal en el agua y tiempos de exposición ensayados.

| Conc. Cr (µg/L) | 48 h | | 384 h | |
|--------------------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | Med | Error Std | Med | Error Std |
| 0 | 13,93 ± 3,97 ^a | | 12,77 ± 7,50 ^a | |
| 1 | 7,39 ± 1,90 ^a | | 11,91 ± 3,52 ^a | |
| 5 | 9,97 ± 1,35 ^a | | 6,29 ± 2,65 ^a | |
| 10 | 1,68 ± 0,11 ^b | | 2,08 ± 0,40 ^b | |

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de exposición a Cr, los asteriscos indican diferencias significativas entre tiempos de exposición diferentes (LSD, $p < 0,05$)

En los pejerreyes el Cr pareciera tener mayor afinidad relativa por el hígado siendo este el lugar hacia donde el metal se moviliza y por lo tanto convirtiéndose en el órgano blanco.

V.f Comparación entre los patrones de acumulación del Cd y del Cr en la branquia e hígado de *O. bonariensis*.

Resulta interesante comparar los diferentes patrones de acumulación observados para cada uno de los metales estudiados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, puede señalarse en primer lugar que la afinidad del Cd(II) por la branquia fue muy superior que la del Cr(VI), presentando el primero un factor de bioconcentración para este tejido un orden de magnitud mayor el segundo ($\cong 6000$ y $\cong 600$; Tablas V.4 y V.8). Si bien no se han hallado trabajos previos donde se comparen los patrones de acumulación de estos dos metales, sobre la base del conocimiento actual de la especiación y los mecanismos de incorporación y acumulación de cada metal por la célula, la diferencia observada en el presente estudio podría explicarse como producto de las diferencias en: i) la especie química dominante para cada uno de los metales en las condiciones estudiadas, catión Cd^{+2} y anión CrO_4^- / $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ (Kotas y Stasicka, 2000), ii) probablemente la afinidad de unión a la branquia, iii) el mecanismo de incorporación al tejido, canales de Ca^{+2} para el Cd(II) (Verbost *et al.* 1989; Wicklund Glynn *et al.*, 1994) y transportadores de SO_4^{-2} o PO_4^{-2} para el Cr(VI)

(Wetterhahn, 1979; Ottenwaelder y Wiegand, 1988; De Flora y Wetterhahn, 1989) y iv) a diferentes sistemas intracelulares de complejación que favorezcan su acumulación, metalotioneínas para el Cd (Hollis *et al.*, 2001) o proteínas de bajo peso molecular para el Cr (LMWCr; Stearns, 2000). Esta particularidad de cada metal podría explicar luego una mayor toxicidad aguda en favor del Cd.

Luego, resulta interesante resaltar que mientras los niveles de Cd (en moles) fueron 2,0 veces mayores a los de Cr en la branquia, este orden se invirtió en el hígado donde el nivel de Cr fue 4,2 veces mayor al de Cd (Tabla V.11). Este hecho nos permite ver que la branquia actúa como un filtro que retiene efectivamente el Cd del medio, a pesar de su baja concentración, pero luego hace muy lenta su liberación para que este ingrese al resto del organismo. Contrariamente, la menor afinidad de la branquia por el Cr hace que este metal no sea retenido y acumulado en ese tejido, sino que ingrese a la circulación sistémica, llegando así al hígado con mayor facilidad que el Cd. La alta afinidad del Cd(II) por la branquia, se explica por la capacidad de este catión de adsorberse rápidamente a su superficie y ser luego incorporado más lentamente al interior de la misma (Pagenkopf, 1983; Playle 1998). Por otro lado, la acumulación del Cr en el hígado, puede ser interpretada como la capacidad del Cr(VI) de atravesar epitelios respiratorios y ser incorporado por los eritrocitos (Langård *et al.*, 1978; Korallus, 1986), donde es reducido intracelularmente a Cr(III), quedando en su mayor parte irreversiblemente unido a la hemoglobina, siendo así luego distribuido por el resto del organismo (Korallus, 1986; Kerger *et al.*, 1996; Kerger *et al.*, 1997). Esta distribución particular de cada metal luego podrá verse reflejada en los efectos que cada uno induzca a nivel subletal.

V.g Conclusiones particulares

Como comentario general respecto al presente capítulo, podemos resaltar que se trata del primer estudio toxicocinético del Cd (II) y del Cr (VI) realizado en el pejerrey y es uno de los escasos trabajos realizados a nivel mundial sobre la toxicocinesis del Cr(VI) en peces.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados para determinar la bioconcentración del Cd y Cr en la branquia y el hígado de pejerreyes

sometidos a niveles subletales de dichos metales durante exposiciones subcrónicas y en referencia a los objetivos planteados se puede concluir que :

- El incremento de las concentraciones de Cd y Cr en los tejidos en respuesta a su concentración en el agua junto a la interpretación de los modelos utilizados para la descripción del proceso de acumulación, demostraron una acumulación significativa de cada uno de los metales en los tejidos estudiados para 8 de los 12 tratamientos ensayados (ver sección de resultados en este capítulo para más detalle).

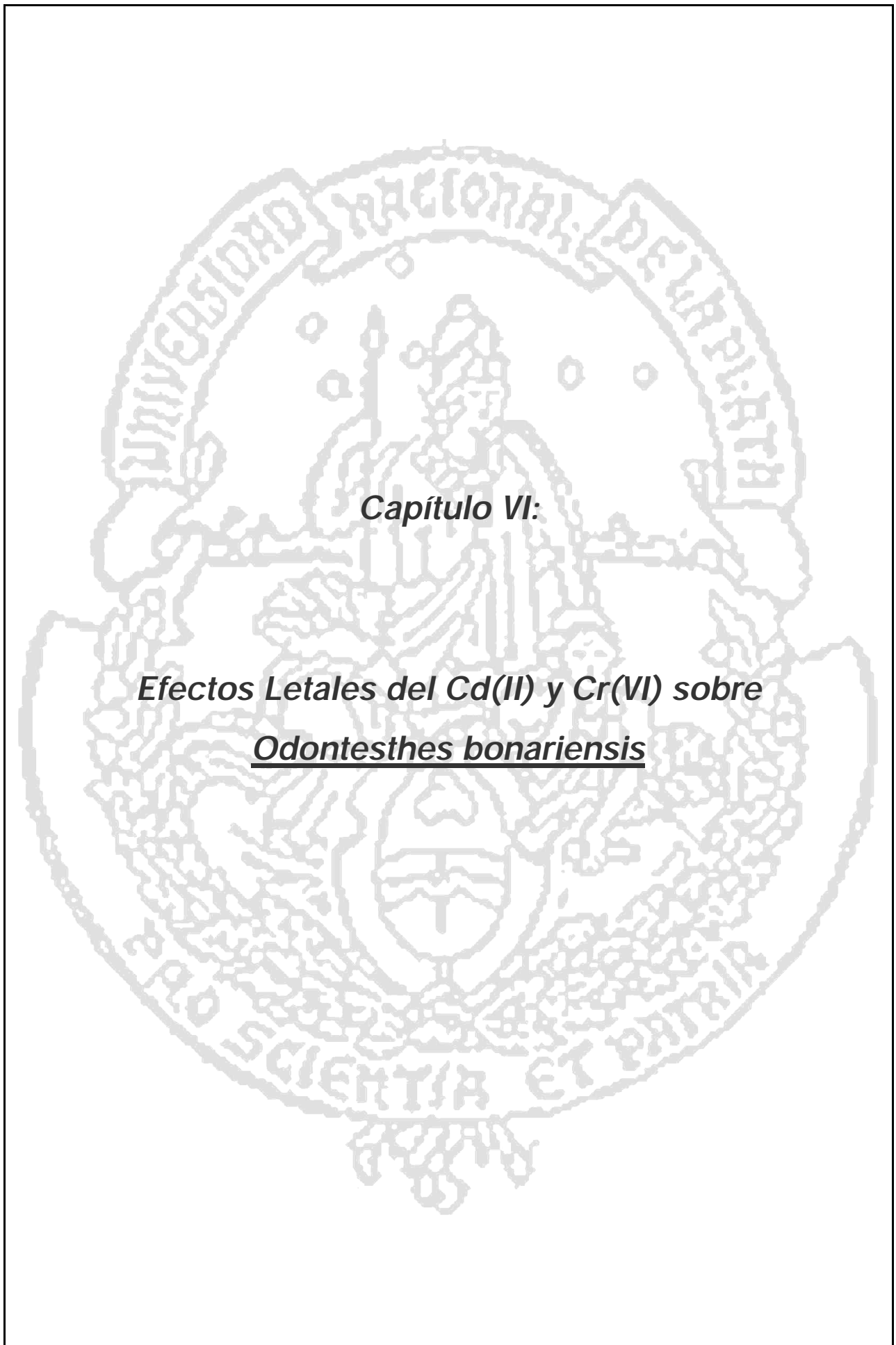
Tabla V.11. Concentraciones de Cd y Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* en función de los niveles de los metales en el agua y los tiempos de exposición

| Metal | T. Exp. | Conc. Nominal | Conc. Tejido | | | | | | | |
|--------|---------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|----------|----|-------|----|
| | | | Branquia | | | | Hígado | | | |
| | | | Media | ES | Media | ES | Media | ES | Media | ES |
| (h) | (mg/L) | (mg/g) | (nmol/g) | (mg/g) | (nmol/g) | (mg/g) | (nmol/g) | | | |
| Cd(II) | 48 | 0 | 0.21 ± 0.05 | 1.87 ± 0.47 | 0.21 ± 0.06 | 1.88 ± 0.57 | | | | |
| | | 1 | 0.29 ± 0.09 | 2.60 ± 0.80 | 0.19 ± 0.01 | 1.66 ± 0.07 | | | | |
| | | 5 | 1.10 ± 0.21 | 9.83 ± 1.91 | 0.19 ± 0.02 | 1.73 ± 0.14 | | | | |
| | | 10 | 2.11 ± 0.08 | 18.78 ± 0.70 | 0.34 ± 0.06 | 2.99 ± 0.54 | | | | |
| | 384 | 0 | 0.28 ± 0.08 | 2.52 ± 0.70 | 0.21 ± 0.06 | 1.87 ± 0.54 | | | | |
| | | 1 | 1.22 ± 0.22 | 10.89 ± 2.00 | 0.22 ± 0.04 | 1.96 ± 0.31 | | | | |
| | | 5 | 6.28 ± 0.42 | 55.87 ± 3.70 | 0.32 ± 0.02 | 2.83 ± 0.17 | | | | |
| | | 10 | 11.11 ± 1.10 | 98.85 ± 9.75 | 0.65 ± 0.02 | 5.82 ± 0.16 | | | | |
| Cr(VI) | 48 | 0 | 0.40 ± 0.06 | 7.66 ± 1.25 | 0.03 ± 0.01 | 0.64 ± 0.20 | | | | |
| | | 100 | 0.35 ± 0.02 | 6.82 ± 0.33 | 0.06 ± 0.02 | 1.09 ± 0.40 | | | | |
| | | 500 | 0.49 ± 0.08 | 9.42 ± 1.60 | 0.05 ± 0.02 | 1.01 ± 0.33 | | | | |
| | | 1000 | 1.27 ± 0.04 | 24.44 ± 0.74 | 0.76 ± 0.08 | 14.71 ± 1.58 | | | | |
| | 384 | 0 | 0.41 ± 0.04 | 7.88 ± 0.74 | 0.07 ± 0.03 | 1.30 ± 0.59 | | | | |
| | | 100 | 0.52 ± 0.09 | 9.97 ± 1.80 | 0.05 ± 0.02 | 1.01 ± 0.38 | | | | |
| | | 500 | 1.34 ± 0.29 | 25.85 ± 5.53 | 0.29 ± 0.11 | 5.54 ± 2.16 | | | | |
| | | 1000 | 2.57 ± 0.26 | 49.44 ± 5.03 | 1.28 ± 0.15 | 24.65 ± 2.87 | | | | |

- Han sido establecidos los niveles de acumulación Cd y Cr en la branquia e hígado de *O. bonariensis* en función de las concentraciones de cada metal en el agua y de los tiempos de exposición ensayados (Tabla V.11.). En función de los patrones de distribución observados en los tejidos se puede afirmar que el pejerrey presenta un perfil correspondiente al de una especie sensible a los metales pesados y que el patrón de acumulación diferencial presentado por cada uno de los metales en los tejidos estudiados, indicaría que tanto los mecanismos responsables de inducir los

efectos letales y subletales, como y la magnitud de las respuestas esperadas, debieran ser diferentes para el Cd y el Cr.

- Los modelos utilizados para describir el proceso de acumulación de ambos metales se ajustaron satisfactoriamente y demostraron ser útiles en la interpretación de los procesos fisiológicos subyacentes. El modelo cinético de Michaelis-Menten fue efectivo para demostrar que los niveles de concentración ensayados para cada metal siempre estuvieron por debajo de la capacidad de acumulación del tejido, lejos de saturar los canales involucrados en su incorporación, explicando la linealidad observada entre la acumulación y los niveles de los metales en el agua. El modelo de bioconcentración en función del tiempo fue igualmente efectivo para evidenciar la magnitud de los procesos de incorporación y eliminación de los metales en cada tejido y establecer tendencias groseras respecto a la concentración de saturación y los tiempos para alcanzarla. Es evidente que para la obtención de valores precisos de estos parámetros es necesario el empleo de mayores tiempos de exposición, mayor número de puntos de muestreo y de experiencias donde se incluya la fase de recuperación, aunque ese nivel de detalle escapa los objetivos de este trabajo.



Capítulo VI:

Efectos Letales del Cd(II) y Cr(VI) sobre
Odontesthes bonariensis

Capítulo VI. Efectos Letales del Cd(II) y Cr(VI) sobre Odontesthes bonariensis.

VI.a Introducción

Puede definirse como efecto letal de una sustancia, al conjunto de procesos biológicos (fisiológicos, bioquímicos, moleculares) desencadenados por esta y que conducen finalmente a la muerte del organismo (Newman y Unger, 2003). En general tales efectos se observan en respuesta a exposiciones agudas del tóxico (concentraciones relativamente altas y poco prolongadas, 2-4d), y son producto de la incapacidad del organismo de compensar las rápidas y profundas modificaciones metabólicas acaecidas. En contraposición, las exposiciones crónicas (a concentraciones más bajas que la anteriores y durante al menos un periodo equivalente al 10% del ciclo de vida del organismo; Suter, 1993; APHA-AWWA-WEF, 1998) conducen menos frecuentemente a la mortalidad directa, y suelen afectar otros parámetros poblacionales, tales como el crecimiento individual o el éxito reproductivo de una especie, como respuesta al costo adicional que conlleva reparar y compensar los daños causados por el tóxico (Modelo de daño-reparación; McDonald y Wood, 1993).

Aunque por si mismos los estudios de letalidad aguda poseen una significancia limitada, ellos son esenciales para caracterizar la toxicidad de una sustancia y su riesgo para los organismos vivos, siendo los primeros que se llevan a cabo sobre una nueva sustancia (Klaassen, 1996). Los estudios sobre una sustancia pura y para una especie en particular siguen principalmente dos objetivos: por un lado, establecer la toxicidad relativa de la sustancia respecto a una escala de toxicidad dada y por otro, determinar la sensibilidad específica de la especie a dicha sustancia en relación a otras especies (APHA-AWWA-WEF, 1998). Esta información resultará luego básica para la creación de normas de control ambiental, el establecimiento de criterios de calidad ambiental de la sustancia en particular (ej. criterios de calidad para el Cd; USEPA, 2000), para la realización de evaluaciones de riesgo, o para la protección de la especie (Rand, 1995).

El enfoque más comúnmente utilizado para la evaluación de efectos letales, que proviene originariamente de la toxicología de mamíferos y que luego fue adoptado ampliamente en ecotoxicología (Newman y Unger, 2003), se basa en el establecimiento de la relación concentración-respuesta mediante la realización de ensayos de toxicidad

aguda. Los mismos consisten en exponer en condiciones de laboratorio a grupos de organismos de una misma especie (poblaciones) a diferentes niveles de concentración del tóxico y registrar las mortalidades luego de un cierto período (generalmente 24, 48, 72 y 96h).

La mortalidad es una respuesta cuantitativa, puesto que el organismo sólo puede estar vivo o muerto. Los modelos más difundidos para evaluar los datos provenientes de la relación concentración-respuesta cuantitativa se basan en el concepto de tolerancia individual o dosis efectiva individual (IED). De acuerdo con este concepto existe una concentración mínima de tóxico necesaria para matar a un individuo y ésta es propia de cada individuo.

El método Probit es el modelo más utilizado para estudiar dicha relación. Este asume que el valor de IED sigue una distribución log-normal dentro de la población de individuos (mortalidad por intervalos; Figura VI.1.A.). Para convertir esta distribución sesgada, en una distribución normal (simétrica), se deberán transformar los valores de las concentraciones aplicándoles el logaritmo natural (metrametrización; Figura VI.1.B.). De esta forma, la frecuencia de mortalidad observada

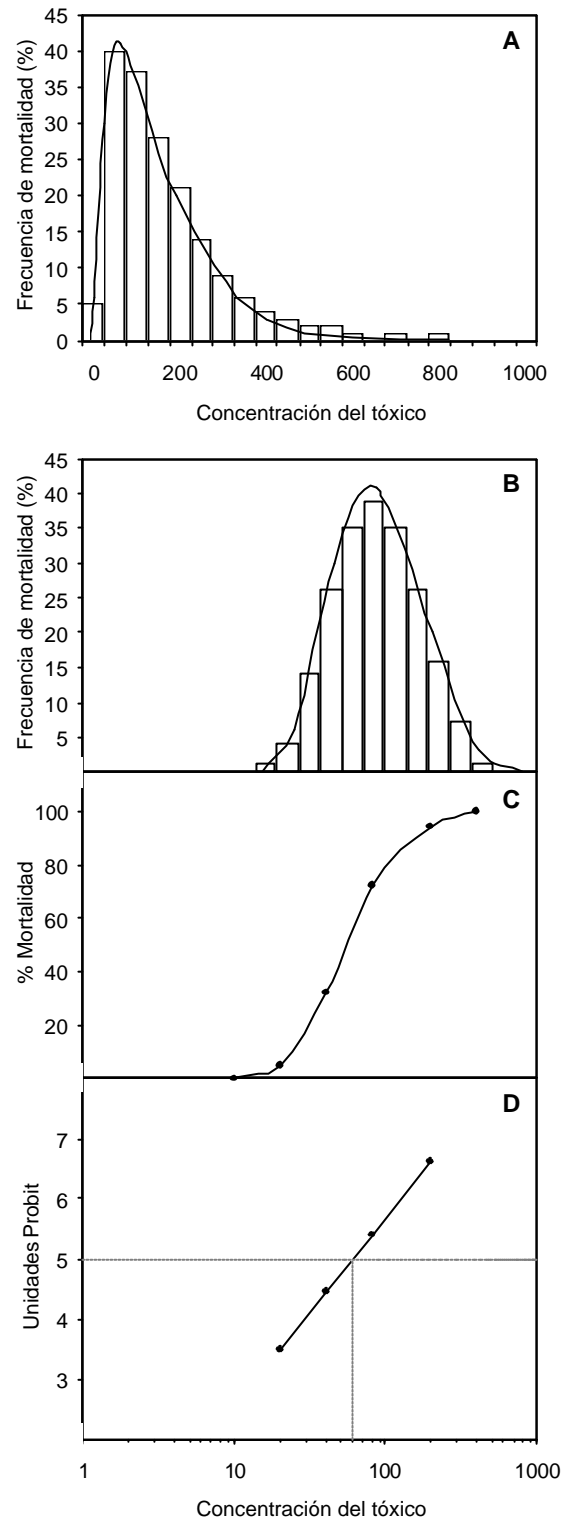


Figura VI.1. Diagrama de la relación concentración-respuesta cuantitativa, base del método Probit.

Panel A: Distribución log-normal de la frecuencia de mortalidad en función de la concentración del tóxico. Panel B: Normalización de la frecuencia de mortalidad al expresarla en función del logaritmo de la concentración del tóxico. Panel C: Porcentaje de mortalidad acumulada en función del logaritmo de la concentración del tóxico. Panel D: Porcentaje de mortalidad acumulada transformada a unidades Probit utilizando el NED. Adaptado de Klassenn, 1996.

por intervalos $(m_{(i)}/n - m_{(i-1)}/n)$; donde $m = n^{\circ}$ de muertos en la concentración i y $n =$ total de organismos expuestos) en función de la nueva escala metamétrica (escala transformada donde el metámetro es la concentración del tóxico; Bacharach *et al.*, 1942), se distribuirá normalmente y la mortalidad acumulada presentará su típico aspecto sigmoideo (Figura VI.1.c.). Finalmente, para simplificar el análisis, el método linealiza ésta curva transformando los porcentajes de mortalidad a unidades Probit (Figura VI.1.d.). Esta transformación se deriva a partir de la *desviación normal equivalente* (NED; Gaddum, 1933) y consiste en obtener para la frecuencia de mortalidad observada para cada concentración, los valores de z correspondientes a una curva normal con media igual cero y una desviación estándar de 1. Posteriormente, para obtener siempre valores positivos, al (NED) se le debe sumar 5 (Bliss, 1934a;b). De este modo cuando las unidades Probit se grafican en función del logaritmo natural de la concentración del tóxico se obtiene una función lineal que permite estimar parámetros como las concentraciones letales para un porcentaje determinado de la población ($LC_{(n)}$) y la pendiente de la curva concentración-respuesta. Otros modelos, menos utilizados, parten de asumir otro tipo de distribución para las mortalidades, como por ejemplo log-logistic o de Weibull (Newman y Unger, 2003).

Otro enfoque para evaluar los efectos letales es el establecimiento de su relación, ya no en función de la concentración del tóxico, sino en función del tiempo de exposición. Esto es de gran importancia porque el efecto del tiempo sobre la toxicidad de una sustancia puede ser profundo. Por ejemplo las concentraciones letales medias (LC_{50}) para los metales durante exposiciones de pocas horas pueden ser mucho mayores que durante los tiempos de 48 o 96h, normalizados para exposiciones agudas (Bailey *et al.*, 1985; Abel y Garner, 1986). Los valores de LC_{50} muestran a menudo un decaimiento exponencial con el tiempo, alcanzando un valor asintótico denominado "*concentración umbral incipiente*" (Sprague, 1969), "*concentración letal asintótica*" (APHA-AWWA-WEF 1998), ó simplemente "incipiencia" (Newman y Unger, 2003). El tiempo requerido para alcanzar este valor dependerá de la especie y del tóxico que se trate y puede tomar desde unos pocos minutos a años. Esta idealización puede verse interferida por demoras en la respuesta, aclimatación de los organismos y mecanismos de acción complejos, pero una declinación exponencial será de todos modos evidente (Wood *et al.*, 1997).

Un aspecto interesante de este enfoque es que refleja el hecho que la respuesta al tóxico sigue una serie de eventos encadenados en el tiempo – ej. acumulación en el sitio de acción → disrupción del metabolismo → disfunciones fisiológicas → respuesta tóxica (Bergman y Dorward-King, 1997). Este hecho tiene la ventaja de permitir la interpretación del proceso mediante modelos conceptuales y mecanicísticos que relacionen la toxicidad aguda con la bioacumulación, la toxicocinética y los mecanismos de acción del tóxico. En tal sentido varios autores han notado que la declinación exponencial de los valores de LC50 es consistente con modelos donde la toxicidad es determinada por la acumulación del tóxico en el sitio de acción hasta una concentración límite o crítica (Mancini, 1983; Neely, 1984; Chew y Hamilton, 1985). Otros autores han avanzado aún más, relacionando la diferencia de la toxicidad de distintas sustancias (valores de LC50 o tiempo de acción) no sólo con un valor límite de acumulación sino con su toxicocinética (Van Hoogen y Opperhuizen, 1988) o relacionando además la toxicidad de la sustancia con la cinética del daño fisiológico (Ankley *et al.*, 1995; Legierse *et al.*, 1999).

En particular para los metales, estos modelos no habían sido muy exitosos debido a la dificultad de hallar valores de acumulación consistentes (Wood *et al.*, 1997). Sin embargo, en los últimos años con las mejoras introducidas en los métodos para medir, interpretar y predecir su acumulación, modelos como el de "ligando biótico", que provee un enfoque realístico y mecanicístico para describir la influencia de la especiación del metal con su acumulación y toxicidad (Playle, 1998), han logrado un avance importante al respecto, que puede ser apreciado en los trabajos de Wood *et al.* (1999), Meyer (1999), Mayer *et al.* (1999), McGeer *et al.* (2000) y Macdonald *et al.* (2002). A pesar de ello, si bien el modelo de "ligando biótico" ha mejorado la predicción respecto a cuanto se acumulará y que efecto producirá, nada dice respecto al cuando ocurrirá. Siendo aún la dimensión temporal, dada por la cinética de acumulación y de la respuesta fisiológica, un tema pendiente en la modelización de la toxicidad aguda de los metales.

Un factor crítico vinculado a la toxicidad de los metales en el medio acuático es su especiación química. Esto es debido a que ciertas especies son más tóxicas que otras, siendo por lo general la especie catiónica la más perjudicial (Pagenkopf, 1983, Playle, 1998, Wood *et al.*, 1999). La especie química predominante dependerá de las características fisicoquímicas del agua, siendo los principales parámetros que se deberán conocer para su determinación: el pH, la alcalinidad, la dureza

(preferentemente la concentración de Ca^{+2}), la fuerza iónica (sólidos disueltos totales), COD, concentración total del metal, sustancias de origen antropogénico (ej. EDTA) y preferentemente la concentración de Al y Fe (Kramer *et al.*, 1997).

Dos enfoques radicalmente distintos han sido propuestos para vincular la toxicidad de un metal con las características fisicoquímicas del medio. Por un lado, un enfoque mecanicístico, basados en las constantes termodinámicas de estabilidad de equilibrio condicional (modelo del ligando biótico) que describen la relación entre la toxicidad aguda de los metales pesados y un parámetro fisicoquímico del agua dado (ej. dureza) mediante el concepto de unión competitiva entre cationes por los sitios de unión en la branquia (Meyer, 1999). Por el otro lado, un enfoque empírico, basado en un conjunto de datos experimentales (valores de LC50) tomados de la bibliografía en relación a un determinado parámetro fisicoquímico del agua a los que se les ajusta a un modelo de regresión conveniente (USEPA, 2000). Si bien el modelo mecanicístico es más adecuado desde el punto de vista formal, su aplicación requiere del conocimiento de los parámetros del agua anteriormente descritos, de los valores de las constantes termodinámicas de estabilidad de equilibrio condicional para cada uno de los ligandos involucrados y de programas específicos, lo cual hace más dificultosa su aplicación.

La mayor parte de los conceptos introductorios hasta aquí vertidos, se corresponde con el desarrollo del conocimiento vinculado a los efectos agudos provocados por los denominados "Metales Cationes Clase B" (Nieboer y Richardson, 1980), grupo entre los que se encuentra el Cd(II) y que ha centrado la mayor atención y esfuerzo de la toxicología acuática. Por el contrario, para el Cr(VI), que como se mencionó en el Capítulo I posee un comportamiento químico completamente distinto a los metales de "Clase B", el conocimiento existente de sus efectos letales agudos sobre los peces y el grado de desarrollo de los modelos para su interpretación se encuentra en una etapa mucho menos avanzada. Si bien pueden citarse varios trabajos sobre los niveles letales agudos del Cr(VI) para diferentes especies de peces (Turnbull *et al.*, 1954; Schiffman y Fromm, 1959; Al Rehwoldt *et al.*, 1972; Ruesink, 1975; Dorn *et al.*, 1993; Akel y Shamsi, 1996; Silva *et al.*, 2001), sólo unas pocas publicaciones pudieron ser halladas acerca de la influencia de las características del agua, tales como el pH, sobre la toxicidad aguda y la acumulación de este metal (Van Der Putte *et al.*, 1981), ó en relación a su toxicocinética en peces (Calamari *et al.*, 1982).

Cuando se intentan hallar los posibles mecanismos de acción a nivel bioquímico y molecular causantes de las disfunciones fisiológicas que conducen los efectos letales agudos de los dos metales estudiados, nos encontramos con la misma situación, el conocimiento existente acerca del Cd(II) es mucho mayor que para el Cr(VI).

De modo general, se sabe que la branquia representa alrededor de la mitad del área total del cuerpo (Hughes, 1984) y es el sitio más importante en la ionoregulación, transferencia de gases, balance ácido-base y excreción de desechos nitrogenados de los peces (Wood, 1992). A su vez, ésta no sólo es la principal vía de ingreso de los metales al organismo durante exposiciones a través de medio acuático sino que además, en situaciones de exposición aguda, representa el órgano blanco por excelencia (Evans, 1987; Wood *et al.*, 1997).

En particular para el Cd(II), se sostiene que este causa su efecto agudo mediante la inhibición competitiva de la bomba de Ca^{+2} dependiente de ATP ubicada en la membrana basolateral del epitelio branquial (Verbost *et al.*, 1986; Wood, 1992). Este hecho es particularmente importante en los peces dulceacuícolas puesto que son hiperosmóticos respecto al medio circundante y tienden a perder sales constantemente. Para mantener la homeostasis, los minerales deben transportarlos activamente desde el medio hacia el interior del cuerpo. En el caso particular del Ca^{+2} se sabe que ingresa pasivamente a las células del epitelio branquial (principalmente a las Células del Cloro), a través de canales independientes de voltaje selectivos para el Ca^{+2} , siguiendo el gradiente electroquímico producido por el constante bombeo del mineral hacia la sangre mediante una Ca^{+2} -ATPasa ubicada en la membrana basolateral del epitelio branquial, que mantiene las concentraciones intra-citoplasmáticas de Ca^{+2} extremadamente bajas (Flik y Verbost, 1993). La inhibición de dicha bomba, produce una pérdida neta del mineral llevando al individuo a un estado de hipocalcemia (Haux y Larsson, 1984; Reid y McDonald, 1988; Pratap *et al.*, 1989) que lo conduce finalmente a la muerte (Roch y Maly, 1979).

Para el Cr(VI) no se ha hallado una explicación certera acerca de los posibles mecanismos causantes de los efectos letales agudos que se encuentre ampliamente aceptada como para el Cd(II). Puesto que, como se mencionara en el Capítulo I, el Cr(VI) en medio acuoso se encuentra conformando oxianiones (ej. CrO_4^{-2} , $\text{HCr}_2\text{O}_7^{-}$, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$) y no un catión como el Cd(II), ha de suponerse que los mecanismos mediante

los cuales cause sus efectos tóxicos debieran ser diferentes. En principio, se ha atribuido la mayor toxicidad del Cr(VI) respecto al Cr(III) a su mayor biodisponibilidad y reactividad. Ello se explicaría por un lado, por su alta solubilidad y porque los oxianiones que forma son isoestructurales con el sulfato y fosfato, y por consiguiente pueden ingresar fácilmente a la célula a través de los canales aniónicos de sulfatos o fosfatos, y por el otro porque el Cr(VI) es un fuerte agente oxidante que intracelularmente sufre rápidamente una serie de reducciones, pasando por especies intermediarias como Cr(V), Cr(IV) con la generación de radicales libres, para finalmente alcanzar la forma más estable, el Cr(III) (Wetterhahn, 1979; Wiegand *et al.*, 1985; Ottenwälder y Wiegand, 1988). Una gran variedad de efectos se le han atribuido al Cr(VI) ya sea por la generación de radicales libres vinculados al proceso de oxidorreducción, o por la capacidad de coordinarse con macromoléculas como el ADN o proteínas al final de aquel proceso (ver Capítulo I). De todos los efectos mencionados en la bibliografía, derivados de alguno de los dos mecanismos básicos antes descritos, el que probablemente pueda relacionarse mejor con los efectos letales agudos en peces es la capacidad de inhibir a las diferentes ATPasas branquiales (Thanker *et al.*, 1996) interfiriendo así en los mecanismos de ionoregulación e incluso del equilibrio ácido-base. De todos modos es evidente que un mayor número de estudios son necesarios para dilucidar los posibles mecanismos que conducen a los efectos letales agudos que, como se ha observado, el Cr(VI) causa en los peces.

Si bien, como se ha señalado precedentemente, el desarrollo de metodologías para el estudio de los efectos letales agudos data ya de casi un siglo, y que algunos de los mecanismos de acción del Cd(II) y el Cr(VI), vinculados a estos efectos en peces, se han dilucidado desde hace ya más de cincuenta años, aún para *O. bonariensis*, una de las especies de peces dulceacuícolas de mayor relevancia socio-económica de la región pampeana, investigaciones tan básicas como el estudio sobre su sensibilidad a exposiciones agudas de estos metales, su dependencia a parámetros fisicoquímicos del agua (pH, T^o, dureza, COD) o biológicos (edad, origen) o su relación con el tiempo de exposición, no han sido difundidas previo al inicio de este trabajo.

VI.b Objetivos particulares

Conciente de lo esencial que resulta el conocimiento sobre los efectos letales agudos de una sustancia para caracterizar su toxicidad, previo a otros estudios como por ejemplo sobre sus efectos subletales, debido la inexistencia de dicha información básica para la especie estudiada, reconociendo metodologías ampliamente aceptadas para su evaluación y considerando los antecedentes publicados, se plantean como objetivos particulares del presente capítulo:

- Describir e interpretar el patrón de mortalidad de los pejerreyes en función de la concentración del Cd(II) y Cr(VI) en el agua, el tiempo de exposición, la edad de los organismos y la dureza del agua.
- Establecer los niveles de incipencia para los estadios más "sensible" y tomarlo como referencia para definir las concentraciones a ensayar durante los estudios para evaluar efectos subletales.
- Determinar la sensibilidad relativa de la especie al Cr y Cd en comparación a la de otras especies de peces.

El presente capítulo se organiza partiendo de la descripción de las metodologías utilizadas para determinar los efectos letales agudos del Cd(II) y el Cr(VI) en el pejerrey, siguiendo con la presentación de los resultados obtenidos y su discusión para cada uno de los metales y finalizando con la exposición de las conclusiones alcanzadas.

VI.c Materiales y métodos

VI.c.1. Bioensayos de toxicidad aguda

Para cada uno de los metales, se realizaron ensayos de toxicidad aguda empleando organismos de dos edades diferentes (14 y 30 d), en agua dura y agua blanda (USEPA, 1993). Todos los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en condiciones normalizadas (USEPA, 1993; APHA-AWWA-WEF, 1998). Las condiciones generales de ensayo se resumen en la Tabla VI.1.

Tabla VI.1. Resumen de las Condiciones Experimentales Empleadas en los Ensayos de Toxicidad Aguda

| | |
|------------------------------------|---|
| Tipo de ensayo | Estático con renovación. |
| Duración | 24, 48, 72 y 96h. |
| Punto final del ensayo | LC ₅₀ |
| Criterio de aceptación | Mortalidad en los controles ≤ 10%. |
| Edad de los organismos | 15 o 30d (provenientes del mismo desove) |
| Agua de dilución | Agua corriente declorinada y filtrada a través de carbón activado (agua dura) o agua potable comercial Chispal® (agua blanda). |
| Solvente de vehiculización | No |
| Nº de concentraciones | 5, más controles. |
| Nº de organismos por recipiente | 10 |
| Nº de organismos por concentración | 30 |
| Material del recipiente de ensayo | Polipropileno |
| Volumen del recipiente de ensayo | 250 mL |
| Volumen de ensayo | 200 mL |
| Renovación del medio | Cada 48h |
| Limpieza del recipiente | No |
| Alimentación | 0,2 mL de concentrado de nauplii de <i>Artemia</i> sp. de 24h previo a comenzar el ensayo y 2h antes del recambio de agua de las 48h. |
| Calidad de luz e intensidad | 550-1050 lux (50-100 ft-c) |
| Fotoperíodo | 16 Luz:8 Oscuridad |
| Aireación | No |

En cada ensayo se utilizaron un total de 180 individuos, obtenidos y mantenidos de acuerdo a lo descrito en el Capítulo IV. El diseño experimental utilizado consistió en 5 concentraciones diferentes para cada metal más un grupo control, las exposiciones se ensayaron por triplicado utilizando 10 individuos por réplica. El punto final evaluado fue la mortalidad que se registró cada 24 h durante un período máximo de exposición de 96 h. Se consideró a un individuo muerto cuando no se detectó movimiento opercular.

Los ensayos realizados fueron de tipo estáticos con renovación de las soluciones cada 24 h. Los recipientes utilizados en las experiencias fueron de plástico con un volumen total de 250 ml y un volumen de ensayo de 200 ml. Los mismos se dejaron estabilizar con la solución de ensayo 24 h previas al experimento. Los organismos fueron alimentados con 0,5 ml de *Artemia* sp. concentrada 2 h antes de comenzar el ensayo y previo al recambio de agua correspondiente a las 48 h de exposición.

La temperatura, condiciones de iluminación y fotoperíodo empleadas se describen en el Capítulo III.

VI.c.2. Reactivos, calibración, controles de calidad, cálculos y métodos estadísticos

VI.c.2.1. Agua de ensayo.

En los ensayos realizados con agua dura (255,3 mg CaCO₃/L) se utilizó agua corriente de la zona de Parque Saavedra de la ciudad de La Plata, declorinada y filtrada a través de carbón activado (Tabla III.1.). Para los ensayos realizados en agua blanda (31,4 mg CaCO₃/L), se utilizó agua potable comercial Chispal[®] (Tabla VI.2). La preparación de las soluciones de los metales y la determinación de las muestras de agua se realizaron de acuerdo con lo expuesto en el Capítulo III.

Tabla VI.2. Características fisicoquímicas del agua potable comercial utilizada en los ensayos de toxicidad aguda.

| Parámetro | Valor |
|----------------------------|-------|
| Sólidos disueltos totales* | 120,0 |
| Sulfatos* | 5,0 |
| Nitratos* | 10,0 |
| Hierro* | 0,1 |
| Fluor* | 0,1 |
| Calcio* | 10,3 |
| Magnesio* | 1,4 |
| Sodio* | 31,2 |
| Bicarbonato* | 30,0 |
| pH | 7,2 |
| Dureza | 31,4 |
| Alcalinidad | |
| T° | 22±1 |

* datos provistos en el envase por la empresa; concentraciones expresadas en mg/L; dureza y alcalinidad expresadas como mg CaCO₃ /l temperatura en °C.

VI.c.2.2. Criterio de aceptación y cálculo de las LC50(t).

El criterio de aceptación adoptado para los ensayos consideró una mortalidad de 10% o menor en el grupo control. La estimación de las LC50 y de las pendientes de la función dosis respuesta transformada para la 24, 48, 73 y 96 h de exposición, se obtuvo por el método Probit (Finney, 1971) utilizando un programa específico (Probit; US EPA version 1.5). Sólo se consideraron como definitivos, aquellos ensayos que cumplieran con el criterio de aceptación y con el requisito exigido por el análisis Probit de poseer al menos dos concentraciones con mortalidades entre 0 y 100%.

VI.c.2.3. Relación entre la toxicidad aguda y la dureza del agua –modelo empírico.

La relación entre los valores de la LC50₍₉₆₎ con la dureza del agua se obtuvo empíricamente ajustando una función lineal a los datos obtenidos de relacionar el logaritmo natural de los valores de LC50₍₉₆₎, estimados a partir del método Probit, y el logaritmo natural de la dureza del agua (USEPA, 2000).

VI.c.2.4. *Relación entre la toxicidad aguda y el tiempo de exposición – modelo mecanicístico.*

La relación entre las LC50 en función del tiempo se obtuvo ajustando a los valores de LC50_(t) estimadas para las 24, 48, 72 y 96h de exposición, un modelo mecanicístico derivado a partir del modelo de bioacumulación descrito en el Capítulo V (basado en reacciones de primer orden y un compartimiento) con una pequeña modificación. Dicha adaptación consistió en considerar que, debido a lo relativamente alto de las concentraciones que causan los efectos letales, la incorporación del tóxico ya no depende linealmente de ésta (reacciones de primer orden) sino que, como se desprende de las "isotermas de Freundlich" (Newman y Unger, 2003), es función de la concentración del metal en el agua elevado a una potencia igual a 1/n, donde n es una constante empírica. Cuando la concentración pasa determinado nivel, la branquia comienza a "saturarse" y n será entonces un valor > 1.

La deducción del modelo para describir la relación entre la toxicidad aguda del Cd(II) y Cr(VI) en función del tiempo se basó en los siguientes supuestos:

- i) la branquia es el órgano blanco por excelencia durante los procesos de toxicidad aguda causados por exposición a metales pesados a través del agua, (Evans, 1987; Wood, 1992; Bergman y Dorward-King, 1997).
- ii) la toxicidad del metal está directamente vinculada a los niveles del mismo en el tejido (Mancini, 1983; Neely, 1984; Chew y Hamilton, 1985; Meyer, 1999)

En consecuencia puede describirse a la branquia como un modelo de una caja (Figura VI.2) donde:

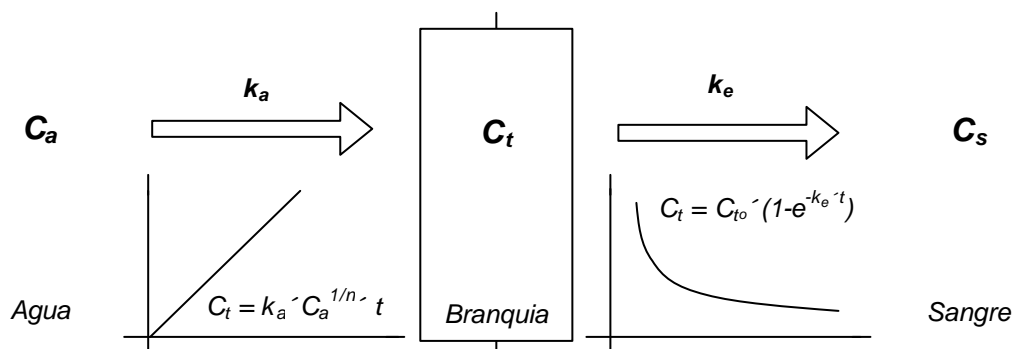


Figura VI.2. Modelo de una caja utilizado para describir el proceso de bioacumulación en la branquia para luego derivar la relación entre los valores de LC50 y el tiempo de exposición.

Ca: Concentración del metal en el agua; *Ct:* concentración del metal en el tejido; *ka:* tasa de acumulación; *Cs:* concentración en la sangre; *ke:* tasa de eliminación. Adaptado de Newman (2002)

- i) la incorporación del tóxico ya no se considera como una reacción de primer orden sino como función de una potencia igual a $1/n$ de acuerdo a las "isotermas de Freundlich" (Newman y Unger, 2003) de acuerdo a la ecuación:

$$X/M = C_t = k_a \times C_a^{1/n} \quad (VI.1)$$

donde: X = cantidad adsorbida [mg]; M = masa de adsorbente [g] ; C_t = concentración del metal en el tejido; k_a = tasa de adsorción o en este caso en particular de acumulación del metal; n = constante empírica; C_a = concentración del metal en el agua.

- ii) la eliminación del metal es descripta como una reacción de primer orden (con tasa constante) que sólo depende de la concentración del metal en el tejido y dada por la ecuación:

$$dC_t/dt = -k_e \times C_t \quad (VI.2)$$

donde: C_t = concentración del metal en el tejido; t = tiempo; k_e = tasa de eliminación.

La velocidad a la que el metal se acumula será el resultado de la diferencia entre la velocidad de acumulación y la velocidad de eliminación del metal dada por la sustracción de la ecuación (VI.2) a la ecuación (VI.1) obteniéndose la ecuación resultante:

$$dC_t/dt = k_a \times C_a^{1/n} - k_e \times C_t \quad (VI.3)$$

La bioacumulación se obtiene al integrar la ecuación (VI.3) y quedará dada por la expresión:

$$C_t = (k_a / k_e) \times C_a^{1/n} \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad (VI.4)$$

Si ahora, la ecuación (VI.4) se reordena despejando C_a y se considera que la concentración en la branquia es constante al alcanzar el 50% de mortalidad (concentración crítica, CC) e independiente del tipo de agua (Borrmann, 1983; Pagenkopf, 1983; Meyer, 1999; Meyer *et al.*, 1999) obtenemos la expresión:

$$C_a = [CC/[(k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t})]]^n \quad (VI.5)$$

En particular cuando $C_a = LC50_{(t)}$, la expresión toma la forma:

$$LC50_{(t)} = [CC/[(k_a/k_e) \times (1 - e^{-k_e \times t})]]^n \quad (VI.6)$$

En consecuencia cuando se hace tender al tiempo a infinito se obtiene el valor de incipencia según la expresión:

$$LC50_{(\infty)} = [CC/(k_a/k_e)]^n \quad (VI.7)$$

Luego, reemplazando (VI.7) en (VI.6) se obtiene la relación entre la concentración que produce 50% de mortalidad para cada tiempo de exposición según la ecuación:

$$LC50_{(t)} = LC50_{(\infty)} / (1 - e^{-k_e \times t})^n \quad (VI.8)$$

En el caso particular de los datos experimentales obtenidos en este estudio los valores de "n" fueron siempre cercanos a 2, por tal motivo para simplificar la ecuación se le asignó éste valor. En consecuencia la ecuación deducida es:

$$LC50_{(t)} = LC50_{(\infty)} / [1 - e^{-(k_e \times t)}]^2 \quad (VI.9)$$

donde:

$LC50_{(t)}$ = Concentración letal 50 al tiempo de exposición t; [mg/L]

$LC50_{(\infty)}$ = Valor de incipencia (Sprague, 1969); [mg/L]

k_e = Tasa de eliminación [h^{-1}]

t = Tiempo de exposición [h]

VI.c.2.5. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los diferentes ensayos se realizaron por medio de análisis de la varianza (ANOVA) univariado y a posteriori la prueba de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD). La comparación entre pendientes se realizó de acuerdo a Zar (1996).

VI.d Letalidad del Cd(II)

VI.d.1. Relación dosis respuesta: $LC_{50(t)}$ y pendientes de toxicidad.

Los niveles letales de toxicidad aguda del Cd (II) para el pejerrey (Tabla VI.3), expresados como valores de LC_{50} , se hallaron en el intervalo que va desde 232 $\mu\text{g Cd(II)/L}$ luego de 24h de exposición en agua dura, a sólo 4 $\mu\text{g Cd(II)/L}$ luego de 96h de exposición en agua blanda. La dureza del agua afectó significativamente la toxicidad del metal, observándose que una reducción de 8,13 veces en la dureza (255,3 a 31,4 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$) produjo una disminución de 8,14 veces en los valores de la $LC_{50(96)}$. Las edades ensayadas no afectaron significativamente la sensibilidad de los organismos al metal durante las primeras 48h de ensayo, pero siempre las edades más tempranas presentaron en promedio valores de LC_{50} marginalmente más bajos. En particular los individuos de 15 días de edad presentaron una tasa de respuesta espontánea mayor, impidiendo la obtención de valores más allá de las 48h (valores faltantes en la Tabla VI.1).

Tabla VI.3. Toxicidad Aguda del Cd(II) para *O. bonariensis*.

Valores de LC_{50} (mg Cd/L) estimados mediante el método Probit.

| E | D | 24 h | | 48 h | | 72 h | | 96 h | |
|----|-------|---------|-------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|
| 15 | 255,3 | 191,7 ± | 7,5 ^a | 54,6 ± | 1,8 ^a | --- | --- | --- | --- |
| 30 | 255,3 | 231,5 ± | 19,7 ^a | 84,6 ± | 7,6 ^a | 57,0 ± | 4,9 ^a | 35,0 ± | 7,1 ^a |
| 30 | 31,4 | 27,0 ± | 1,5 ^b | 11,3 ± | 0,5 ^b | 7,3 ± | 0,3 ^b | 4,3 ± | 0,9 ^b |

Valores de las pendientes de las curvas dosis respuesta estimadas mediante el método Probit.

| E | D | 24 h | | 48 h | | 72 h | | 96 h | |
|----|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| 15 | 255,3 | 2,697 ± | 0,652 | 2,106 ± | 0,728 | --- | --- | --- | --- |
| 30 | 255,3 | 1,559 ± | 1,486 | 6,405 ± | 4,577 | 4,981 ± | 5,314 | 3,522 ± | 3,518 |
| 30 | 31,4 | 1,503 ± | 0,979 | 3,139 ± | 1,835 | 7,053 ± | 0,000 | 3,346 ± | 0,599 |

Los valores representan la media ± el error estandar, n = 3; Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$); E: edad de los organismos (d); D: dureza del agua ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$); 24, 48, 72, 96: tiempos de exposición (h); ---: sin valores.

Los valores de las pendientes de las curvas dosis respuesta ajustadas mediante el método Probit, indicadoras de la amplitud en la distribución de la respuesta letal en la población de los organismos frente al tóxico, no mostraron diferencias significativas en relación con la dureza del agua ni con la edad de los organismos.

Al comparar los valores de $LC50_{(96h)}$ hallados para *O. bonariensis* con los publicados para otras especies de peces observamos que la sensibilidad a la exposición aguda del Cd(II) en las diferentes especie es muy variada. En un trabajo donde se resumen bs valores de $LC50_{(96)}$ estimados por diferentes autores para 27 especies de peces, ajustados a una dureza del agua 50 mg $CaCO_3/L$, se observa que el intervalo de valores de $LC50_{(96h)}$ va desde $<0,5$, a 66.000,0 $\mu g Cd/L$ (USEPA, 2000). Sin embargo, en el citado trabajo es posible distinguir claramente dos grupos de especies, uno más sensible al Cd(II), correspondiente a los salmónidos del género *Oncorhynchus* y al "Striped bass" y otro más tolerante al Cd(II), representado por las especies del género *Lepomis*, *Pimephales* y *Carassius* (Figura VI.1.). De acuerdo a los resultados hallados en el presente estudio, vemos que *O. bonariensis* se ubica en el límite superior del grupo de especies más sensibles al Cd(II) (ver Figura VI.1.).

Particularmente interesante resulta la comparación de la sensibilidad al Cd(II) entre *O. bonariensis* y *Odontesthes regia*, una especie marina que habita las costas chilenas del Océano Pacífico y que está filogenéticamente emparentada con *O. bonariensis*. Los valores de $LC50_{(48)}$ del Cd(II) citados para esta especie (Silva *et al.*, 2001) son en promedio casi mil veces mayores a los de *O. bonariensis*. Estos resultados serían consistentes con i) la idea que sostiene que los las especies dulceacuícolas requieren de mecanismos activos de incorporación de iones para mantener su homeóstasis interna y que el Cd(II) estaría interfiriendo con este proceso particularmente bloqueando los canales de Ca^{+2} (Verboost *et al.*, 1989; Wicklund Glynnn *et al.*, 1994) y por consiguiente causando un mayor efecto nocivo y ii) con el supuesto que la especie más tóxica del metal es la forma catiónica (Pagenkopf, 1983; Playle, 1998) y que en el agua de mar la mayor parte del Cd(II) se encuentra como $CdCl_2$ (Ferguson y Hogstrand, 1998). Resultados muy semejantes a los aquí presentados, donde se manifiesta la reducción de la toxicidad de las formas catiónicas de los metales pesados en el medio marino (hasta tres ordenes de magnitud), han sido observados para la Ag^+ en la trucha arcoiris aclimatadas a agua salada (Ferguson y Hogstrand, 1998).

Con respecto a la relación entre la toxicidad del Cd(II) y la dureza del agua vemos que, para *O. bonariensis*, ésta responde de un modo similar a otras especies (Figura VI.3.). El valor de la pendiente de la recta ajustada al logaritmo natural de las $LC50_{(96)}$ obtenidas en relación al logaritmo natural de los dos niveles de dureza ensayados, es comparable al hallado para otras especies (la pendiente excepcionalmente alta para

Carassius auratus probablemente haya sido sobreestimada, producto del escaso número de observaciones a partir del cual se obtuvo el valor) y a su vez el de estas entre si (USEPA, 2000). Esto indicaría que se trata de una respuesta general, que incluso es observable en invertebrados como los cladóceros del género *Daphnia* sp. (USEPA, 2000). La relación entre la dureza del agua y la $LC_{50(96)}$ hallada empíricamente para *O. bonariensis* es descrita por la función:

$$LC_{50} (\mu\text{g Cd(II)/L}) = e^{(0.98 \cdot \text{Ln [dureza (mg CaCO}_3\text{/L)} - 1.88]}$$

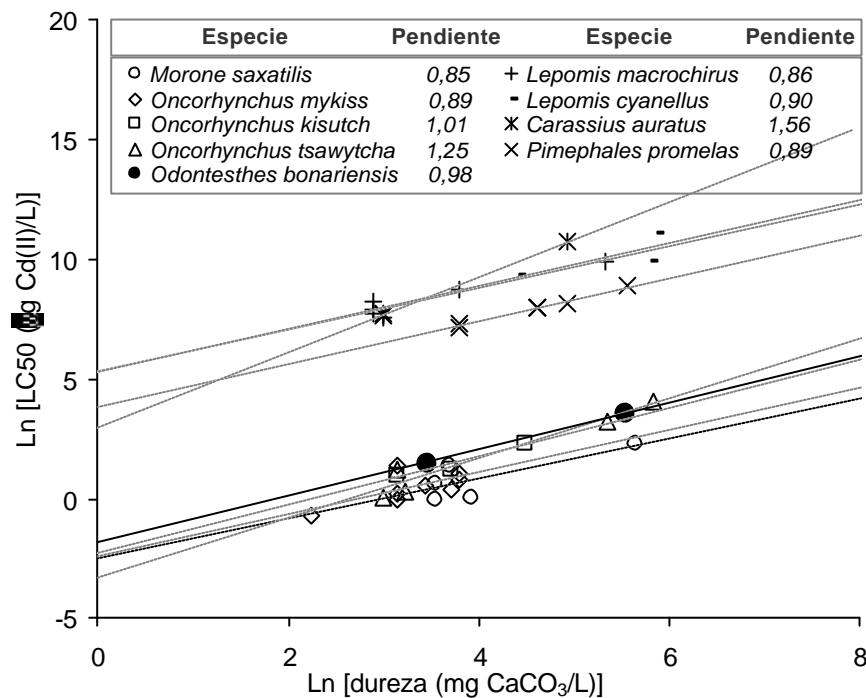


Figura VI.3. Relación entre los valores estimados de LC_{50} del Cd(II) y la dureza del agua para *O. bonariensis* y su comportamiento respecto a la encontrada para otras especies de peces (EPA, 2000).

Símbolos: ver leyenda. Rectas: funciones ajustadas a los valores del logaritmo natural de la $LC_{50(96)}$ en función del logaritmo natural de la dureza del agua, cuyos valores de pendiente se muestran en la leyenda a continuación del nombre de la especie correspondiente. Línea continua: función ajustada a *O. bonariensis*.

VI.d.2. Incipencia: $CL_{50(\text{¥})}$.

El modelo utilizado para describir la dependencia de los valores de LC_{50} con del tiempo de exposición (Figura VI.4.), deducido a partir del modelo de bioacumulación del

metal, se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales y permitió estimar los valores de incipienencia (Tabla VI.4) para los grupos de experiencias realizadas.

La dureza del agua afectó significativamente el valor de incipienencia pero no produjo efectos sobre la tasa de eliminación del tóxico (parámetro k_2 derivado del modelo de bioacumulación). Este hecho, es consistente con el modelo utilizado para describir la cinética de los efectos letales agudos, puesto que de acuerdo a la bibliografía existe clara evidencia sobre el efecto competitivo entre el Ca^{+2} y el Cd (II) por los sitios de unión de la branquia (Verboost *et al.*, 1989; Wicklund Glynnn *et al.*, 1994) que lleva a una reducción de la acumulación del metal con el aumento de dureza del agua, pero no hay pruebas que ésta modifique la tasa de eliminación del metal.

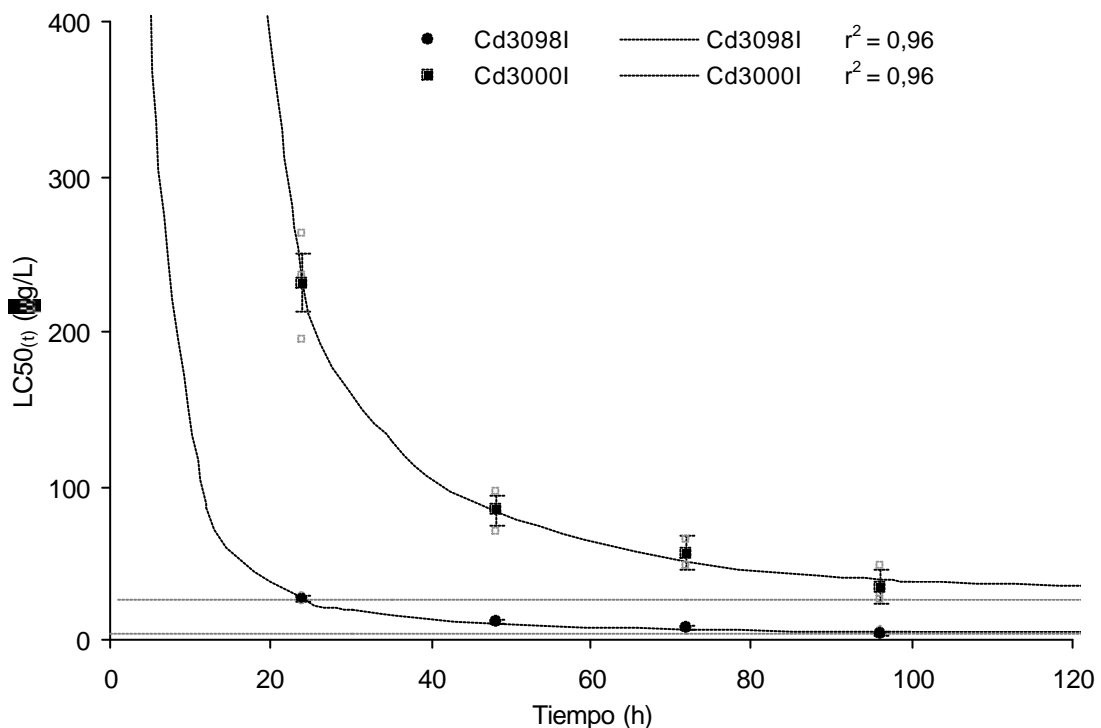


Figura VI.4. Relación entre los valores estimados de LC50 para el Cd(II) en *O. bonariensis* y el tiempo de exposición.

Cd3098I: grupo experimental correspondiente a alevines de 30d expuestos a Cd en agua "blanda" (30 mg CaCO_3/L); *Cd3000I*: grupo experimental correspondiente a alevines de 30d expuestos a Cd en agua "dura" (255 mg CaCO_3/L); las figuras geométricas negras indican los valores promedio de $\text{LC50}(t)$ obtenidos experimentalmente con sus respectivos límites de confianza del 95% (barras). Las curvas representan los valores estimados por el modelo que describe la relación entre los valores de LC50 en función del tiempo; las líneas horizontales indican los valores de incipienencia ($\text{LC50}(\infty)$) estimados y r^2 el coeficiente de determinación para cada grupo experimental.

El efecto de la edad de los individuos sobre los parámetros del modelo, no pudo ser analizado debido a la elevada tasa espontánea de mortalidad presentada por los individuos de 15 días de edad que impidió obtener los valores de LC50 más allá de las 48h de exposición.

Tabla VI.4. Parámetros del modelo utilizado para describir la dependencia de los valores de LC50 del Cd(II) para *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

| E | D | r^2 | LC50 _(∞) | | k_e | |
|----|-------|-------|---------------------|-------------------------------|-------|-----------------|
| 30 | 255,3 | 0,956 | 26,023 | (7,284 - 44,761) ^a | 0,017 | (0,009 - 0,024) |
| 30 | 31,4 | 0,961 | 4,212 | (2,187 - 6,236) ^b | 0,021 | (0,013 - 0,027) |

E: edad de los organismos (d); D: dureza del agua (mgCaCO₃/L); r^2 : coeficiente de determinación; LC50_(∞): valor de incipiente expresado en mg/L; k_e : tasa de eliminación. Los valores representan la media y el intervalo de confianza del 95%. Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$);

VI.e Letalidad del Cr(VI)

VI.e.1. Relación dosis respuesta: LC50_(t) y pendientes de toxicidad

Los niveles letales agudos del Cr(VI) para *O. bonariensis* (Tabla VI.5.) se encontraron en el intervalo comprendido entre 34.924,3 y 1.523,3 µg Cr(VI)/L, en exposiciones de 24 h y 96 h respectivamente. La dureza del agua afectó levemente, pero de manera significativa (ANOVA, $p < 0,05$), los valores de LC50 a partir de las 72 h de exposición, observándose una reducción de la LC50 con la disminución de la misma. La sensibilidad de *O. bonariensis* al Cr(VI) se vio afectada significativamente por la edad de los organismos luego de las 72 h de exposición, siendo los individuos de 15 d los más sensibles.

Las pendientes de las curvas dosis respuesta no fueron afectadas significativamente por el tiempo de exposición, la dureza del agua ni la edad de los organismos, indicando que la respuesta de la población de organismos frente al tóxico no se vio modificada por ninguno de los factores mencionados.

Tabla VI.5. Toxicidad Aguda del Cr(VI) para *O. bonariensis*

Valores de LC50 (mg Cr/L) estimados mediante el método Probit.

| E | D | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|----|-------|------------------|------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 15 | 255,3 | 34924,3 ± 2833,8 | 9009,0 ± 2024,5 | 2664,7 ± 510,4 ^a | 1523,3 ± 339,7 ^a |
| 30 | 255,3 | 31066,1 ± 2742,9 | 13548,3 ± 2419,7 | 7972,3 ± 969,8 ^b | 5470,3 ± 1080,0 ^b |
| 30 | 31,4 | 34563,3 ± 2331,7 | 10367,3 ± 1295,7 | 4442,7 ± 1759,7 ^{a,b} | 1988,7 ± 256,9 ^a |

Valores de las pendientes de las curvas dosis respuesta estimadas mediante el método Probit.

| E | D | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|----|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 15 | 255,3 | 2,679 ± 7,949 | 2,666 ± 6,221 | 1,461 ± 0,499 | 1,293 ± 0,870 |
| 30 | 255,3 | 2,757 ± 2,290 | 2,707 ± 1,794 | 2,327 ± 1,389 | 2,929 ± 2,194 |
| 30 | 31,4 | 7,184 ± 4,120 | 2,199 ± 1,838 | 1,431 ± 0,293 | 1,542 ± 1,177 |

Los valores representan la media ± el error estandar, n = 3; Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$); E: edad de los organismos (d); D: dureza del agua (mg CaCO₃/L); 24, 48, 72, 96: tiempos de exposición (h).

Al comparar la sensibilidad de *O. bonariensis* al Cr(VI) respecto a la de otras especies encontramos que a diferencia de lo ocurrido con el Cd, el intervalo de valores de LC50₍₉₆₎ encontrados en la bibliografía para del Cr(VI) en peces es menos amplio, ubicándose todos los valores encontrados en la bibliografía en el mismo orden de magnitud. A modo de ejemplo algunos valores de LC50_(96h) hallados para diferentes especies de peces fueron: para *Lepomis gibbosus* entre 7.460 (Turnbull *et al.*, 1954) a 17.000 µg Cr(VI)/L (Rehwoldt *et al.*, 1972), para *Cyprinus carpio* van desde 93.600 µg Cr(VI)/L (Rehwoldt *et al.*, 1972) a 14.300 (Al Akel y Shamsi, 1996) y para *Pimephales promelas* entre 37.000 a 52.000 (Ruesink, 1975) y 39.000 µg Cr(VI)/L (Dorn *et al.*, 1993). Como puede observarse, según los resultados obtenidos en este estudio, la sensibilidad del pejerrey al Cr(VI) se encuentra ubicada en el extremo inferior del intervalo demarcado por los estudios previamente citados. Particularmente interesante resulta comparar el valor de LC50_(48h) para el Cr(VI) hallados para *Odontesthes regia* (31.190 ± 35.33 µg Cr(VI)/L media ± desvío estándar; Silva *et al.*, 2001), estos valores son aproximadamente el doble de los hallados para *O. bonariensis*, indicando nuevamente la mayor sensibilidad de la especie dulceacuícola debido a los mecanismos activos para mantener la homeostasis y avalando la idea que el Cr(VI) podría ingresa a la célula a través de los canales aniónicos de sulfatos o fosfatos (Wetterhahn, 1979; Wiegand *et al.*, 1985; Ottenwälder y Wiegand, 1988).

VI.e.2. Incipienencia: $LC50_{(Y)}$.

El modelo utilizado para describir la variación de los valores de $LC50$ en función del tiempo (Figura VI.5.) se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales (Tabla VI.6.). de acuerdo a los resultados obtenidos se observa que tanto la dureza del agua como la edad de los organismos afectó significativamente los valores de (k_e) y $LT50_{(\infty)}$.

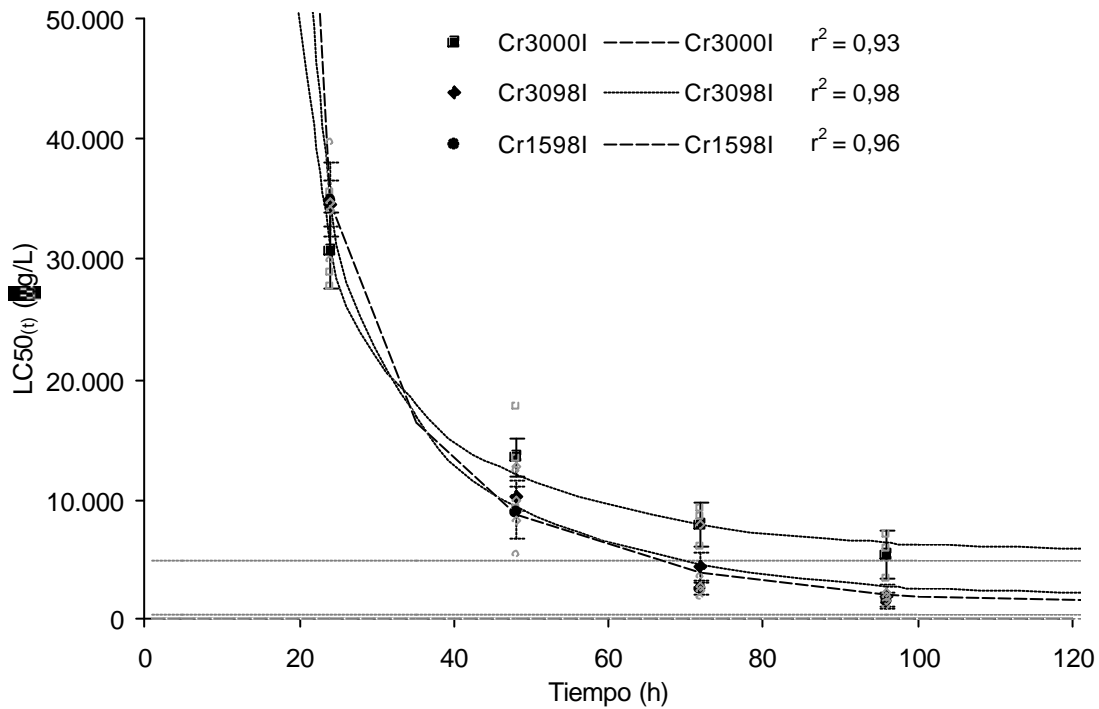


Figura VI.5. Relación entre los valores estimados de $LC50$ para el $Cr(IV)$ y el tiempo de exposición en *O. bonariensis*.

Cr3000I: grupo experimental correspondiente a alevines de 30d expuestos a Cr en agua "dura" ($255 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$); *Cr3098I*: grupo experimental correspondiente a alevines de 30d expuestos a Cr en agua "blanda" ($30 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$); *Cr1598I*: grupo experimental correspondiente a alevines de 15d expuestos a Cr en agua "dura" ($255 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$); as figuras geométricas negras indican los valores promedio de $LC50_{(t)}$ obtenidos experimentalmente con sus respectivos límites de confianza del 95% (barras). Las curvas representan los valores estimados por el modelo que describe la relación entre los valores de $LC50$ en función del tiempo; las líneas horizontales indican los valores de incipienencia ($LC50_{(Y)}$) estimados y r^2 el coeficiente de determinación para cada grupo experimental.

Los individuos de 30 días expuestos en agua dura presentaron una tasa de eliminación (k_e) y valores de $LT50_{(\infty)}$ significativamente mayor a los expuestos en agua blanda y a los individuos de 15d de vida. Estos resultados indican que los individuos con una mayor capacidad de depuración pueden sobrevivir a concentraciones más elevadas del metal.

Sin embargo puesto: i) que de acuerdo con el modelo de bioacumulación utilizado la eliminación del metal sólo depende de su concentración en el tejido, o sea que k_e no debiera modificarse en función de las características del agua, ii) que los datos experimentales se ajustaron satisfactoriamente al modelo y iii) que los organismos con k_e semejantes, aunque poseen edades distintas, pertenecen al mismo lote mientras que aquellos que difirieron en los valores de k_e provinieron de lotes distintos, entonces debiera suponerse entonces que la diferencia hallada en los valores de k_e estuviera relacionada con características intrínsecas de cada población de organismos (probablemente a nivel genético) más que con la edad o las características del agua. Este hecho resaltaría la importancia de considerar las variaciones de sensibilidad al Cr(VI) entre las distintas poblaciones de *O. bonariensis*.

Tabla VI.6. Parámetros del modelo utilizado para describir la dependencia de los valores de LC50 del Cr(VI) para *O. bonariensis* en función del tiempo de exposición.

| E | D | r^2 | LC50 _(∞) | k_e |
|----|-------|-------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 15 | 255,3 | 0,96 | 3,3 (-180,1 - 186,6) ^a | 0,0004 (-0,011 0,011) ^a |
| 30 | 255,3 | 0,99 | 4915,5 (1713,4 - 8117,5) ^b | 0,0211 (0,011 0,031) ^b |
| 30 | 31,4 | 0,97 | 265,0 (-633,7 - 1163,6) ^a | 0,0038 (-0,002 0,010) ^a |

E: edad de los organismos (d); D: dureza del agua (mgCaCO3/L); r^2 : coeficiente de determinación; LC50_(∞): valor de incipencia expresado en mg/L; k_e : tasa de eliminación. Los valores representan la media y el intervalo de confianza del 95%. Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$);

VI.f Conclusiones particulares

Atendiendo a los objetivos particulares planteados para el presente capítulo y a los resultados obtenidos de las experiencias realizadas podemos arribar a las siguientes conclusiones:

- Los niveles de toxicidad letal aguda del Cd y Cr para *O. bonariensis*, de acuerdo a las LC50(96h) estimadas, fueron de 35 y 5470 mg/L respectivamente para individuos de 30 d de edad expuestos en agua dura.
- De acuerdo a la toxicidad letal aguda observada para cada metal podemos afirmar que para *O. bonariensis*,

- el Cd(II) resultó ser, en promedio, unas mil veces más tóxico que el Cr(VI).

Si bien la toxicidad de ambos metales se vio afectada por la dureza del agua, reduciéndose con el aumento de la misma:

- sólo el Cd(II) mostró una relación clara y consistente con la dureza del agua
- para el Cr(VI) las diferencias observadas parecieran deberse principalmente a una diferencia de sensibilidad entre poblaciones de organismos.

Para las edades ensayadas sólo se observó una pequeña tendencia al aumento de la sensibilidad por parte de los organismos más jóvenes. En el caso particular del Cr(VI) fue difícil establecer cuanto del aumento de la sensibilidad se debió a la edad y cuanto al origen de los individuos. En consecuencia:

- de existir diferencias de sensibilidad entre las dos edades ensayadas éstas han de ser muy pequeñas.

Cuando se atiende a la variación de las LC₅₀ estimadas para cada grupo de experiencias en función del tiempo concluimos que:

- la función para describir la relación entre las LC₅₀ y el tiempo de exposición, derivada a partir del modelo de bioacumulación, se ajustó muy satisfactoriamente a los datos experimentales.

La expresión general obtenida para describir la relación entre la LC₅₀ y el tiempo fue:

- $LC_{50(t)} = LC_{50(\infty)} / (1 - e^{-k^2 t})^2$

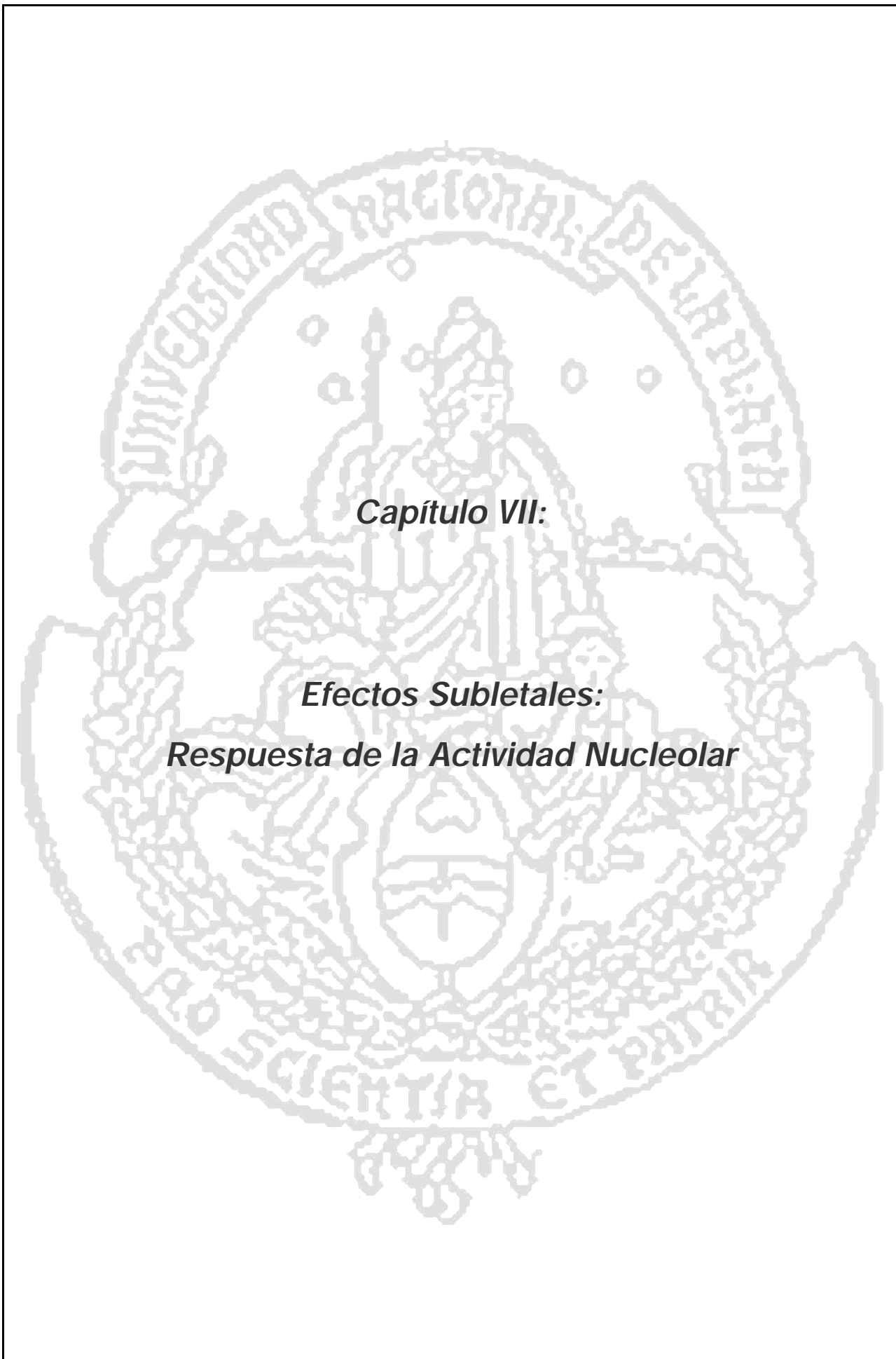
en particular para cada uno de los metales ensayados, las ecuaciones que describieron el comportamiento de las LC₅₀ en función del tiempo, para el Cd(II) y Cr(VI) en agua dura, respectivamente, fueron:

- $LC_{50(t)} = 26,02[\mu\text{g Cd/L}] / (1 - e^{-0,017[1/h]^*t[h]})^2$

- $LC_{50(t)} = 4915,5[\mu\text{g Cr/L}]/(1 - e^{-0.021[1/h]^t[h]})^2$
- Respecto al establecimiento del estadio más sensible, si bien los alevines de 15d fueron ligeramente más susceptibles que los de 30d frente a ambos tóxicos, las diferencias no siempre fueron significativas y además la tasa de respuesta espontánea fue notablemente mayor en los alevines de menor edad, aumentando la variabilidad en los resultados obtenidos o directamente obligando a descartar parte de los ensayos realizados. En consecuencia desde el punto de vista práctico y considerando su posible utilización como posible especie diagnóstica en bioensayos de toxicidad:
 - se recomienda el empleo de organismos de 30d, puesto que la sensibilidad no se reduce sustancialmente, asegurando el éxito del ensayo debido a la mejor supervivencia en los controles, arrojando resultados con mayor grado de reproducibilidad.

Para el caso particular del presente estudio donde se intentó demarcar un límite entre las concentraciones que produce efectos letales y subletales, seleccionó como tal demarcación a los valores de incipiente obtenidos para cada metal a partir de los ensayos realizados con los individuos de 30d en agua corriente. Así:

- los valores umbral de concentración establecidos para la evaluación de efectos subletales fueron 26,02 (7,28 - 44,76) y 4915,51 (1713,45 - 8117,57) $\mu\text{g/L}$ para el Cd(II) y el Cr(VI) respectivamente.
- Finalmente, comparando la sensibilidad del pejerrey frente a los dos metales estudiados, respecto a los valores de toxicidad aguda publicados para otras especies de peces podemos afirmar que:
 - *O. bonariensis* es una especie sensible al Cd(II), presentando una sensibilidad equivalente a la de los salmónidos.
 - *O. bonariensis* mostró una alta sensibilidad al Cr(VI) ubicándose en el límite inferior del intervalo presentado por la mayoría de las especies consultadas.



Capítulo VII:

Efectos Subletales:

Respuesta de la Actividad Nucleolar

Capítulo VII. Efectos Subletales: Respuesta de la Actividad Nucleolar

VII.a Introducción al capítulo

El nucleolo es la estructura más evidente en el núcleo de las células eucariotas y, prácticamente, la única visible *in vivo*, característica que condujera a que ya en 1781, Fontana, lo describiera por vez primera como "...une tache dans son milieu" y que a partir de Schwann (1939) se le acuñara el nombre de nucleolo o corpúsculo nuclear (Grundman, 1967). Tan notable estructura llamó tempranamente la atención de los primeros citólogos de tal modo que en una revisión realizada en 1898 ya se pudieron citar unas 700 referencias, ya en la década de 1940 se había demostrado su composición, rica en ARN y proteínas, y finalmente en los años 60 se descubrió su función principal vinculada a la síntesis de ARN ribosómico y en el ensamblaje de los ribosomas (Alberts *et al*, 1996). A pesar de esto, a más de 200 años de su primera descripción, aún continúan sorprendiéndonos nuevos descubrimientos y son muchas las incógnitas acerca de su composición, estructura, múltiples funciones y sobre las relaciones con otras estructuras nucleares que no han encontrado respuesta.

Al microscopio óptico, la mayoría de las veces el nucleolo se presenta como uno o varios corpúsculos de forma prácticamente esférica (también puede presentarse de forma irregular) situados en el centro o también en la periferia del núcleo. El nucleolo presenta una fuerte basofilia producto del abundante contenido de ARNr (Geneser, 1988) y una marcada argirofilia debido a la abundante cantidad de proteínas Ag-NOR positivas, como lo son las fosfoproteínas no ribosómicas: nucleolina (Nrs1p) y nucleofosmina (B23/NO38) (Howell, 1982). A menudo, puede hallarse rodeado de un anillo basófilo, Feulgen positivo, formado por la denominada *cromatina asociada al nucleolo* (Geneser, 1988) y que en un principio fuera erróneamente interpretado como una membrana nucleolar (Grundman, 1967). A nivel microscópico, se ha observado que el tamaño del nucleolo refleja su actividad y por ello varía notablemente en los diferentes tipos celulares y puede variar dentro de una misma célula, y tales diferencias son atribuidas a variaciones del componente granular, que se supone estaría regulado a nivel de la transcripción génica (Alberts *et al.*, 1996). Así por ejemplo se observan nucleolos especialmente grandes en células con gran síntesis proteica, como células

de tejido embrionario, nervioso o secretor de proteínas, ó puede ser muy reducido o estar ausente en células que no sintetizan proteínas como los espermatozoides maduros (Geneser, 1988). El número de nucleolos que puede poseer una célula en interfase depende de varios factores. i) En primer lugar, de la constitución génica de la especie que se trate, esto determinará el número máximo de nucleolos posibles que dependerá del número de cromosomas que contengan copias de los genes que codifican para el ARNr y que conforman las regiones organizadoras del nucleolo (NOR), y de la ploidía (Alberts *et al.*, 1996)). ii) Luego, del momento del ciclo celular en que se encuentre, ya que en cada división celular los cromosomas se segregan, con ellos las NOR (Anastassova-Kristeva, 1977) y por consiguiente cuanto mayor el índice mitótico mayor será la probabilidad de hallar las NOR separadas y por lo tanto mayor el número de nucleolos que se observarán. iii) Finalmente, del número de cromosomas que posean NOR activas y del grado de fusión de las NOR provenientes de diferentes cromosomas (Geneser, 1988). A su vez, estos factores variarán según la especie, el momento del desarrollo y el programa de diferenciación genética que posea la célula de cada tejido en particular, además de los factores exógenos que pudieran condicionar los anteriores.

El advenimiento de la microscopía electrónica, permitió incrementar considerablemente los conocimientos acerca de la morfología del nucleolo. Así, quedó claramente establecido que el nucleolo es un dominio nuclear (Mosgoeller *et al.*, 1996) que carece por completo de una membrana que lo delimite y que se encuentra conformado por tres componentes parcialmente diferenciadas: i) uno débilmente contrastado, el *centro fibrilar*, que contiene DNA que no está siendo transcrito activamente, ii) un *componente fibrilar* denso que contiene moléculas de RNA en proceso de transcripción, y iii) un *componente granular*, conformado por los precursores de las partículas ribosomales maduras (Raška, 2003).

A nivel molecular, la composición del nucleolo ha demostrado ser harto compleja. Además de estar constituido por ADN y ARN ribosómicos (ADNr y ARNr), posee una gran cantidad de proteínas que cumplen una variada gama de funciones. Por ejemplo, en un estudio proteómico realizado en el nucleolo de células HeLa se hallaron unas 271 proteínas, de las cuales el 24-22% corresponden a proteínas que se unen a nucleótidos y ácidos nucleicos, 14% a proteínas ribosomales, 9-11% a enzimas modificadoras de ARN y relacionadas, a 8-5% ATPasas dependientes de ARN y

helicadas, 5% a chaperonas, 3,5% a otros factores de transcripción, 11% a proteínas de otro tipo y un 30,5% correspondientes a proteínas completamente desconocidas (Andersen *et al.*, 2002). De todas las proteínas identificadas en el nucleolo, existe un grupo de proteínas no ribosomales que se caracterizan por presentar una argirofilia marcada y que por tal motivo han sido denominadas *proteínas Ag-NOR*. Esta propiedad tintórea les ha conferido un gran protagonismo en los trabajos realizados para estudiar al nucleolo desde el punto de vista de la microscopía. Dos proteínas Ag-NOR, particularmente abundantes en el nucleolo interfásico, son las fosfoproteínas ácidas *Nucleolina* (C23/Nsr1p) y *Nucleofosmina* (B23/NO38).

La nucleolina es la más abundante de las proteínas Ag-NOR (Lapeyre *et al.*, 1987) y presenta una masa molecular cercana a los 100 kDa y un pI próximo a 5. Por ejemplo en humanos (células HeLa) posee una masa molecular de 105 kDa y pI de 5,1 y en células de hámster chino (células CHO) estos parámetros son 100 kDa y 5,3 (Roussell y Hernández-Verdun, 1994). En la carpa (*Cyprinus carpio*), presenta un peso molecular de aproximadamente 85 kDa y posee una estructura organizada en dominios funcionales bien definidos que cumplen papeles específicos durante las múltiples etapas de la biogénesis de los ribosomas, interviniendo en la modificación, maduración y ensamble de las partículas pre-ribosómicas (Alvarez *et al.* 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que el extremo N-terminal está involucrado en la remodelación de la cromatina (Erard *et al.*, 1988) y procesamiento del pre-ARNr mediada por el snoRNP U3 (Ginisty *et al.*, 1998), la región central interacciona con el pre-ARNr naciente (Serin *et al.*, 1997) y el extremo C-terminal interaccionaría no específicamente con el ARN (Ghisolfi *et al.*, 1992) y con algunas proteínas ribosomales (Bouvert, *et al.*, 1998). El extremo Nterminal de la Nucleolina posee potenciales sitios de fosforilación por las kinasas cdc2 y CK2 (Caizergues-Ferrer *et al.* 1987; Belenger *et al.*, 1990; Peter *et al.*, 1990), mecanismo por el cual se cree regularía la actividad de la Pol I variando su especificidad (Roger *et al.*, 2002; Bouche *et al.*, 1984). Además la nucleolina podría intervenir en la regulación del procesamiento, ensamblado y tránsito de las partículas pre-ribosómicas mediante la modulación su nivel de expresión (Planta *et al.* 1999; Jelinsky y Samson, 1999; Greasley *et al.*, 2000; Boon *et al.*, 2001), fosforilación (Li *et al.*, 1996; Gulli *et al.*, 1997) y tránsito (Jiang *et al.*, 2000). De acuerdo a las funciones principales que le ha sido asignada a esta proteína y a observaciones realizadas por otros autores, sería de esperar que la nucleolina, en cierta medida, se localizara en

relación al componente fibrilar y, en mayor grado, al componente fibrilar denso (Hernandez-Verdun, 1983; Derenzini *et al.*, 1990).

La Nucleofosmina, es otra abundante proteína Ag-NOR que en líneas celulares humanas (HeLA y TG) y de hámster (CHO) presenta dos isoformas conformadas por 294 y 257 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 35-36 y 37-38 kDa (Chang y Olson, 1990; Wang *et al.*, 1994) y un pI de 5,1-5,0 y 5,0-4,9 respectivamente (Liu y Chan, 1993; Roussel y Hernández-Verdun, 1994). La función de la nucleofosmina ha sido principalmente vinculada al ensamble de las partículas pre-ribosómicas, donde actuaría como chaperona (Szebein y Olson, 1999) y también al transporte (tránsito) nucleocitoplasmático, donde actuaría regulando el grado de acumulación de las partículas pre-ribosómicas en el nucleolo (Leary y Huang, 2001). Ultraestructuralmente, la nucleofosmina ha sido localizada en el componente granular (Shaw *et al.*, 1995), que es la región del nucleolo donde los ribosomas son ensamblados y la que presenta mayor variación en función del estado fisiológico de la célula, pudiendo llegar a representar hasta un 60% del volumen nuclear en linfocitos de sangre periférica humana estimulados para proliferar, o verse drásticamente reducida cuando el ciclo celular se ve arrestado (Smetana y Busch, 1974; Shaw *et al.*, 1995).

El mecanismo que induce a la organización y coalescencia de los componentes nucleolares en una estructura morfológicamente definida y altamente dinámica es aún motivo de debate. ¿Es el nucleolo la mera acumulación local de los productos de transcripción alrededor de los genes que codifican para ARNr activos, en un estado de equilibrio dinámico, mantenidos por una multitud de interacciones proteína-proteína y proteína-ARN? ¿O existen además elementos estructurales involucrados? Si bien, el hallazgo de una proteína similar a la espectrina, de función estructural, en los nucleolos de oocitos de anfibios (Carotenuto *et al.*, 1997) ha conducido a pensar en la posibilidad de que proteínas citoesqueléticas podrían estar jugando una función estructural en el nucleolo; estudios recientes apoyarían la idea de que la formación y el mantenimiento de la función de los compartimientos nucleolares es producto de fuerzas de agrupamiento (efectos de volumen de exclusión) causadas por la alta concentración de macromoléculas (Hanckock, 2004). En consecuencia, como titularan Mèlèse y Xue (1995) en su revisión a cerca de este dominio nuclear, podría considerarse al nucleolo, "una organela formada por el acto de construir ribosomas". De aquí es evidente que la estructura nucleolar está completamente supeditada a su actividad y que para

comprenderla es indispensable primero conocer al detalle el funcionamiento de este orgánulo.

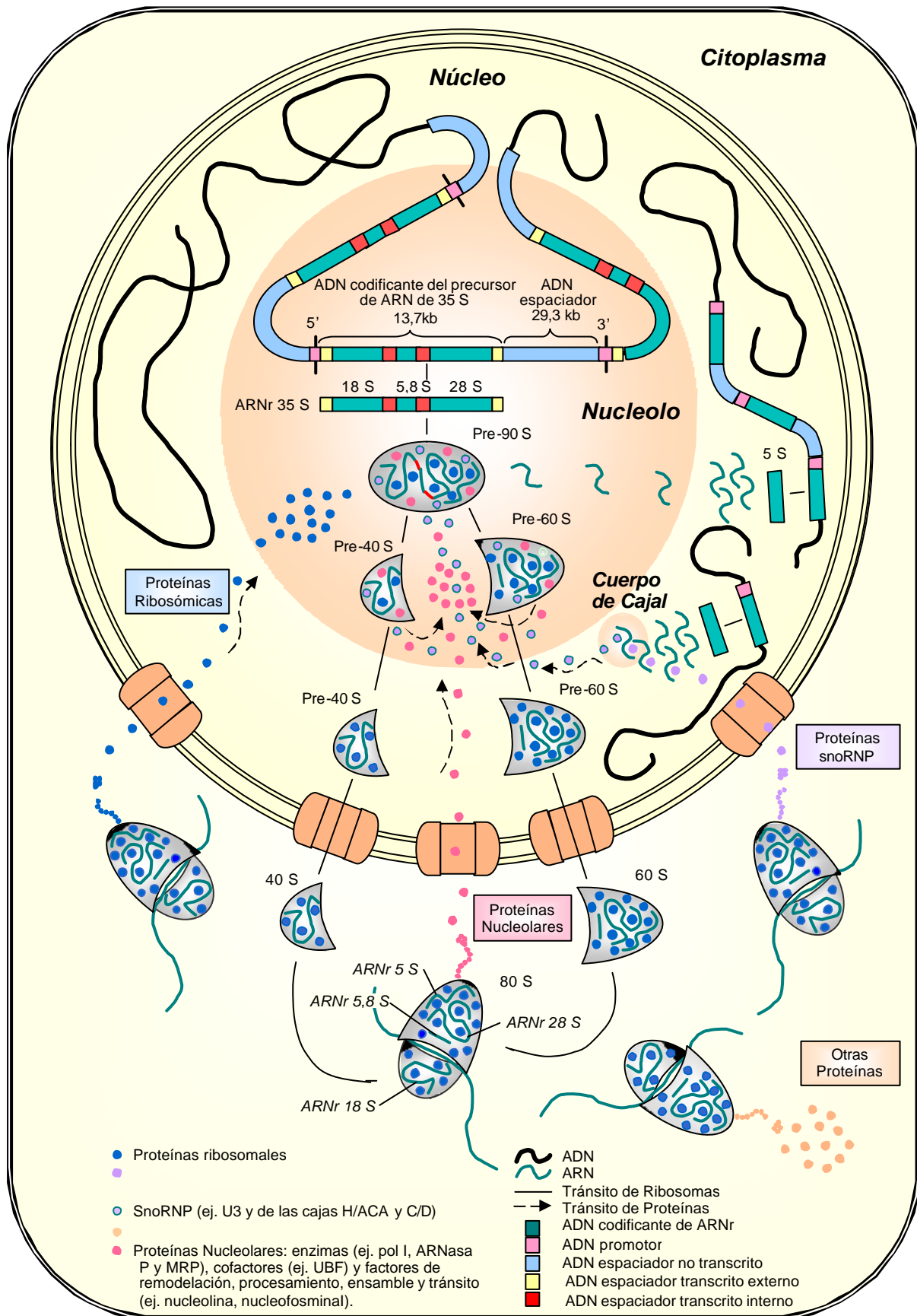


Figura VII.1. Diagrama que resume el estado de conocimiento actual en relación a la biogénesis de los ribosomas y su vinculación con el nucleolo en una célula eucariota.

Últimamente se ha puesto en evidencia el carácter plurifuncional del nucleolo (Schneiter, 1995; Pederson, 1998; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2000) dado el gran número de papeles en los que este orgánulo se ve involucrado, tales como i) la biogénesis y/o maduración de partículas que actúan como señales de reconocimiento (Politz *et al.*, 2000), de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (Lange y Gerbi, 2000) y de telomerasas (Mitchell *et al.*, 1999); ii) el procesamiento y exportación de algunos RNAm y RNAt (Schneiter, 1995; Bertrand *et al.*, 1998); iii) el control de factores de regulación específicos (Visintin y Amon, 2000) y la regulación del envejecimiento celular (Kennedy *et al.*, 1997; Gotta *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1997; Sinclair y Guarente 1997). A pesar de ello; la principal función del nucleolo es la biogénesis de los ribosomas. Este proceso implica: i) el *remodelado del ADNr* llevado a cabo en el centro fibrilar, ii) la *transcripción* de los ARN ribosómicos (ARNr) 28S, 18S y 5,8S que ocurre en el límite entre el centro fibrilar y el componente fibrilar denso, y será la responsable de ir generando este último, iii) la *maduración*, dada por el procesamiento y plegamiento de los tres transcritos de ARNr anteriores y el transcrito de ARNr 5S (sintetizado en otro sector del núcleo, fuera del nucleolo) su ensamblado con las proteínas ribosomales para conformar las subunidades pre-ribosómicas, constituyentes principales del componente granular y finalmente, iii) la *exportación* de las mismas desde el nucleolo, a través del nucleoplasma, hacia el citoplasma donde se constituirán las partículas ribosomales maduras y funcionalmente activas (Leary y Huang, 2001).

Los genes que codifican para los ARNr y que serán transcritos en el nucleolo se encuentran en regiones perfectamente determinadas de cromosomas específicos, denominadas regiones organizadoras nucleolares (del inglés, NORs). Cuántos y cuáles cromosomas serán portadores de NORs, varía según la especie de que se trate. En los peces se considera un carácter plesiomórfico la presencia de NOR en un único par de cromosomas (Hartley, 1987). *Odontesthes bonariensis* ha conservado esta plesiomorfía, ya que la NOR se encuentra ubicada en el brazo corto de un único par de cromosomas submetacéntricos pequeños (Sola *et al.*, 1988).

Las moléculas de ADN que contienen las NORs en los distintos cromosomas de eucariotas, forman bucles que se entrelazan conformando la base estructural del nucleolo alrededor de las cuales se agregarán el resto de los componentes necesarios

involucrados en la biogénesis de los ribosomas (Figura VII.1.). El ADN_r, posee múltiples copias, organizadas en tándem, de un único gen que codifica para un transcrito de 45S que será sintetizado por la ARN polimerasa I (ARNpol I) y que luego, durante el procesamiento será clivado por ribonucleasas para dar los ARN_r 28S, 18S y 5,8S (Raška, 2003). En humanos, cada gen que codifica para estos ARN_rs se encuentra conformada por un promotor, una porción ADN transcribible (13,7 kb) formada por: i) un ADN espaciador externo inicial, ii) las secuencias codificantes para los ARN_s 18S, 5,8 y 28S separadas entre sí por iii) secuencias de ADN espaciador interno y iv) un ADN espaciador externo final; y por último una porción de ADN espaciador no transcribible (29,3 kb) (Fatica y Tollervey, 2002).

En otra región del núcleo, fuera del nucleolo, se encuentran también organizados en tándem y separados por ADN espaciador no transcrito, los genes que codifican para el ARN_r de 5S y que son transcritos por la ARN polimerasa III. El transcrito 5S migra luego hacia el nucleolo donde es ensamblado junto a los otros tres transcritos con más de 70 proteínas ribosómicas para formar una partícula pre-ribosómica de 90S que luego será clivada en dos partículas pre-ribosómicas, una de menor de 40S (contiene el ARN de 18S) y otra mayor de 60S (contiene los ARN de 28, 5,8 y 5S). Estas seguirán madurando en el camino hacia el citoplasma, donde finalmente se unirán y convertirán en la subunidad ribosómica funcionalmente activa de 80S (Tschochner y Hurt, en prensa). Este proceso requiere además de la intervención de un gran número de factores proteicos no-ribosómicos y de ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (del inglés, sonRNAs). En un análisis proteómico realizado sobre el nucleolo se hallaron al menos 31 diferentes proteínas no ribosómicas vinculadas con la síntesis de los ribosomas (Scherl *et al.*, 2002).

Estudios realizados con marcaje radiactivo mediante pulsos de uridina-³H, han demostrado que el tiempo necesario para que una célula sintetice las subunidades ribosomales pequeñas maduras (40S) es de aproximadamente 30 min, mientras que sintetizar las subunidades mayores (60S) le toma alrededor de una hora (Alberts *et al.*, 1996) y que una célula HeLa en crecimiento es capaz de producir en 1 min alrededor de unas 7500 subunidades ribosómicas (Lewis y Tollervey, 2000)

La regulación de la biogénesis de los ribosomas debe coordinar la expresión/represión y activación/desactivación de un gran número de factores en respuesta a las

necesidades de la célula (Jorgensen *et al.*, 2002). La complejidad inherente a este proceso, ofrece una multitud de puntos de regulación posibles a diferentes niveles de control que, a pesar de los numerosos estudios realizados sobre la determinación de los factores y pasos involucrados en la biogénesis de los ribosomas, ha conducido a que aún no hayan sido completamente dilucidados los mecanismos que la modulan (Leary y Huang, 2001). El conocimiento actual sostiene que la regulación actúa por un lado, a nivel de la transcripción de la polimerasa I y por otro, a nivel del procesamiento, ensamblado y transporte del ARNr. En el primer caso, actuaría modulando los factores que intervienen en el remodelado del ADNr (ej. histonas, nucleolina) y sobre la propia enzima y sus factores de transcripción (ej. UBF, SL-1), en el segundo caso, actuaría controlando las nucleasas, los snoRNP, las helicasas y otros factores como la nucleolina y nucleofosmina (B23/NO38) que intervienen en el procesamiento, ensamblado y tránsito de los ribosomas. Los mecanismos de regulación más comunes que actúan sobre estos factores a los dos niveles de control son: modulación de los niveles de expresión, metilación, acetilación, fosforilación, interacciones proteína-proteína y el transporte hacia el núcleo. Es curioso, pero un mismo mecanismo de control puede actuar algunas veces incrementando la biosíntesis o reduciéndola dependiendo de las circunstancias y el factor sobre el que actúe.

Algunos estudios han demostrado que la regulación a nivel de la *síntesis del ARNr* es un punto de control principal en la biosíntesis de los ribosomas y se ha observado que esta es regulada negativamente en respuesta a la carencia de nutrientes, el grado de diferenciación y la inhibición de la síntesis proteica, mientras que es regulada positivamente en respuesta al suministro de nutrientes o frente a estímulos para el crecimiento o la proliferación celular (Hanna *et al.*, 1998; Grummt 1999; Jacob y Ghosh 1999). Por otro lado, se ha observado que la regulación a nivel de los *componentes involucrados en el procesamiento y ensamblado* de las partículas preribosómicas está regulada negativamente, i) mediante la reducción de los niveles de expresión de los ARNm de exoribonucleasas y nucleolina, en respuesta al ingreso de las células en fase estacionaria (Planta *et al.*, 1999); ii) mediante la reducción de los niveles de ARNm de la proteína Erb1p/Bop1p (proteína involucrada en el procesamiento y ensamble de la subunidad 60 S), en respuesta a la carencia de nutrientes (Strezoska *et al.*, 2000) y iii) mediante una reducción en los niveles del ARNm de Imp4p (componente proteico del snoRNP U3), en respuesta a la caída de los niveles de glucosa, golpes de calor, o la carencia de nitrógeno (Planta *et al.*, 1999).

Lo expuesto previamente, deja en evidencia: i) que el nucleolo es un dominio nuclear sumamente complejo y organizado que posee una relación morfo-funcional muy marcada y donde los cambios de tamaño reflejan su actividad y pueden ser atribuidos principalmente a variaciones en el componente granular que como se mencionara previamente estaría regulado principalmente a nivel de la transcripción génica ribosómica, ii) que sus funciones son consideradas cruciales en la adaptación, el crecimiento, la proliferación y el envejecimiento celular y iii) que la regulación de su actividad responde tanto a factores endógenos como ambientales.

La estrecha relación entre estructura y función evidenciada en el nucleolo, ha llevado a la utilización de sus caracteres morfológicos como indicadores de la actividad del nucleolo (e indirectamente a las funciones celulares básicas previamente señaladas), en respuesta a factores de naturaleza variada. En particular, los dos parámetros morfológicos más ampliamente utilizados, han sido el tamaño y el número de nucleolos, evaluados a partir de preparados histológicos teñidos mediante diferentes métodos. Si bien existen algunos colorantes específicos para la tinción de ARN (ej. Pironina) o más aún, que permiten diferenciar los componentes nucleolares mediante inmunohistoquímica, una de las coloraciones más utilizadas en los estudios histológicos del nucleolo (por su practicidad y bajo costo), ha sido la tinción controlada con AgNO_3 utilizando un revelador coloidal de gelatina protectora (Howel y Black, 1980). Esta tinción colorea específicamente a un conjunto de fosfo-proteínas ácidas características del nucleolo, de las cuales la nucleolina y la nucleofosmina (descritas previamente) son las más abundantes, denominadas proteínas-Ag de la región organizadora del nucleolo e internacionalmente conocidas como proteínas Ag-NOR (sigla proveniente del inglés). El hecho de presentar una marcada argirofilia, sumado a su abundancia en el nucleolo e interacción funcional con el ARNr durante la biogénesis de los ribosomas les ha conferido a estas proteínas, un gran protagonismo en los trabajos realizados para estudiar la fisiología del nucleolo desde el punto de vista de la microscopía.

Una de las disciplinas que ha empleado más frecuentemente esta técnica, ha sido la patología humana, que ha evaluado el tamaño de los nucleolos teñidos con plata como un indicador del grado de proliferación celular en la prognosis de diferentes tipos de cáncer (Derenzini *et al.*, 1998). Este hecho está basado sobre la observación de que la

cantidad de proteínas Ag-NOR en células arrestadas que son estimuladas para proliferar, comienzan a incrementarse durante la fase G1 temprana y alcanza su máximo valor al final de la fase S (Pession *et al.*, 1991) y que se ha comprobado una relación directa entre dichas proteínas y la tasa de proliferación presentada por células que se encuentran en división continua (Trerè *et al.*, 1989; Derenzini *et al.*, 1990; Derenzini *et al.*, 1994). Estudios realizados en otras áreas también han evaluado las Ag-NOR interfásicas en animales de experimentación con el objeto de estudiar: i) *aspectos biológicos* relacionados a su expresión diferencial según el tejido y el sexo en *Mus musculus* (Berrio *et al.*, 1992), o su relación con el desarrollo en el tejido graso de *Drosophila mulleri* (Naya y Bicudo, 1995); ii) *aspectos patológicos* vinculados a colestasis y encefalopatías hepáticas en ratas Wistar (García-Moreno *et al.*, 2002); y iii) *aspectos farmacológicos* como por ejemplo estudios evaluando su respuesta en las células del ácino parótido de ratones tratados con isoproterenol (Aliende y Esponda, 1988).

En el campo de las ciencias ambientales, uno de los primeros trabajos, ha utilizado las *características nucleolares* para evaluar efectos tóxicos del aluminio en vegetales (Fiskesjö, 1983; Fiskesjö 1993). Posteriormente, estas han sido propuestas como herramienta de aplicación en bioensayos (Arkhipchuk, 1995a). Recientemente se ha sugerido su introducción como indicadoras de citotoxicidad en baterías de bioensayos, en reemplazo de otros índices como por ejemplo las LC₅₀, argumentando que las características nucleolares proveerían de un punto final no destructivo que mejoraría la sensibilidad de las baterías (Arkhipchuk *et al.*, 2000).

En peces, uno de los pioneros en estudiar la actividad nucleolar, en núcleos interfásicos, mediante la tinción de Ag-NOR, fue el investigador ucraniano Víctor Arkhipchuk. Sus primeros trabajos estuvieron dirigidos al estudio de cambios estructurales y funcionales del genoma durante la ontogenia y filogenia de los peces (Arkhipchuk, 1995b), pero enseguida percibió la sensibilidad de estos a factores exógenos, al observar cambios en las características nucleolares de las células embrionarias de peces expuestos a bajos niveles de radiación (Arkhipchuk, 1995c), proponiéndolas como una herramienta de aplicación en bioensayos (ver párrafo anterior). Desde entonces, sólo recientemente, y contemporáneo al desarrollo de este trabajo de tesis, las características nucleolares han sido utilizadas como indicadores de efecto frente a contaminantes ambientales en peces. Estos trabajos han utilizado las

NOR interfásicas en el tejido epitelial de las aletas para evaluar efectos subletales causados por el piretroide lambda-cihalotrina en *Garra rufa* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003a) y por efluentes de industrias textiles en *Oreochromis niloticus* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003b).

Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios donde se haya evaluado la respuesta de las características nucleolares en peces expuestos a metales pesados tales como el Cd o el Cr. Además, los trabajos realizados previamente utilizando estos puntos finales en otras especies, sólo se han limitado a describir los cambios observados en el nucleolo, pero hasta al momento y a diferencia de lo ocurrido en otras áreas del conocimiento como las vinculadas a su utilización en el diagnóstico clínico de enfermedades, no se ha intentado explicar las posibles causas de tales cambios, en función los modos de acción de los contaminantes evaluados y de la fisiología del nucleolo.

VII.b Objetivos particulares

De acuerdo a lo expuesto precedentemente en el presente capítulo se plantean los siguientes objetivos:

- Estudiar, mediante la evaluación de las Ag-NOR interfásicas, el comportamiento de la actividad nucleolar en las células de la branquia e hígado de pejerreyes criados en condiciones normales de laboratorio, atendiendo a las características particulares de cada uno de los tejidos evaluados, a variaciones temporales y al estado de condición de los organismos.
- Evaluar la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de pejerreyes expuestos a niveles subletales de Cd(II) y Cr(VI) en función de la concentración y el tiempo de exposición.
- Explicar la relación funcional entre las respuestas halladas en los parámetros morfológicos estudiados y posibles mecanismos de acción del tóxico.

- Seleccionar los parámetros nucleolares más sensibles y establecer índices que permitan utilizar las respuestas observadas como biomarcadores para evaluar efectos biológicos en peces frente a la exposición a los metales estudiados.
- Discutir su potencial uso como biomarcadores de respuesta tanto en bioensayos de laboratorio como en estudios a campo..

VII.c Materiales y métodos

Los detalles sobre el diseño experimental y sobre los organismos empleados durante los ensayos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras para el estudio de la actividad nucleolar, fueron oportunamente descritos en Capítulo III. En la presente sección se detallarán en particular las metodologías empleadas para el estudio de la actividad nucleolar.

VII.c.1. Toma de muestra y preparación del material para microscopía.

Las branquias e hígados de los organismos recién sacrificados se colocaron en tubos eppendorf de 2,5 mL conteniendo 2 mL de una mezcla (3:1) de metanol y ácido acético recién preparada y mantenida a 4°C. Luego de 15 min se realizó un recambio del fijador y las muestras fueron conservadas a -20 °C para su posterior tratamiento o inmediatamente maceradas mediante el reemplazo del fijador por una solución de ácido acético al 45% en agua destilada. La solución de maceración se dejó actuar durante 14 min y luego el material se disgregó durante 1 min utilizando una la pipeta Pasteur. Este proceso se repitió una vez más y luego se centrifugó a 1000 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y remplazado nuevamente por fijador. La suspensión de núcleos obtenida se conservó así a -20 °C.

Al momento de realizar los preparados, el material se resuspendió con una pipeta Pasteur y se dejó reposar durante 15 min. Luego se tomó con la pipeta una muestra de la porción superior del tubo, goteándose la suspensión de núcleos sobre un portaobjetos nuevo. Entre gotas, el preparado se dejó secar bajo corriente de aire frío. El número de gotas por preparado dependió de la cantidad de material en la suspensión, goteándose en promedio 4 gotas por preparado. Los preparados pueden

ser conservados a 4 °C pero en la práctica la calidad de los mismos fue mejor al colorear estos de inmediato.

La tinción de las preparaciones se realizó con nitrato de plata (AgNO_3) utilizando gelatina como protector coloidal para el revelado (Howel y Black, 1980). Para tal fin, una gota de gelatina al 2% y dos gotas de nitrato de plata al 50%, ambos en agua tipo I (ver sección reactivos en Capítulo III), se gotearon sobre el preparado utilizando pipetas *Pasteur* independientes. Las soluciones se mezclaron bien desplazando hacia adelante y atrás un cubreobjetos (sin tocar el vidrio del portaobjetos) que finalmente se colocó en su posición. El preparado se llevó a 70 °C en estufa por 5 min, o hasta que la gelatina tomó un color ámbar, luego se lavó con abundante agua de canilla a presión, se lo enjuagó en un borrel con agua destilada a 70 °C y finalmente se lo dejó secar bajo corriente de aire frío.

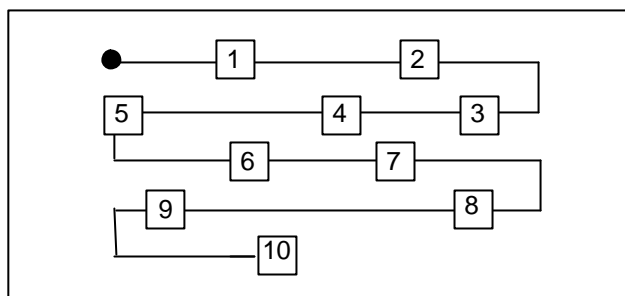


Figura VII.2. Diagrama del método utilizado para el recorrido de los preparados y la captura de las imágenes.

Se capturaron 10 imágenes por preparado tomando sólo los campos que contuvieran entre 3 y 10 núcleos en perfecto estado.

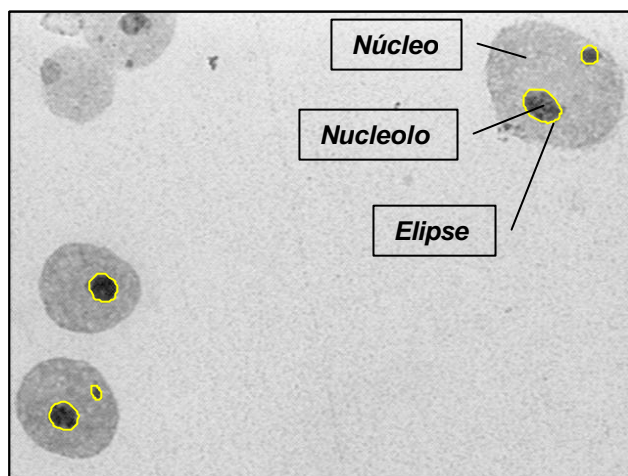


Figura VII.3. Determinación del área para cada nucleolo.

En amarillo se muestra la función elíptica aproximada al contorno de cada nucleolo para estimar su área.

VII.c.2. Observaciones microscópicas, captura y análisis de imágenes.

Los preparado se observaron en un microscopio óptico (Olympus, BX40) dotado de una cámara digital CCD-Iris color (Sony, 55C-370) conectada a una PC provista de una placa de captura de imágenes y un programa específico para análisis de imágenes (Image-Pro Plus 3.0).

Las observaciones se realizaron a una magnificación total de 1000 aumentos empleando objetivo de inmersión. El preparado se recorrió según técnicas convencionales (ver Figura VII.2.) empleando las zonas del preparado en mejor estado. Durante el recorrido sólo se capturaron aquellas imágenes que contuvieran entre 3 a 10 núcleos (6 en promedio) hasta alcanzar un número de 10 imágenes por preparado (60 núcleos).

En cada imagen se determinó el número de nucleolos y el área de cada uno de los nucleolos por núcleo analizado. El área nucleolar se calculó aproximando una función elíptica al contorno de cada nucleolo (Figura VII.3.) utilizando el comando "elipse" y luego "área" de un programa específico para dibujo técnico. Luego a partir de ésta, se calculó el volumen del nucleolo considerándolo como el volumen de una esfera con un área equivalente al de la elipse ajustada (VTP). Esto se realizó para evitar la sobreestimación de la cantidad de material nucleolar, y por consiguiente su actividad, en los núcleos con un mayor número de nucleolos debido al aumento de la relación superficie volumen. Sólo se analizaron núcleos en perfecto estado y que no presentaran superposición.

VII.c.3. Selección de parámetros morfológicos, cálculos realizados y desarrollo de índices para evaluar la actividad nucleolar.

Cómo se mencionó previamente, los parámetros morfológicos escogidos fueron el número de nucleolos por núcleo y el volumen nucleolar total por núcleo. Estos parámetros fueron seleccionados sobre la base de los siguientes supuestos:

- i) el volumen del nucleolo es una medida de su tamaño y éste está relacionado con la actividad del orgánulo, a mayor tamaño mayor actividad (Grundmann, 1967; Alberts *et al.*, 1996).
- ii) para una misma especie, el número de nucleolos por núcleo depende del momento del ciclo celular en que se encuentre (Alberts *et al.*, 1996) y/o del programa genético de cada tipo celular en particular (Grundmann, 1967; Arkhipchuk, 1999) y por consiguiente un mayor número indicaría un incremento en la tasa de división celular o un cambio en el programa genético de la célula.

Los valores obtenidos para los dos parámetros escogidos, se volcaron en una planilla de cálculo en función de cada núcleo analizado para luego calcular el número de nucleolos promedio por núcleo (NNP) y el volumen nucleolar total promedio por núcleo (VTP). Además, se calcularon los siguientes índices: ATP/NNP; ATP×NNP y NNP/ATP, intentando establecer relaciones funcionales entre ambos parámetros.

VII.c.4. Métodos estadísticos

Con el objeto de comprender el comportamiento de los dos parámetros morfológicos elegidos (NTP y VTP) y consecuentemente el de la actividad nucleolar en cada uno de los tejidos estudiados, se realizó una descripción estadística básica (histogramas de frecuencia, media aritmética, moda, mediana, desvío estándar, prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov) de cada uno de ellos para cada uno de los organismos evaluados.

La relación entre los parámetros y algunas de las variables estudiadas, se realizó mediante un estudio de regresión y correlación (Zar, 1996). El efecto de la exposición a cada uno de los metales estudiados sobre los valores de NNP y VTP, se calcularon utilizando ANOVA simple o factorial (dependiendo del diseño experimental) seguidos de la prueba a posteriori de Tukey (Zar, 1996). Los cálculos se realizaron utilizando un programa específico para análisis estadístico.

VII.d Actividad Nucleolar Basal

En primer término, se realizó un análisis descriptivo de los núcleos de las células del epitelio branquial y del tejido hepático en organismos no expuestos, centrando particular atención en las características de sus nucleolos. Se determinó el grado de variabilidad normal de los parámetros morfológicos volumen y número a nivel individual, intra-ensayo o inter-ensayos. Además, se analizaron las fluctuaciones de estos parámetros en función del origen de los organismos y del tiempo, intentando establecer patrones que puedan ser tomados como puntos de referencia a la hora de evaluar el efecto causado por un tóxico.

VII.d.1. **Actividad nucleolar basal en la branquia**

La actividad nucleolar basal en la branquia se evaluó a partir de los individuos utilizados como controles en dos experiencias diferentes, denominadas de aquí en adelante como BL99 y BL00.

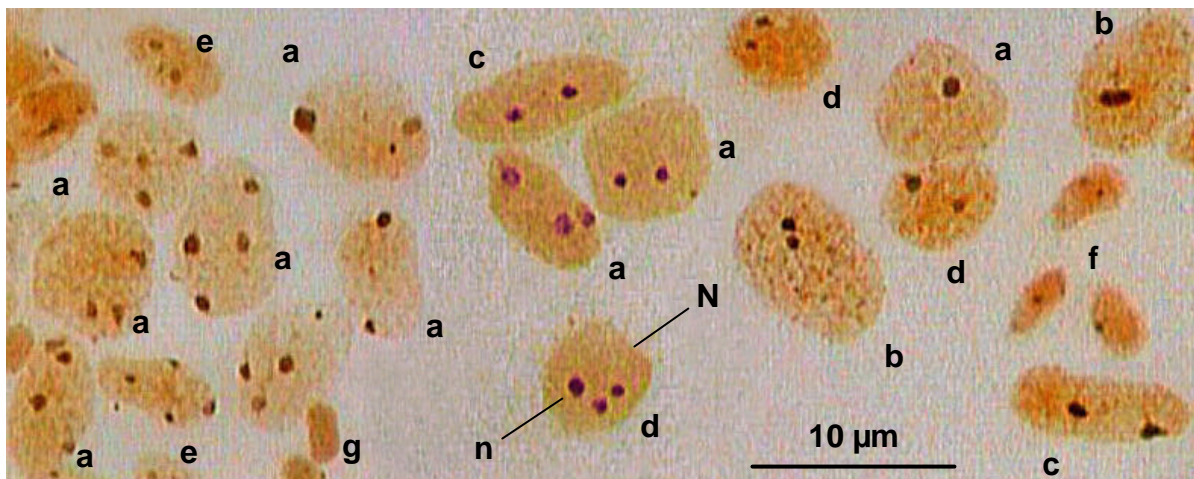


Figura VII.4. Diversidad de núcleos hallados en los preparados de branquia de *O. bonariensis*

Imagen de un preparado de núcleos del epitelio branquial de *O. bonariensis* obtenida por microscopía óptica a 1600X. Material fijado con metanol-ácido acético (3:1), macerado con ácido acético al 45% y teñido con AgNO_3 al 50%. N: núcleo; n: nucleolo; a: núcleos ovoides o poliédricos grandes con hasta 5 nucleolos (células pavimentosas); b: núcleos ovoides o esféricos grandes con nucleoplasma de aspecto granuloso y generalmente con uno o dos nucleolos (células de cloruros); c: núcleos típicamente alargados con 2 o 3 nucleolos generalmente grandes (células mucosas); d: núcleos poliédricos y esféricos medianos con 1 a 4 nucleolos (células inmaduras); e: núcleos pequeños de forma ahusada con 1 a 4 nucleolos generalmente muy pequeños (células pilar); f: núcleos irregulares pequeños con no más de 2 nucleolos diminutos (vasos sanguíneos); g: núcleos ovoides pequeños sin nucleolos (eritrocitos).

En primer lugar, se observó que los diferentes tipos celulares descriptos como constituyentes de la branquia (Hibiya, 1982), se reflejaron en la diversidad de núcleos hallados en los preparados de este tejido. En tal sentido se han podido distinguir siete tipos diferentes de núcleos (Figura VII.4.) aunque no siempre claramente diferenciables. Estos fueron: a) núcleos ovoides o poliédricos grandes con hasta 4 nucleolos de tamaño variable: fueron los más abundantes y probablemente pertenezcan a las células pavimentosas del epitelio plano que recubre tanto los filamentos branquiales primarios como las laminillas secundarias y que están relacionadas principalmente con el intercambio gaseoso, el balance osmótico, equilibrio ácido-base y la excreción de sustancias nitrogenadas. b) núcleos ovoides o esféricos grandes con nucleoplasma granuloso con uno a dos nucleolos de tamaño variable: probablemente correspondientes a las células de cloruros que se hallan en los filamentos primarios y cuya función principal se encuentra vinculada al intercambio iónico. c) núcleos bien alargados con los extremos típicamente redondeados con dos, a

veces tres, nucleolos por lo general relativamente grandes: probablemente pertenecientes a las células mucosas cuya función es la producción del mucus que recubre la branquia para su protección. d) núcleos poliédricos o esféricos medianos con número y tamaño de nucleolos variable: posiblemente correspondientes a células inmaduras. e) núcleos medianos ahusados con número y tamaño de nucleolos variable: quizás pertenecientes a las células en pilar que dan estructura a las laminillas

secundarias. f) núcleos irregulares pequeños, oscuros y con no más de 2 nucleolos muy pequeños: pertenecientes al endotelio de los vasos sanguíneos. g) núcleos bien ovales oscuros en general sin nucleolos o con 1 o 2 diminutos: correspondientes a los eritrocitos.

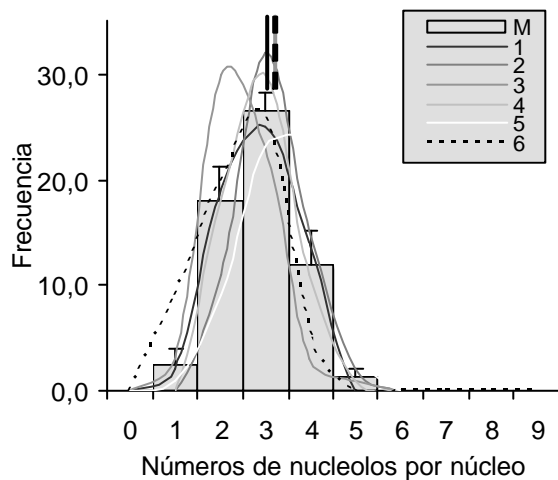
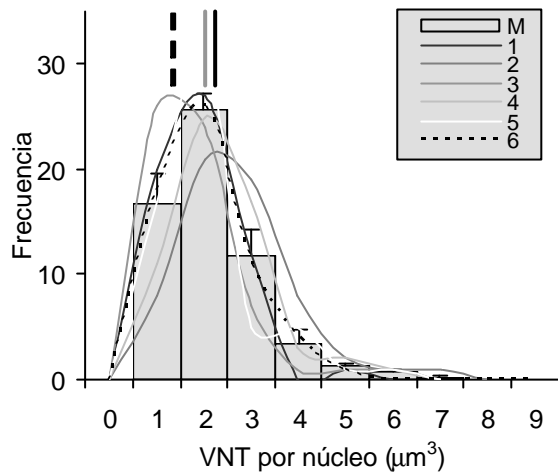


Figura VII.5. Distribución de frecuencia de los valores de volumen nucleolar total (A) y número de nucleolos por núcleo (B), en las células del epitelio branquial de *O. bonariensis*.

Barras: distribución de frecuencia promedio y error estándar correspondiente a 6 individuos; Líneas: distribución de frecuencia para cada individuo en particular. Línea continua negra: media; Línea continua gris: mediana; Línea punteada: moda.

frecuencia de los parámetros morfológicos volumen nucleolar total (VT) y número de nucleolos (NT) por núcleo en cada uno de los pejerreyes correspondientes a los

Un hecho curioso observado en las células del epitelio branquial de *O. bonariensis*, es que si bien se ha determinado citogenéticamente que la especie es diploide y posee un cariotipo $2n = 48$ con NOR ubicada en el extremo terminal del brazo corto de un único cromosoma submetacéntrico (Sola *et al.*, 1988), hecho que la conduciría a poseer en interfase un número máximo de sólo dos nucleolos, los núcleos de estas células presentan un número máximo de hasta cuatro nucleolos. Esto podría explicarse sólo si estas células fueran poliploides o si bien cada NOR pudiera constituir más de un nucleolo.

Luego de identificados los diferentes tipos de núcleos, se estudió la distribución de

controles de los dos ensayos antes mencionados. A modo de ejemplo aquí se exponen los datos obtenidos para BL00-48h (Figura VII.5.), pero el comportamiento de la distribución de frecuencias ha sido semejante en todos los grupos estudiados. Puede observarse que los volúmenes nucleolares totales por núcleo presentan una distribución marcadamente asimétrica con un mayor número de observaciones con valores menores a la media. Para el caso del número de nucleolos por núcleo, además de tratarse de una distribución de datos discretos, se observa que la distribución si bien es casi simétrica y que la dispersión de los datos es muy pequeña resultando en una curva extremadamente aguda o leptokúrtica (Zar, 1996). Como resultado de la prueba de normalidad realizada sobre estas distribuciones se observó que ni el volumen total, ni el número de núcleos por núcleo se ajustan a una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.01$, $n = 300$).

El intervalo de valores observado para el VT en las células del epitelio branquial fue muy variado obteniéndose valores desde 11,20 a 0,08 μm^3 , mientras que para el NT los valores oscilaron entre 1 a 6 nucleolos por célula. Los valores más frecuentes (moda) de VT estuvieron en torno a 1 μm^3 y los de NT a 3. Los volúmenes nucleolares totales promedio por individuo (VTP) oscilaron entre 3,00 a 0,57 μm^3 , y el número total de nucleolos por núcleo promedio por individuo (NTP) entre 3,6 a 1,8 nucleolos por célula. Los valores promedio entre los pejerreyes control para estos parámetros en la branquia fueron de $1,47 \pm 0,06 \mu\text{m}^3$ y $2,56 \pm 0,04$ (media \pm error estándar, $n = 56$) respectivamente.

Tabla VII.1 Variabilidad basal promedio presentada por los parámetros morfológicos volumen nucleolar y número de nucleolos por núcleo, en las células del epitelio branquial de *O. bonariensis* y definición del tamaño muestral para su estudio.

| Parámetro | N | Desviación estándar (mm^3) | Varianza (mm^3) ² | Coficiente de variación % | Tamaño muestral calculado ¹ (d:15%; α :0,05; F:95%) | |
|-----------|-------------------------------|--|--|------------------------------|--|----|
| Volumen | VT _(individual) | 86 | 0,85 \pm 0,05 | 0,83 \pm 0,09 | 57,20 \pm 1,71 | 51 |
| | VTP _(intra ensayo) | 13 | 0,23 \pm 0,02 | 0,06 \pm 0,01 | 11,29 \pm 2,72 | 10 |
| | VTP _(inter ensayo) | 3 | 0,52 \pm 0,02 | 0,27 \pm 0,02 | 33,52 \pm 5,73 | 38 |
| Número | NT _(individual) | 86 | 0,67 \pm 0,03 | 0,51 \pm 0,03 | 26,38 \pm 1,19 | 12 |
| | NTP _(intra ensayo) | 13 | 0,29 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,02 | 7,88 \pm 1,64 | 5 |
| | NTP _(inter ensayo) | 3 | 0,21 \pm 0,11 | 0,06 \pm 0,05 | 7,86 \pm 3,82 | 4 |

Los valores representan la variabilidad promedio \pm el error estándar. ¹ Tamaño muestral calculado para detectar una diferencia mayor o igual al 15 % del valor promedio del parámetro con un nivel de confianza del 5% y una potencia del 95%.

Respecto a la variabilidad observada en los dos parámetros estudiados (Tabla VII.1), ésta fue mayor entre las células de un mismo organismo (VT y NT) que para el valor promedio entre individuos distintos de un mismo grupo (VTP y NTP_(intra-experimental)). Este hecho resulta interesante puesto que indicaría que a pesar de la diversidad de niveles de actividad nucleolar mostrada por los diferentes tipos celulares que conforman el epitelio branquial (VT), la actividad global en el tejido expresada por el valor promedio (VTP), se mantiene relativamente constante entre los individuos de un mismo grupo y por consiguiente resulta un indicador más adecuado para su evaluación. Ello posee además, desde el punto de vista estadístico, la ventaja de que la distribución de las medias es normal y en consecuencia es posible la utilización de métodos de análisis paramétricos que en general son más potentes (Zar, 1996).

Como era de esperarse, la variabilidad promedio presentada por los valores de VTP inter-experimental, fue mayor que la intra-experimental. Sin embargo, esto no fue así para el NTP, donde la variabilidad observada entre individuos pertenecientes a experimentos diferentes fue equivalente a la presentada por los individuos de un mismo experimento. Esta diferencia de variabilidad de los valores de VTP y NTP entre diferentes lotes de peces, quizás sea debido a que el NTP posea un tipo de control más estable (ej. genético), mientras que el VTP posea un modo de regulación más dinámica (ej. metabólica).

De acuerdo a la variabilidad observada, se calculó cual debía ser el tamaño muestral (N) mínimo para cada uno de los niveles evaluados, de modo tal de detectar una diferencia mínima *d* (mitad del intervalo de confianza del 95%) equivalente al 15% del valor promedio obtenido para cada uno de los parámetros, estudiados con un nivel de significancia del 5% y un poder del 95%. De acuerdo a estos resultados, el análisis de 60 núcleos por individuo y 5 individuos por tratamiento resultaran valores satisfactorios para estudiar respuestas en los valores de VT, NT y NTP_(intra-experimental). Una excepción lo representó el tamaño muestral obtenido para el VTP_(intra-experimental) donde sería necesario un N igual a 10 para evaluar tal diferencia con una potencia del 95%. Sin embargo un N igual a 5 sería suficiente para trabajar con una potencia de 80% que es un valor aceptable para este tipo de estudios (Eilersieck y La Point, 1995). La variación inter-experimental fue calculada sólo para poseer una idea general sobre su magnitud, ya que serían necesarios más ensayos para su evaluación detallada, hecho que excede los objetivos de este trabajo.

Los métodos paramétricos son suficientemente robustos como para evaluar datos que se desvíen de la presunción de normalidad (Zar, 1996). De todos modos, para confirmar los tamaños muestrales calculados para VT y NT estos fueron corroborados mediante un método gráfico (Figura VII.6). En éste, se graficaron las diferencias porcentuales entre el valor promedio de cada parámetro obtenido del análisis de un máximo de 120 núcleos y el valor promedio del mismo obtenido a partir del análisis de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 núcleos por preparado, para tres preparados tomados al azar. De allí se desprende que a partir del análisis de 50 – 60 núcleos por individuo, las diferencias entre los promedios se estabilizan haciéndose menores al 5%. Este resultado coincide con los resultados obtenidos a partir del método paramétrico y consecuentemente el análisis de 60 núcleos por individuo resultaría un tamaño de muestra adecuado para el estudio de ambos parámetros en la branquia de *O. bonariensis*.

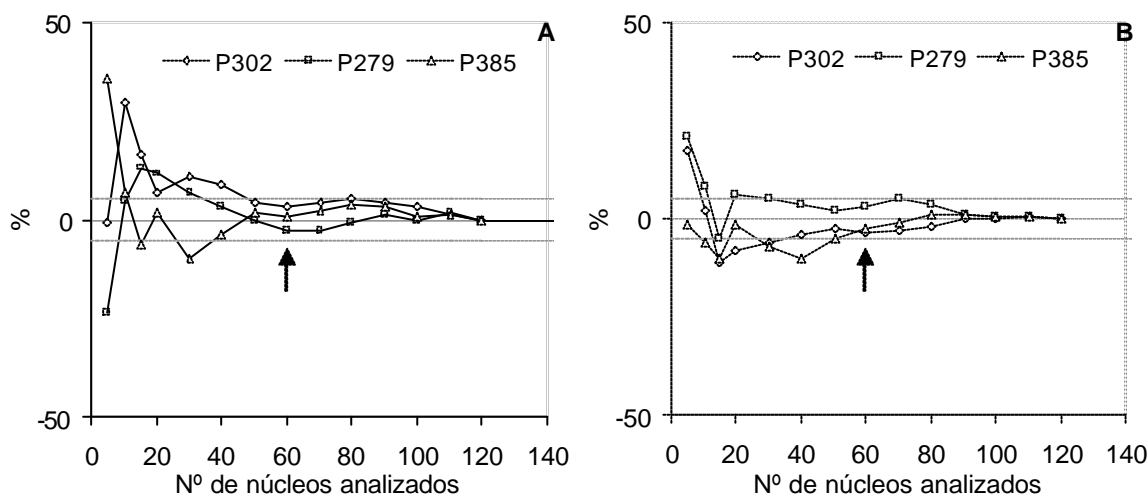


Figura VII.6. Determinación gráfica del número de núcleos a analizar para el estudio del Volumen Nucleolar Total y del Número de Nucleolos por núcleo en la branquia de *O. bonariensis*.

A: Tamaño muestral estimado graficamente para VTP de acuerdo a $(VTP_n - VTP_{120})/VTP_{120} * 100$; B:

Tamaño muestral estimado graficamente para NTP de acuerdo a $(NTP_n - NTP_{120})/NTP_{120} * 100$.

P302/P279/P385: preparádos de núcleos de individuos control tomados al azar. Líneas de puntos: \pm 5% respecto al valor promedio del parámetro obtenido a partir de 120 núcleos.

Cuando se intentó establecer una relación funcional entre los dos parámetros estudiados, se observó que volumen total (VT) y el número de nucleolos (N) por núcleo en los individuos de los tres lotes estudiados (Figura VII.7.), no mostraron una relación

clara entre si, no siendo nunca el coeficiente de regresión β de la función de regresión lineal significativamente distinto de cero ($p < 0.05$).

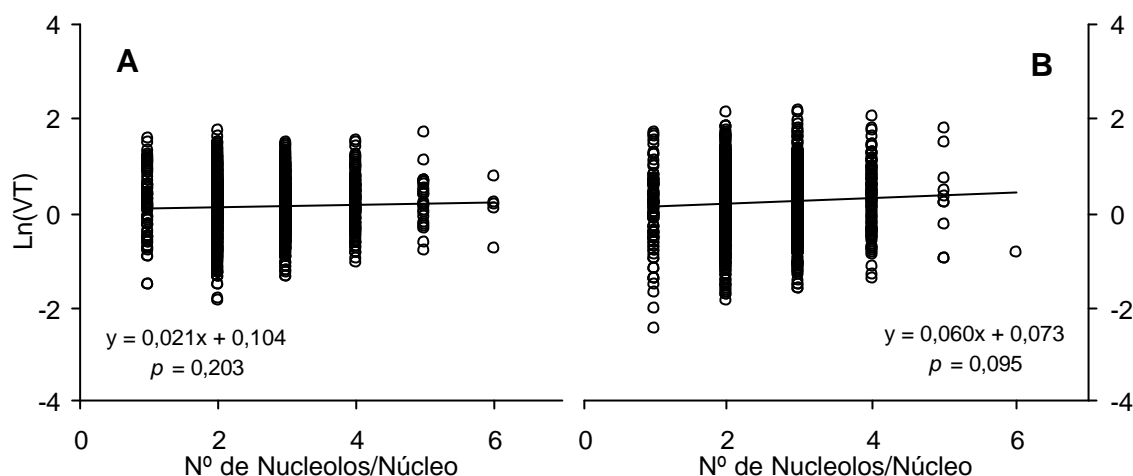


Figura VII.7. Relación entre el número de nucleolos y el volumen nucleolar total por núcleo en la branquia de *O. bonariensis*.

Paneles A y B corresponden a datos obtenidos de los lotes BL99 y BL00. Línea continua y ecuación: función de regresión lineal ajustada y probabilidad asociada al Coef. de regresión β , $n = 1800$.

Los resultados indican que en la branquia de *O. bonariensis*, el volumen nucleolar total por célula es independiente del número de nucleolos que ésta presente. De este modo un mayor número de nucleolos por célula no conlleva a un mayor volumen nucleolar y en consecuencia, tampoco a un incremento en la actividad nucleolar en la célula.

Tabla VII.2. Análisis de la Varianza para determinar efectos del tiempo de ensayo y del lote de los organismos sobre los valores de VTP y NTP en la branquia de *O. bonariensis*

| | BL99: Efecto Tiempo | | | BL00: Efecto Tiempo | | | BL99; BL00: Efecto GE x Tiempo | | | | | |
|------------|---------------------|--------------|-------|---------------------|--------------|-------|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|
| | Intersec. | Tiempo | Error | Intersec. | Tiempo | Error | Intersec. | GE | Tiempo | L x T | Error | |
| VTP | | | | | | | | | | | | |
| SS | 55,0 | 3,3 | 1,3 | 63,1 | 4,5 | 1,5 | 0 | 62,1 | 3,3 | 2,6 | 0,0 | 1,2 |
| v | 1,0 | 4,0 | 25,0 | 1,0 | 3,0 | 20,0 | 0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 20,0 |
| MS | 55,0 | 0,8 | 0,1 | 63,1 | 1,5 | 0,1 | 0 | 62,1 | 3,3 | 2,6 | 0,0 | 0,1 |
| F | 1062,3 | 15,98 | | 829,18 | 19,6 | | | 1012,41 | 52,98 | 42,44 | 0,065 | |
| p | 0,000 | 0,000 | | 0,000 | 0,000 | | | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,801 | |
| NTP | | | | | | | | | | | | |
| SS | 202,5 | 1,0 | 2,4 | 151,9 | 0,0 | 1,7 | # | 162,0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 2,5 |
| v | 1,0 | 4,0 | 25,0 | 1,0 | 3,0 | 20,0 | # | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 20,0 |
| MS | 202,5 | 0,3 | 0,1 | 151,9 | 0,0 | 0,1 | # | 162,0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,1 |
| F | 2136,0 | 2,7 | | 1805,4 | 0,1 | | # | 1283,9 | 0,7 | 1,7 | 3,2 | |
| p | 0,000 | 0,051 | | 0,000 | 0,946 | | | 0,000 | 0,428 | 0,213 | 0,088 | |

BL99 y BL00: grupos experimentales (GE) utilizados para evaluar diferencias en los parámetros nucleolares debidas al efecto del tiempo y al origen de los organismos.

Al analizar el comportamiento del VTP y el NNP en la branquia de *O. bonariensis* en función del tiempo de ensayo y del lote de individuos (Figura VII.7.), se observó que el VTP fue afectado significativamente por ambos factores ($p < 0.01$) mientras que el NNP permaneció invariable (Tabla VII.2.).

La diferencia observada en los valores de VTP entre los lotes BL99 y BL00 indica que este parámetro varía de un grupo de organismos a otro, probablemente debido a que cada grupo posee una constitución génica diferente y consecuentemente presenta una adaptación diferente frente a las mismas condiciones de cría. Este hecho implica que no existiría un nivel de base general para el parámetro y por tanto su estudio requiere de un grupo control. Además, los resultados obtenidos entre ensayos diferentes no serían posibles de comparar en forma cuantitativa, ni si quiera aún cuando se haga en forma relativa al grupo control, puesto que la respuesta frente a un estímulo pareciera ser característica para cada lote de organismos.

La variación observada en los valores de VTP se caracterizó por un decaimiento exponencial de los valores del parámetro en función del tiempo (Panel A, Figura VII.6). En ambos grupos (BL99 y BL00) la respuesta frente a este factor en particular fue equivalente, ya que como se observa del gráfico (Figura VII.8.) las curvas corren en forma paralela, el ANOVA no señala interacción entre factor y el lote de organismos ($p = 0.801$, Tabla VII.2) y el parámetro k en el modelo propuesto no presentó diferencias significativas entre grupos. Esto significa que los grupos sólo varían en su condición inicial.

El decaimiento observado puede ser interpretado por un modelo conceptual tal que:

$$VTP_t = [(A-R)/R \cdot VTP_0] \cdot [1 - \exp(-m \cdot t)] + VTP_0$$

donde: R = requerimiento nutricional ó energético básico diario (mg/d).
A = cantidad de alimento ó energía entregada diariamente (mg/d).
 m = tasa metabólica del tejido para la especie a una edad dada (h^{-1})
 t = tiempo (h)
 VTP_0 = Volumen nucleolar promedio inicial (μm^3)

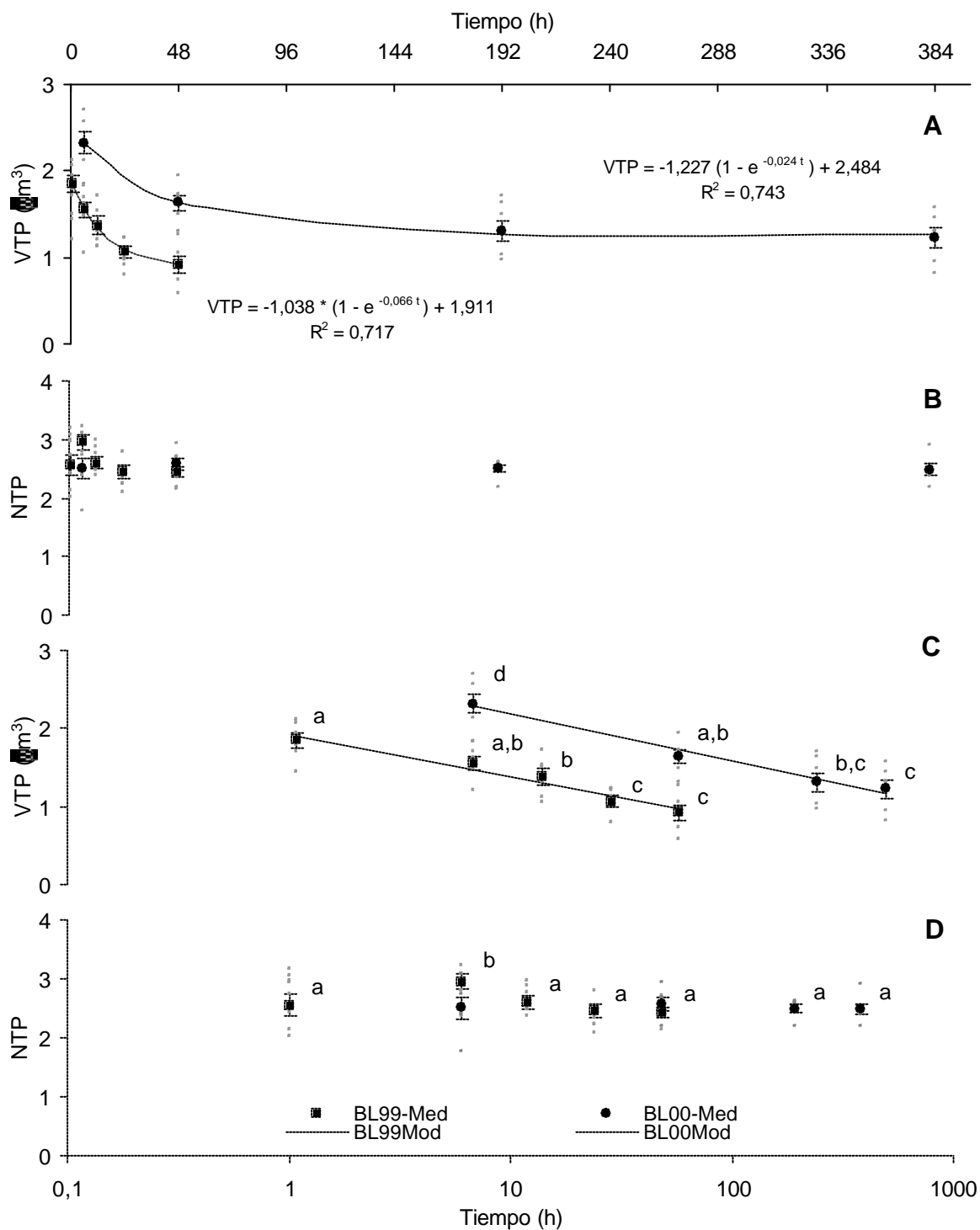


Figura VII.8. Comportamiento de los valores de basales del VTP y NTP en el epitelio branquial de *O. bonariensis* en función del tiempo de ensayo y del lote de organismos.

Paneles A y C: variación de los valores basales de VTP en función del tiempo en escala real y logarítmica respectivamente; Paneles B y D: variación de los valores basales de NTP en función del tiempo en escala real y logarítmica respectivamente; BL00 y BL99: dos cohortes diferentes de pejerreyes. Figuras geométricas negras: valores promedio de los respectivos parámetros para cada una de las cohortes, y sus respectivos errores estándares (barras), graficados en función del tiempo. Curvas: representan el modelo exponencial (Panel A) o lineal (Panel C) utilizado para describir el comportamiento de VTP en función del tiempo para cada cohorte (diferente patrón de línea). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores promedio de los parámetros (ANOVA seguido de la prueba LSD, $p < 0.05$ $n = 6-5$). Expresiones en panel A: ecuación del modelo exponencial ajustado a los valores de VTP y coeficiente de correlación para cada cohorte.

De acuerdo a este modelo la relación entre los requerimientos nutricionales básicos y la cantidad de alimento disponible determina si la actividad nucleolar inicial (VTP_0) quedará estable ($(1 - R/A) = 0$), se incrementará (si $(1 - R/A) > 1$) ó reducirá (si $(1 - R/A) < 1$). Además, esta relación delimita los valores máximos y mínimos de actividad que puedan esperarse para esa condición.

Los parámetros de la función exponencial utilizada para describir el comportamiento de VTP en BL99 y BL00 fueron $(1 - R/A)$: -1,038 y -1,227; k : 0,066 y 0,024 $\mu\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$; VTP_0 : 1,911 y 2,484 μm^3 ; con un ajuste de $R^2 = 0.72$ y 0.74 respectivamente. Esta función puede linealizarse transformando la variable tiempo a escala logarítmica (Panel C, Figura VII.8) según la función $VTP \mu\text{m}^3 = -0.56 \cdot \text{Log}(t) + 1,91$; $R^2 = 0.69$ y $VTP = -0.62 \cdot \text{Log}(t) + 2.76$; $R^2 = 0.73$ para BL99 y BL00 respectivamente.

La explicación a este decaimiento de la actividad nucleolar en función del tiempo, podría atribuirse a la reducción en la cantidad de alimento suministrada durante el experimento (una ración cada 48h) respecto al periodo previo de cría (dos raciones cada 24h). El término $(1-R/A)$ del modelo indica que los requerimientos básicos de los pejerreyes han sido aproximadamente 2 veces mayores a la cantidad de alimento suministrado, hecho que se ajusta adecuadamente a la modificación introducida en el régimen alimentario. Este cambio en la alimentación durante el ensayo ha sido necesario para reducir la alteración de las características del agua, incorporar otra ruta de exposición diferente a la proveniente del agua y disminuir al máximo los factores de estrés debido al manejo durante los ensayos.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, el efecto aquí observado sobre el volumen nucleolar, es coincidente con la reducción en el tamaño de los núcleos de los hepatocitos descripta en larvas de *O. bonariensis* luego de un período de ayuno de cinco días (Strüssmann y Takashima, 1990). Este último hecho, ha sido también observado para otras especies de peces y anfibios (Alvarez y Cowden 1966; Baic *et al.*, 1979; Erlich *et al.*, 1976; O'Connell 1976; Storch *et al.*, 1983) en respuesta a bajas temperaturas y/o ayuno y ha sido relacionado a una reducción en la cantidad de proteínas no cromosómicas dentro del núcleo (Leuchtenberger y Schrader, 1951).

Con el objeto de probar la hipótesis anterior, se relacionaron los valores de VTP en la branquia con el índice de condición de los organismos (Figura VII.9.). El modelo de regresión lineal ajustado a la gráfica de los valores de VTP en función de los valores de índice de condición (K) para todos los individuos muestreados a cada tiempo de ensayo y el coeficiente de correlación (R^2), demostraron la existencia de una relación entre estas dos variables para ambos lotes estudiados (BL99: R^2 :0,420, Coef. reg. $\beta = 0,648 \pm 0,144$ $p = 0,000$, N: 30; BL00: R^2 : 0.212, Coef. reg. $\beta = 0,461 \pm 0,189$ $p = 0,023$, N: 30). Estos resultados indican que en la branquia de *O. bonariensis*, entre el 21,1 y el 42,0 % de la variación observada en los valores de VTP pueden ser atribuibles a la condición de los organismos, explicada mediante una la relación lineal positiva cuya pendiente fue significativamente mayor a cero. Tal relación entre ambas variables era esperable debido a que tanto los valores de VTP (ver Tabla VII.2) como los que los valores de K habían presentado una disminución significativa en función del tiempo de ensayo (ANOVA: $p = 0,002$, N = 30). Además, pondría de relieve la relación morfológico-funcional planteada entre el volumen y la actividad del nucleolo y la probable existencia de un mecanismo de regulación metabólica actuando sobre la actividad nucleolar (y en consecuencia sobre los valores de VTP) en respuesta a factores del ambiente, tal como se ha observado en este estudio frente a la reducción en los niveles de alimentación.

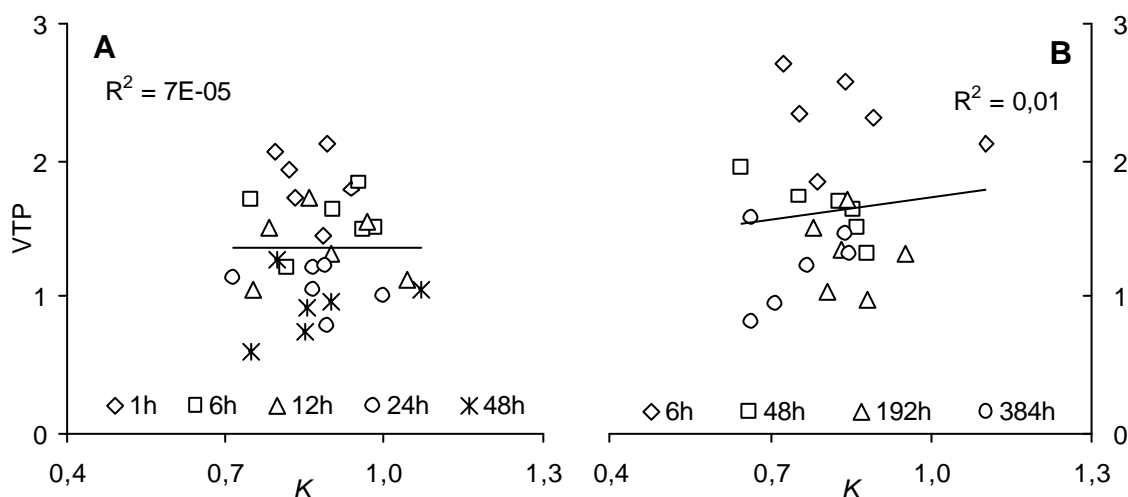


Figura VII.9. Relación entre el índice de condición y el VTP en la branquia de *O. bonariensis*.

Panel A y B se corresponden los lotes BL99 y BL00 respectivamente. Leyenda: indica el momento muestreo. Línea continua: curva de regresión lineal ajustada a los datos y R^2 : coeficiente de correlación, N = 30 y 24 BL99 y BL00 para respectivamente.

La diferencia en el valor inicial de VTP observado entre los individuos del grupo BL99 y BL00, como fuere mencionado previamente, podría ser atribuida a una constitución génica diferente entre poblaciones de organismos, que le haya conferido a cada lote una adaptación desigual frente a las mismas las condiciones de cría .

Los valores de NTP, a diferencia de lo observado para los valores de VTP, no fueron afectados significativamente ni por el lote de los organismos, ni por la duración del ensayo. Este hecho indicaría que el NTP es un parámetro mucho más estable entre individuos y respecto a las condiciones ambientales que, como se mencionara previamente, podría estar vinculada a un proceso de control genético de esta variable en relación a una organización estructural del genoma.

Debido a la estabilidad observada en los valores de VTP y la inexistencia de una relación entre los valores de NTP y los de VTP, en consecuencia los índices $VTP \times NNP$ y VTP/NNP , calculados con el objeto de resaltar relaciones particulares entre el tamaño y el número de nucleolos, no mostraron ningún patrón adicional al provisto por el VTP.

VII.d.2. Actividad nucleolar basal en el hígado

El comportamiento basal de la actividad nucleolar en el hígado se evaluó a partir de los individuos control, correspondientes a los lotes BL98, BL99 y BL00.

En el hígado, los hepatocitos representan el tipo celular más abundante (en humanos conforman el 80% de las células hepáticas; Geneser,1988) y esto se ha visto reflejado en los preparados analizados, donde sus núcleos esféricos (o levemente ovoides) grandes y claros han sido ampliamente los más abundantes, presentando un número máximo de hasta 14 nucleolos (Figura VII.10.). El resto de los núcleos observados fueron: b) núcleos esféricos medianos con un único nucleolo muy grande que ocupa casi la totalidad del nucleoplasma, probablemente se trate del núcleo de células con alta tasa de proliferación encargadas del reemplazo celular puesto que a diferencia de los humanos y de modo similar que en los ratones, se ha observado que en los peces el hígado posee una alta capacidad regenerativa (Hibiya, 1982). c) núcleos pequeños de forma irregular con uno o dos nucleolos muy densos correspondientes a células endoteliales y d) núcleos ovoides muy pequeños correspondientes a los eritrocitos.

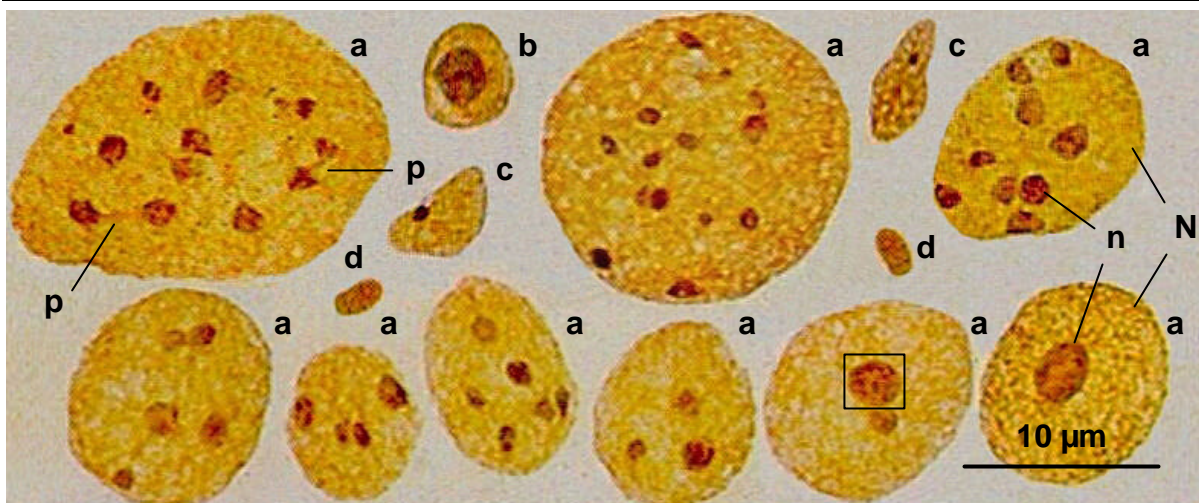


Figura VII.10. Diversidad de núcleos hallados en los preparados de hígado de *O. bonariensis*

Imagen de un preparado de núcleos de tejido hepático de *O. bonariensis* obtenida por microscopía óptica a 1600X. Material fijado con metanol-ácido acético (3:1), macerado con ácido acético al 45% y teñido con AgNO_3 al 50%. N: núcleo; n: nucleolo; p: puentes argirofílicos; a: núcleos ovales o esféricos grades a muy grandes provisto de 1 a 14 nucleolos de tamaño variable (hepatocitos); b: núcleos esféricos con un único nucleolo muy grande (células madres?); c: núcleos irregulares pequeños con no más de 2 nucleolos pequeños y densos (vasos sanguíneos); d: núcleos ovales pequeños sin nucleolos (eritrocitos); Recuadro: nucleolo aumentado en la Figura VII.10.

Una característica observada en los nucleolos de las células hepáticas es que en general son más laxos que los descritos para el epitelio branquial. En ellos pueden distinguirse claramente zonas que poseen un mayor o menor grado de argirofilia (Figura VII.11.) y que probablemente guarden relación con los componentes nucleolares descritos por medio de la microscopía electrónica. Otra particularidad observada fue la presencia de “puentes” argirofílicos entre algunos de los nucleolos, indicando una posible relación estructural entre ellos.

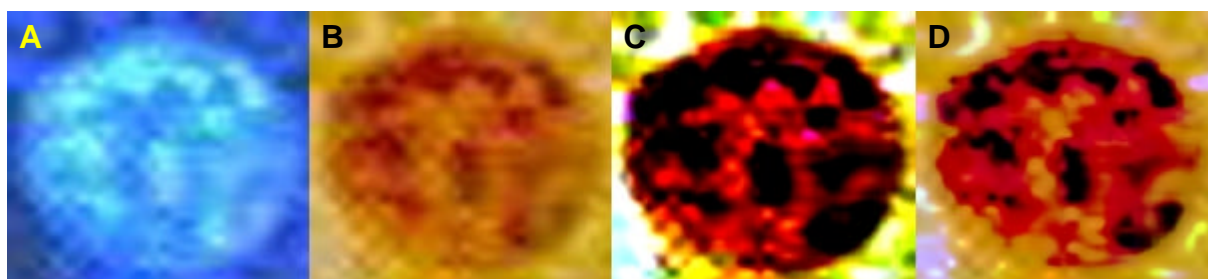


Figura VII.11. Diferentes regiones observadas en los nucleolos de las células hepáticas resaltadas por diferentes tratamientos de las imágenes.

A: imagen invertida; B: imagen original; C: imagen enfocada al 500% con un radio de 75 píxeles y un umbral de 0 niveles. D: igual a C pero con un umbral de 150 niveles. Todas las imágenes se encuentran aumentadas digitalmente 400X utilizando un remuestreo bicúbico.

Al igual que lo observado para la branquia, los hepatocitos de *O. bonariensis* presentaron un número máximo de nucleolos mucho mayor que el esperado de acuerdo a los estudios citogenéticos (Sola *et al.*, 1988) indicando una clara incongruencia entre ambos tipos de análisis, hecho que ameritaría por si mismo un estudio específicamente dirigido a dilucidar tal problemática.

De acuerdo a la distribución de los componentes, los nucleolos de los hepatocitos de *O. bonariensis*, no parecieran corresponderse ni con los nucleolos de tipo reticulado ni

concéntrico (Scheer y Hock, 1999), sino que presentaron una estructura granulada, dada por la presencia de grumos bien argirofílicos embebidos en un material teñido más débilmente, de modo similar a lo que ocurre con los nucleolos reticulados, pero formando una estructura esferoidal bien definida, similar a la observada en nucleolos de tipo concéntrico.

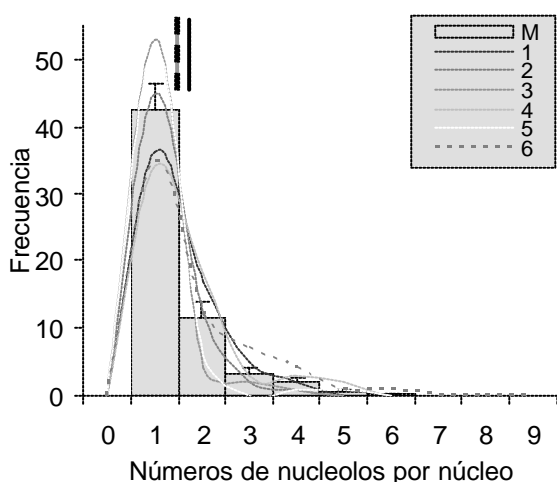
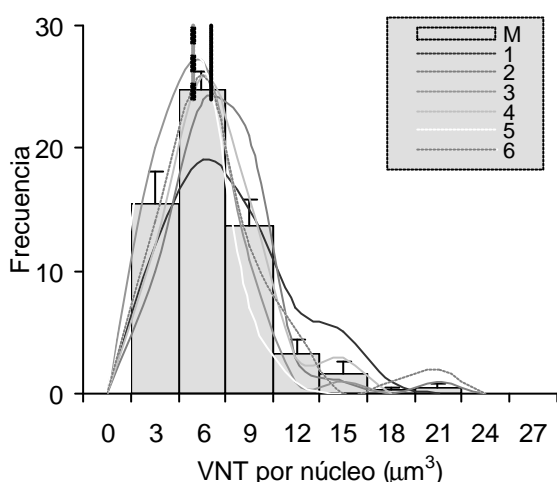


Figura VII.12. Distribución de frecuencia de los valores de volumen nucleolar total (A) y número de nucleolos por núcleo (B), en los hepatocitos de *O. bonariensis*.

Barras: distribución de frecuencia promedio y error estándar correspondiente a 6 individuos; Líneas: distribución de frecuencia para cada individuo en particular. Línea continua negra: media; Línea continua gris: mediana; Línea punteada: moda.

En los hepatocitos de los pejerreyes empleados como controles durante los diferentes ensayos realizados (BL98, BL99, BL00), tanto la distribución de frecuencia del volumen nucleolar total por núcleo (VT) como la distribución del número de nucleolos por núcleo (NT) mostraron una marcada asimetría con una predominancia de observaciones con valores menores a la media. A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos para los individuos correspondientes al lote BL99-24h (Figura VII.12.). De acuerdo a las pruebas de normalidad, ninguno de los dos

parámetros estudiados se ajustaron a una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.01$, $n = 360$).

El intervalo de valores del VT por núcleo en los hepatocitos de individuos control fue de 265,90 a 0,54 μm^3 y el intervalo de valores del NT estuvo comprendido entre 1 y 14 nucleolos por núcleo. Los valores más frecuentes (moda) de de VT se hallaron en torno a los 5 μm^3 , mientras que el NT más frecuente fue de 1 nucleolo por célula (excepto para el grupo BL00 que donde el valor de NT más frecuente fue de 3). Los valores de VTP oscilaron entre 38,54 a 3,36 μm^3 , y los de NTP entre 3,5 a 1,1 nucleolo por célula. Los promedios generales para estos parámetros en el hígado de los pejerreyes control fueron de $12,56 \pm 0,95 \mu\text{m}^3$ y $1,83 \pm 0,06$ (media \pm error estándar, $n = 86$).

Tabla VII.3. Variabilidad basal promedio presentada por los parámetros morfológicos volumen nucleolar y número de nucleolos por núcleo, en los hepatocitos de *O. bonariensis* y cálculo del tamaño muestral para su estudio.

| Parámetro | N | Desviación estándar (μm^3) | Varianza (μm^3) ² | Coefficiente de variación % | N (requerido) ¹ (d: 15% ; a :0,05; F:95%) |
|------------------------------------|----|--|--|--------------------------------|---|
| Volumen VT _(individual) | 86 | 7,16 \pm 0,63 | 84,65 \pm 2,30 | 55,00 \pm 1,39 | 57 |
| VTP _(intra ensayo) | 13 | 1,35 \pm 0,36 | 1,99 \pm 0,39 | 18,73 \pm 1,31 | 5 |
| VTP _(inter ensayo) | 3 | 6,93 \pm 3,65 | 74,80 \pm 1,64 | 48,61 \pm 10,31 | 105 |
| Número NT _(individual) | 86 | 0,95 \pm 0,04 | 1,01 \pm 0,10 | 51,53 \pm 1,28 | 43 |
| NTP _(intra ensayo) | 13 | 0,23 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,03 | 9,91 \pm 1,94 | 6 |
| NTP _(inter ensayo) | 3 | 0,52 \pm 0,26 | 0,41 \pm 0,04 | 24,87 \pm 3,09 | 22 |

Los valores representan la variabilidad promedio \pm el error estándar. ¹ Tamaño muestral calculado para detectar una diferencia mayor o igual al 15 % del valor promedio del parámetro con un nivel de confianza del 5% y una potencia del 95%.

El análisis de la variabilidad de los dos parámetros estudiados en el hígado (Tabla VII.3.) mostró que en el hígado de *O. bonariensis*, la máxima variabilidad se presenta entre el VT y NT de las células de un mismo individuo. Por otro lado, la menor variabilidad observada se halló a nivel de los valores promedios entre individuos pertenecientes a un mismo experimento. Finalmente, la variabilidad observada para los valores de VTP y NTP entre ensayos, como era de esperarse, resultó ser significativamente mayor a la observada entre individuos de un mismo ensayo pero menor que la observada entre los núcleos de un mismo individuo. Del mismo modo, la variabilidad de los valores inter-experimental de los valores de NT fue significativamente mayor respecto al nivel intra-experimental pero menor que a nivel individual. De acuerdo a estos valores, el VTP_(intra-experimental) y el NTP_(intra-experimental)

representan los mejores indicadores para evaluar el comportamiento de la actividad nucleolar durante un ensayo.

De acuerdo a los niveles de variación observada, para detectar durante el experimento una diferencia mínima d (mitad del intervalo de confianza del 95%) equivalente a un 15% del valor promedio del parámetro estudiado, resultará necesario analizar unos 60 núcleos por individuo y 6 individuos por tratamiento. El número mínimo de ensayos requerido debiera ser de 105 ensayos, pero este valor está sobreestimado debido al bajo número de ensayos utilizados para hacer los cálculos. En consecuencia un número mayor de experimentos serían necesarios para establecer el tamaño muestral mínimo para detectar diferencias entre ensayos distintos, pero tal cometido escapa los objetivos del presente estudio.

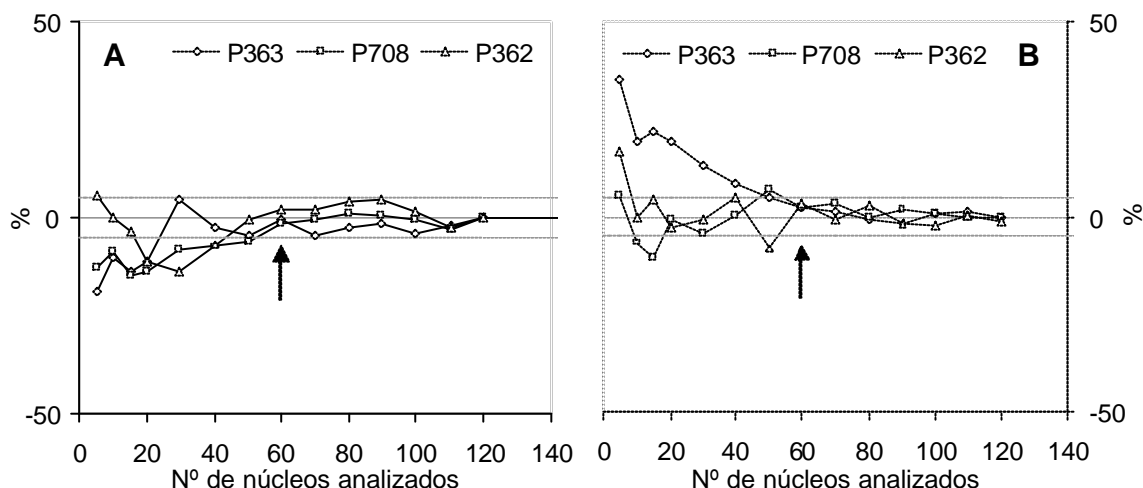


Figura VII.13. Determinación gráfica del número de núcleos a analizar para el estudio del Volumen Nucleolar Total y del Número de Nucleolos por núcleo en el hígado de Q. bonariensis.

A: Tamaño muestral estimado graficamente para VTP de acuerdo a $(VTP_n - VTP_{120}) / VTP_{120} * 100$; B:

Tamaño muestral estimado graficamente para NTP de acuerdo a $(NTP_n - NTP_{120}) / NTP_{120} * 100$.

P302/P279/P385: preparados de núcleos de individuos control tomados al azar. Lineas de puntos: \pm 5% respecto al valor promedio del parámetro obtenido a partir de 120 núcleos.

Al utilizar el método gráfico para corroborar el número de células por preparado que debieran ser analizadas (Figura: VII.13) para calcular los valores de VTP y NTP de modo tal que estos no se desvíen más de un 5% de la media poblacional, estimada a partir de una muestra suficientemente grande ($N = 120$), se halló que el tamaño muestral requerido sería de 60 núcleos por individuo, resultado coincidente al obtenido mediante el método paramétrico.

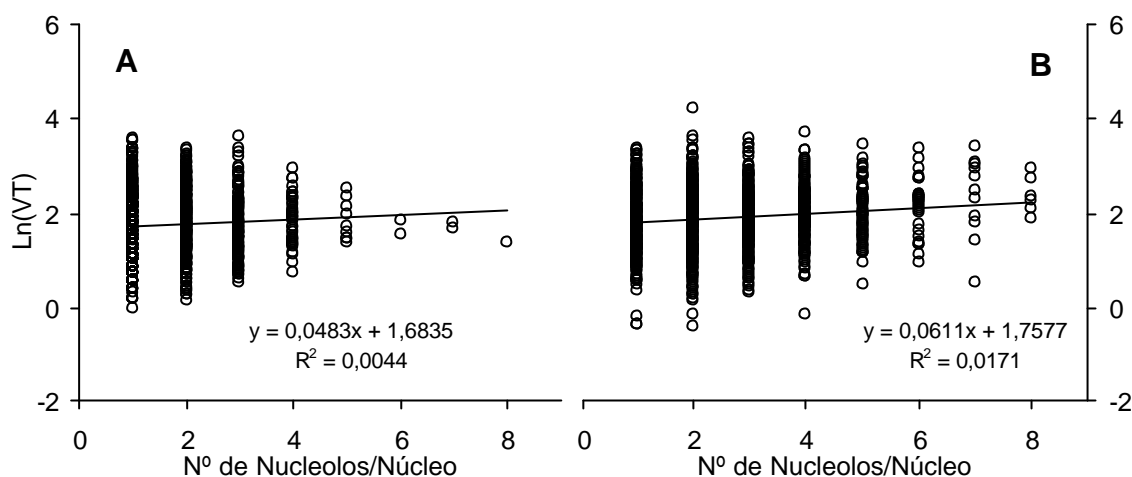


Figura VII.14. Relación entre el número de nucleolos y el volumen nucleolar total por núcleo en el hígado de *O. bonariensis*.

Paneles A y B corresponden a datos obtenidos de los lotes BL99 y BL00 respectivamente. Línea continua y ecuación: función de regresión lineal ajustada y probabilidad asociada al Coef. de regresión β , $N = 1800$.

Cuando se evalúa la dependencia del VT en función del NT para los individuos de BL99 y BL00 (Figura VII.14.), se observa que si bien para ambos grupos el coeficiente de regresión b entre el NT y el $\ln(VT)$ fue significativamente mayor a cero (BL99: $b = 0,066$; $p = 0,005$; BL00: $b = 0,131$; $p = 0,000$) sus valores son muy pequeños indicando que la relación entre estas dos variables es muy débil (al duplicarse el NT sólo se incrementará el volumen un 3,25%). En tal sentido, como se mencionara anteriormente para la branquia, el volumen nucleolar total por célula parece ser relativamente independiente del número de nucleolos que ésta presenta y en consecuencia, un mayor número de nucleolos por célula no conlleva a un mayor volumen nucleolar y en por lo tanto, tampoco a un incremento en la actividad nucleolar en la célula.

Al analizar el comportamiento del VTP y el NNP en el hígado de *O. bonariensis* en función del tiempo de ensayo y del lote de individuos (Figura VII.15.), se observó que el VTP fue afectado significativamente por ambos factores ($p < 0.01$) pero de manera independiente (sin interacción entre ellos), mientras que el NNP permaneció invariable respecto al tiempo mientras en uno de los casos fue afectado por el lote de organismos (Tabla VII.4.).

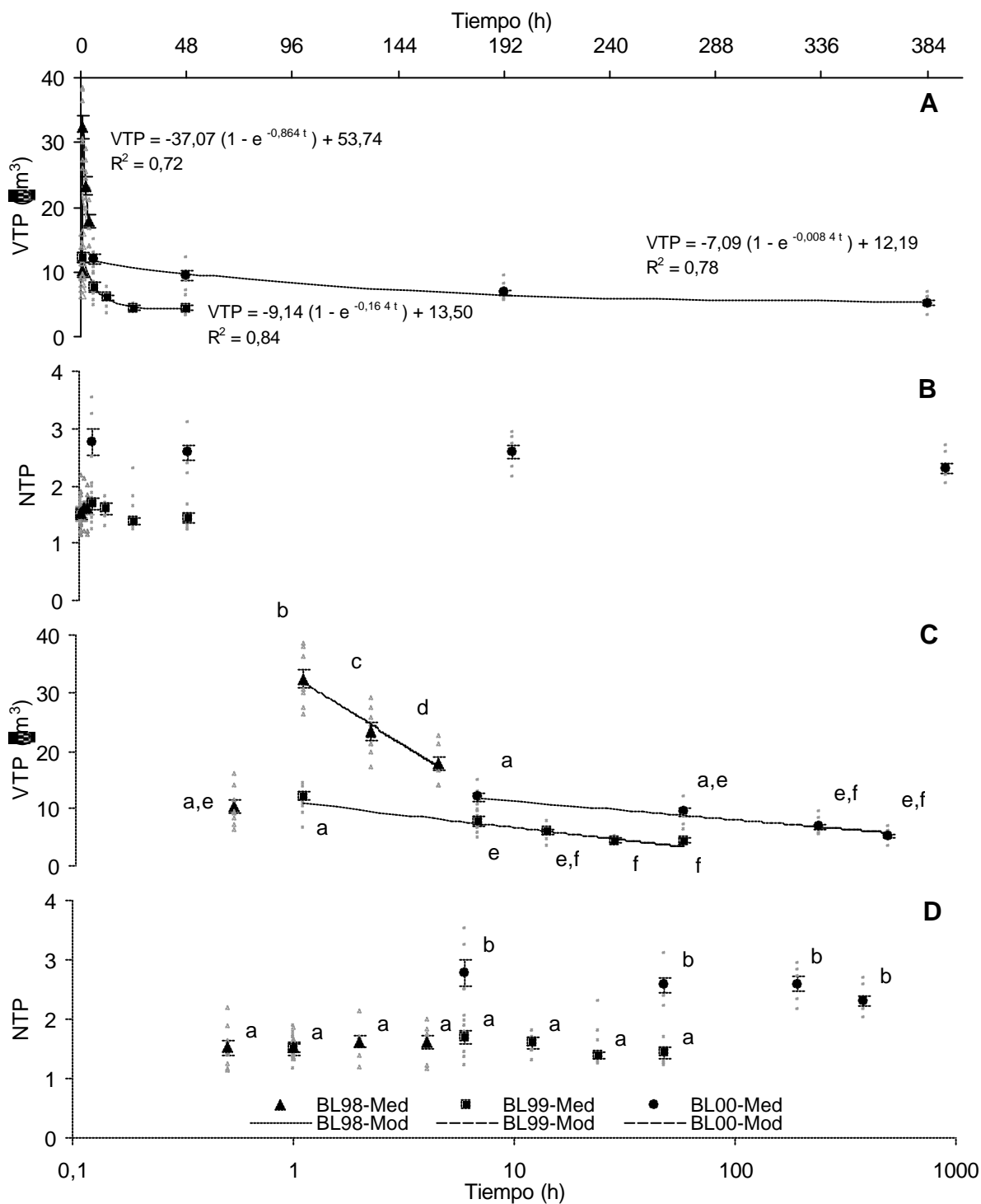


Figura VII.15. Comportamiento de los valores de VTP y NTP en el tejido hepático de *O. bonariensis* en función del tiempo de ensayo y del lote de organismos.

Paneles A y C: variación de los valores basales de VTP en función del tiempo en escala real y logarítmica respectivamente; Paneles B y D: variación de los valores basales de NTP en función del tiempo en escala real y logarítmica respectivamente; BL00, BL99 y BL98: dos cohortes diferentes de pejerreyes. Figuras geométricas negras: valores promedio de los respectivos parámetros para cada una de las cohortes, y sus respectivos errores estándares (barras), graficados en función del tiempo. Curvas: representan el modelo exponencial (Panel A) o lineal (Panel C) utilizado para describir el comportamiento de VTP en función del tiempo para cada cohorte (diferente patrón de línea). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores promedio de los parámetros (ANOVA seguido de la prueba LSD, $p < 0.05$ $n = 6-5$). Expresiones en panel A: ecuación del modelo exponencial ajustado a los valores de VTP y coeficiente de correlación para cada cohorte.

Tabla VII.4. Análisis de la Varianza para determinar efectos del tiempo de ensayo y del lote de los organismos sobre los valores de VTP y NTP en el hígado de *O. bonariensis*

| | VTP | | | | | NTP | | | | |
|------------------|---------|------|---------|-------|--------------|--------|-------|--------|--------|--------------|
| | SS | v | MS | F | p | SS | v | MS | F | p |
| BL98 | | | | | | | | | | |
| Intersección | 14046,7 | 1,0 | 14046,7 | 943,8 | 0,000 | 78,4 | 1,0 | 78,4 | 945,7 | 0,000 |
| Tiempo | 2074,4 | 3,0 | 691,5 | 46,5 | 0,000 | 0,08 | 3,00 | 0,03 | 0,31 | 0,818 |
| Error | 416,8 | 28,0 | 14,9 | | | 2,32 | 28,00 | 0,08 | | |
| BL99 | | | | | | | | | | |
| Intersección | 1455,6 | 1,0 | 1455,6 | 764,8 | 0,000 | 69,7 | 1,0 | 69,7 | 1365,5 | 0,000 |
| Tiempo | 252,8 | 4,0 | 63,2 | 33,2 | 0,000 | 0,38 | 4,00 | 0,10 | 1,88 | 0,145 |
| Error | 47,6 | 25,0 | 1,9 | | | 1,28 | 25,00 | 0,05 | | |
| BL00 | | | | | | | | | | |
| Intersección | 1672,2 | 1,0 | 1672,2 | 800,6 | 0,000 | 157,4 | 1,0 | 157,4 | 1191,4 | 0,000 |
| Tiempo | 163,0 | 3,0 | 54,3 | 26,0 | 0,000 | 0,67 | 3,00 | 0,22 | 1,69 | 0,202 |
| Error | 41,8 | 20,0 | 2,1 | | | 2,64 | 20,00 | 0,13 | | |
| BL98 - 99 | | | | | | | | | | |
| Intersección | 6814,8 | 1,0 | 6814,8 | 464,8 | 0,000 | 31,3 | 1,0 | 31,3 | 648,3 | 0,000 |
| Lote | 1390,2 | 1,0 | 1390,2 | 94,8 | 0,000 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,01 | 0,910 |
| Error | 175,9 | 12,0 | 14,7 | | | 0,58 | 12,00 | 0,05 | | |
| BL99 - 00 | | | | | | | | | | |
| Intersección | 1688,2 | 1,0 | 1688,2 | 608,1 | 0,000 | 107,88 | 1,00 | 107,88 | 846,96 | 0,000 |
| Lote | 129,3 | 1,0 | 129,3 | 46,6 | 0,000 | 7,31 | 1,00 | 7,31 | 57,42 | 0,000 |
| Tiempo | 53,9 | 1,0 | 53,9 | 19,4 | 0,000 | 0,30 | 1,00 | 0,30 | 2,37 | 0,139 |
| Lote x Tiempo | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,3 | 0,609 | 0,01 | 1,00 | 0,01 | 0,05 | 0,817 |
| Error | 55,5 | 20,0 | 2,8 | | | 2,55 | 20,00 | 0,13 | | |

El cambio observado en los valores de VTP siguió un decaimiento exponencial en función del tiempo (Panel A, Figura VII.15.), ajustándose satisfactoriamente al mismo modelo descrito para la branquia.

Los parámetros de la función exponencial utilizada para describir el comportamiento de VTP en BL99 y BL00 fueron: $(1 - R/A) = -37,07, -9,14$ y $-7,09$; $k = 0,86, 0,16$ y $0,01 \mu\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$; $VTP_0 = 53,74, 13,50$ y $12,19 \mu\text{m}^3$; con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,72, 0,84$ y $0,78$ respectivamente. Esta función puede linealizarse transformando la variable tiempo a escala logarítmica (Panel C, Figura VII.15.) según la función $VTP = -24,08 \text{Log}(t) + 31,76$ $R^2 = 0,70$, $VTP = -4,94 \text{Log}(t) + 11,83$ $R^2 = 0,81$ y $VTP = -3,75 \text{Log}(t) + 15,210$ $R^2 = 0,78$ para BL98, BL99 y BL00 respectivamente.

La interpretación que puede hacerse respecto a la reducción observada de los valores de VTP en función del tiempo sería equivalente a la planteada oportunamente para la

branquia (ver Capítulo VII, Pág. 13-14), siendo atribuible al cambio introducido en el régimen alimentario durante el ensayo respecto al periodo de cría previo.

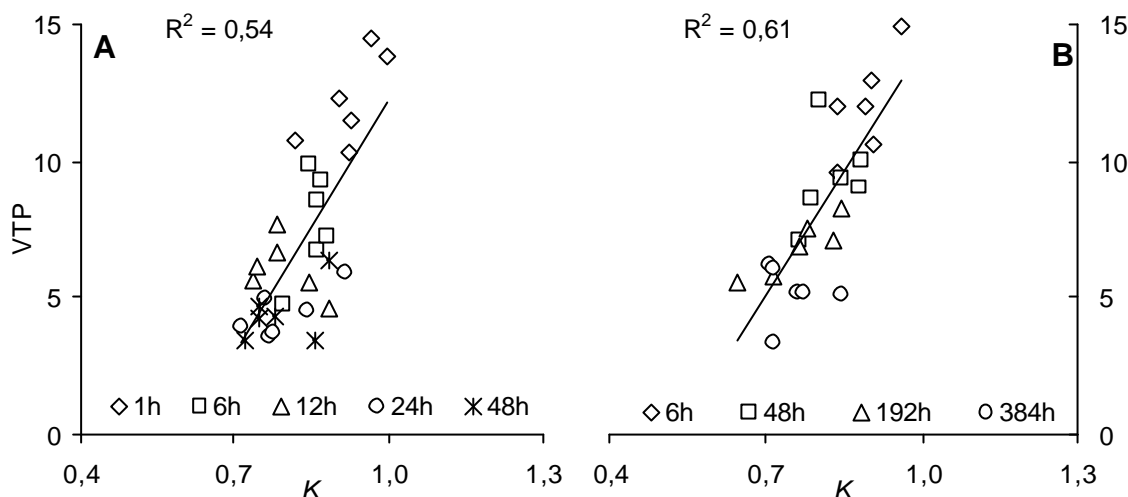


Figura VII.16. Relación entre el índice de condición (K) y los valores de VTP en el hígado de *O. bonariensis*.

Panelea A y B: corresponden a los lotes BL99 y BL00 respectivamente. Leyenda: indica el momento muestreo. Línea continua: curva de regresión lineal ajustada a los datos y R²: coeficiente de correlación, N = 30 y 24 BL99 y BL00 para respectivamente.

Cuando se evaluó la relación entre el VTP en el tejido hepático y el índice de condición de los organismos (Figura VII.16.), se observó que existe una fuerte correlación positiva entre estas dos variables, y que de acuerdo a los coeficientes de determinación hallados, el índice de condición (K) estaría explicando entre un 54 a 61% de la variabilidad observada en VTP. El coeficiente de regresión *b* fue en todos los casos significativamente distinto de cero ($p < 0,05$), poniendo también en evidencia la clara dependencia entre las dos variables y el carácter indicador del VTP sobre la condición general del organismo.

La diferencia en los valores de VTP observada en el hígado de *O. bonariensis*, en relación con el lote de organismo, mostró que el comportamiento entre BL99 y BL00 fue similar, variando básicamente en sus valores absolutos iniciales pero presentando luego un patrón semejante durante el transcurso del ensayo. Por el contrario el lote BL98 mostró un comportamiento particular respecto a los otros dos lotes ensayados, presentando valores "normales" de VTP (equivalentes a los de BL99-1h y BL00-6h) al inicio de la experiencia (0,5h), pero que rápidamente sufrieron un gran incremento

hacia la primer hora y luego retornaron velozmente a valores cercanos a los iniciales. El modelo exponencial interpretó satisfactoriamente la reducción observada en los valores de VTP por los individuos de BL98 luego de la hora de ensayo, siendo su parámetro k mucho mayor al de los grupos anteriores. Cuando se compara el comportamiento del VTP para el lote BL98 respecto al presentado por el grupo BL99, este no pareciera ser "normal", ya que los valores a una hora de ensayo difieren significativamente ($p < 0,05$) entre estos dos grupos. En consecuencia, tal anomalía podría atribuirse a algún factor de estrés que hubiera afectado en particular a los pejerreyes de BL98 al comienzo del ensayo, induciendo alguna respuesta (ej. síntesis de proteínas de estrés) que haya implicado un brusco aumento de la actividad nucleolar.

La interacción entre los factores estudiados (lote y tiempo) sobre los valores de VTP en el hígado de *O. bonariensis* sólo pudo ser evaluada entre los individuos BL99 y BL00. Para estos dos grupos, el ANOVA no mostró interacción entre ambos factores, en otras palabras, el VTP se comportó de manera semejante de ambos grupos respecto al transcurso del tiempo, variando entre ellos sólo en su condición inicial. A pesar de esto, el parámetro k del modelo propuesto, presentó valores significativamente mayores ($p < 0,05$) para el grupo BL99, pero probablemente ello sólo se deba a la falta de valores de VTP intercalados ente 1 y 48h para el grupo BL00. El grupo BL98 no pudo ser incluido en el ANOVA para evaluar la interacción entre el efecto causado por el origen de los individuos (Lote) y el tiempo de ensayo debido al insuficiente número de puntos de muestreo comunes a los dos grupos restantes.

Los valores de NTP en el hígado de *O. bonariensis* no fueron afectados por el transcurso del ensayo (Tabla VII.4., $p = 0,139$), pero si lo fueron por el origen de los individuos (Tabla VII.4. $p = 0,000$). Por otra parte no se observó interacción entre ambos factores respecto a este parámetro (Tabla VII.4., $p = 0,817$). Como consecuencia, los valores de NTP se mantuvieron invariables en el tiempo. Los lotes BL98 y BL99 no presentaron entre ellos diferencias significativas pero si respecto al grupo BL00 que mostró valores de VTP significativamente mayores. Esta diferencia observada entre lotes, como se planteó oportunamente para la branquia, podría atribuirse a un programa genético de determinación de los valores de éste parámetro (Arkhipchuk, 1999) que sea particular de cada población de individuos.

Debido a la uniformidad observada en los valores de VTP y la inexistencia de una relación entre los valores de NTP y los de VTP, los índices $VTP \times NNP$ y VTP/NNP , calculados con el objeto de resaltar relaciones particulares entre el tamaño y el número de nucleolos, no mostraron ningún patrón adicional al provisto por el VTP.

VII.d.3. Resumen actividad nucleolar basal.

De acuerdo a los estudios realizados sobre las características nucleolares presentadas por la branquia y el hígado de juveniles de *O. bonariensis* de seis meses de vida criados desde su nacimiento en condiciones de laboratorio, se pueden realizar las siguientes observaciones:

- Tanto en la branquia como en el hígado los parámetros nucleolares estudiados no se distribuyen normalmente y en ambos tejidos el valor promedio del parámetro por individuo (que se distribuye normalmente) presentó la menor variabilidad y consecuentemente representa el mejor indicador para ser evaluado.
- Las características nucleolares (tamaño y número) observadas en cada tejido fueron propias. El hígado presentó valores de VTP 8,5 veces mayor que la branquia, hecho que pareciera estar en relación a responder al número de funciones y grado de actividad sintética de cada tejido. Por otro lado, la branquia mostró valores de NTP 1,4 veces mayores que el hígado, pero esta diferencia no sería funcional sino que pareciera responder a un programa genético propio de cada tejido (Arkhipchuk, 1999). Al comparar los valores de VTP y NTP promedios obtenidos para las células del epitelio branquial de *O. bonariensis* respecto a los valores presentados por las células del epitelio que recubre las aletas en otras especies, se observa que la branquia de *O. bonariensis* presenta valores de NTP equivalentes a los hallados en las aletas de *Oreochromis niloticus* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003b) pero es menos del doble de los observados en las aletas de *Cyprinus carpio* (Arkhipchuk, 1999) y *Garra rufa* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003a), mientras que los valores de VTP en la branquia de *O. bonariensis* fueron comparables a los presentados por *C. carpio* (Arkhipchuk, 1999) y aproximadamente tres veces menores a los valores reportados para células del epitelio de la aleta uninucleoladas en *O. niloticus* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003b) y *G. rufa* (Çavas y Ergene-Gözükara, 2003a). Esta similitud indicaría que los

valores de los parámetros nucleolares en tejidos semejantes de especies de peces con igual ploidía son relativamente constantes.

- El comportamiento relativo del VNP en la branquia y el hígado fue equivalente tanto en función del tiempo como en relación al índice de condición de los individuos. Esta correspondencia entre la actividad nucleolar de tejidos correspondientes a órganos internos y externos ha sido observada previamente por otros autores (Arkhipchuk, 1995a) y pone de manifiesto la capacidad de la actividad nucleolar de reflejar la condición general del organismo. En tal sentido ambos tejidos mostraron un decrecimiento de los valores de VTP sostenido en función el tiempo de ensayo a lo largo de las 384h estudiadas. Este hecho puede atribuirse a un factor común que afectase los valores del parámetro en ambos tejidos, como por ejemplo lo fue el cambio en régimen alimentario (disminución de la ración y frecuencia de alimentación) durante el ensayo respecto al período previo de cría. Esta hipótesis concuerda con la relación hallada entre la actividad nucleolar y los niveles de proteínas, lípidos y el metabolismo energético en peces (Romanenko *et al.*, 1992), las características nucleolares con los niveles de ARN y la relación entre ARN/ADN en el baso de *C. carpio* (Arkhipchuk, 1995a) y la reducción del tamaño del núcleo observada en el hígado de *O. bonariensis* sometido a ayuno (Strüssmann y Takashima, 1990) y que fuese atribuido a una reducción en las proteínas nucleares no cromosómicas (Leuchtenberger y Schrader, 1951). La relación entre la actividad nucleolar y los niveles de nutrientes es un fenómeno que no sólo se ha observado en peces sino que es de carácter general y ha sido discutido por otros autores en varias revisiones sobre el tema (Hanna *et al.*, 1998; Grummt 1999; Jacob y Ghosh 1999; Strezoska *et al.*, 2000)
- Los valores de NTP no mostraron cambios significativos en función del tiempo ni con la condición de los organismos en ninguno de los dos tejidos estudiados, pero sí variaron significativamente en función del origen de los individuos y del tipo de tejido. Este hecho podría explicarse por la existencia de una constitución génica particular de cada población de individuos y por la regulación diferencial de la expresión de los genes ribosómicos en cada tejido como consecuencia de la diferenciación celular.

- Finalmente, de acuerdo a los patrones de comportamiento observados en los parámetros nucleolares en las células del hígado y la branquia de *O. bonariensis*, podemos concluir que: a) El VTP poseyó una clara connotación funcional reflejando la condición general del individuo, independientemente del tejido evaluado y podría ser útil como indicador durante la fase de regulación fisiológica del organismo en respuesta a condiciones cambiantes del medio, como por ejemplo se ha observado aquí frente a la reducción en la disponibilidad de alimento. b) El NTP respondió a características intrínsecas de cada población de individuos y tipo celular en particular, probablemente en función de una programación genética preestablecida, y por lo tanto una respuesta a este nivel presentaría valor como indicador de interrupción de tal programa producto del daño causado por el sobrepaso de la capacidad de regulación fisiológica del organismo.

VII.e Respuesta de la actividad Nucleolar en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* frente al Cd(II).

Previamente se ha descrito el comportamiento de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de pejerreyes no expuestos, su variación temporal y su relación con el estado de condición de los individuos. A continuación se expondrán los resultados obtenidos a partir del estudio de la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de Cd(II). En tal sentido, se evaluarán las variaciones de los valores de los parámetros nucleolares seleccionados en la sección precedente (VTP y NTP) respecto a los valores hallados en individuos no expuestos (controles).

VII.e.1. Efecto del Cd(II) sobre la actividad nucleolar en la branquia.

En primer lugar se expondrán los resultados obtenidos sobre la respuesta de los parámetros VTP y NTP hallada en la branquia de pejerreyes de 6 meses de edad expuestos a Cd(II) durante dos experiencias denominadas de aquí en adelante como EXP-99 y EXP-00.

VII.e.1.1. Respuesta del VTP branquial

En ambas experiencia, los valores de VTP en los organismos expuesto fueron afectados significativamente en función de la concentración Cd(II) y del tiempo de ensayo (Tablas VII.5. y VII.6.), pero no se observó interacción entre estos dos factores durante el periodo completo de tiempo ensayado.

Tabla VII.5. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|-------|----|-------|--------|--------------|
| (3 x 5) | Intersección | 124,5 | 1 | 124,5 | 2055,9 | 0,000 |
| | Tiempo | 16,4 | 4 | 4,1 | 67,6 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) | 1,5 | 2 | 0,8 | 12,6 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,7 | 8 | 0,1 | 1,5 | 0,171 |
| | Error | 4,5 | 75 | 0,1 | | |

En particular, durante la experiencia EXP-99 (Panel A, Figura VII.16.) pudo observarse una respuesta rápida con un descenso significativo (LSD: $p < 0.05$) de los valores de VTP ya desde las 6h para ambas concentraciones ensayadas (1 y 10 mg Cd(II)/L). En el caso de los individuos expuestos a 1 mg Cd(II)/L, los valores de VTP parecieron alcanzar un nuevo valor de equilibrio, siempre significativamente (LSD: $p < 0.05$) menor al blanco excepto a 24h de exposición, ya desde las 6h de ensayo con valores que en promedio fueron un $25 \pm 2\%$ (media \pm error estándar, N = 4) menores al de los individuos control. Los valores de VTP en los individuos expuestos a 10 mg Cd(II)/L, también presentaron, rápidamente desde las 6h, valores significativamente (LSD: $p < 0.01$) menores al de los pejerreyes control, llegando a una nueva situación de equilibrio luego de las 12h de exposición, con valores promedio de VTP un $40 \pm 7\%$ (media \pm error estándar, N = 4) menores al de la branquia de los pejerreyes control. El hecho de que los valores de VTP se hayan estabilizado rápidamente condujo a que el ANOVA-bifactorial (3 x 5) no muestre interacción entre la concentración de cadmio y el tiempo de exposición para los individuos expuesto a 1 mg Cd(II)/L y que tal interacción se haya observado en los individuos expuestos a 10 mg Cd(II)/L sólo durante las primeras 12h de ensayo.

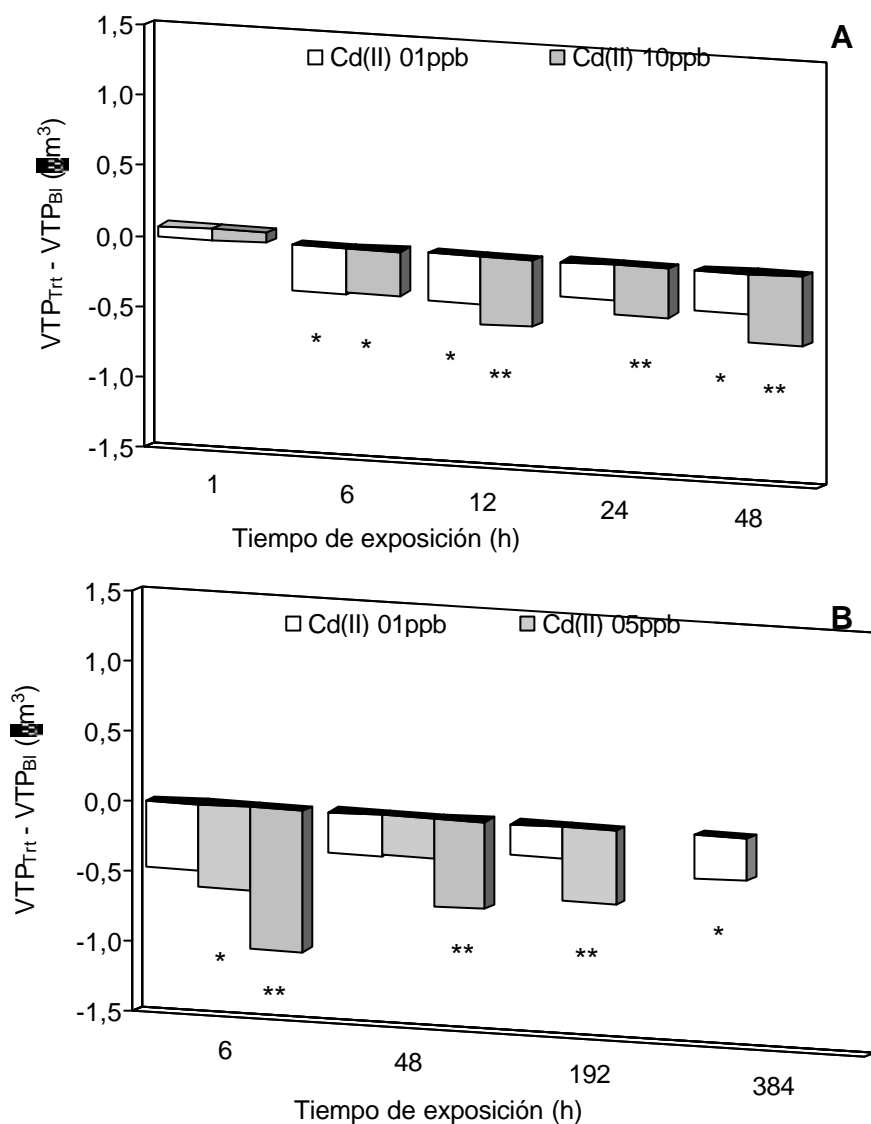


Figura VII.17. Respuesta del VTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cd(II).

Diferencia de valores de VTP branquial entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cd(II) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-99, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cd(II) ensayadas. * y ** diferencia significativa ($p < 0,05$) y altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

El análisis de los valores de VTP obtenidos durante la experiencia EXP-00 (Panel B, Figura VII.17.) fue más complejo debido a que la insuficiencia de organismos no permitió plantear un diseño experimental (4 x 4) completo. En consecuencia, los datos fueron evaluados mediante tres modelos de ANOVA-bifactorial alternativos, comparando (2 x 4), (3 x 3) y (4 x 2) niveles de concentración de Cd(II) x niveles de tiempo de exposición. En línea general, los tres ANOVAs mostraron la misma tendencia que la hallada en EXP-99, observándose un descenso de los valores de VTP en los

individuos expuesto al metal. Los organismos expuesto a las concentraciones de 5 y 10 mgCd(II)/L en EXP-00 presentaron un descenso significativo (LSD: $p < 0.05$) o altamente significativo (LSD: $p < 0,01$) de los valores de VTP branquial tempranamente desde las 6h de exposición con una reducción en los valores del parámetro en los individuos expuestos a 10 mg Cd(II)/L de hasta un 43% respecto a los valores de los blancos. Luego, la diferencia de los valores de VTP entre individuos tratados y controles se redujo dejando de ser significativa para los organismos expuestos a 1 y 5 mg Cd(II)/L, pero finalmente, esta diferencia volvió a acentuarse hacia las 384 h mostrando respectivamente, valores un 25 y 40% menores al de los blancos.

Tabla VII.6. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|-------|----|-------|--------|--------------|
| (2 x 4) Intersección | 102,4 | 1 | 102,4 | 1465,0 | 0,000 |
| Tiempo | 7,3 | 3 | 2,4 | 35,0 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) | 1,2 | 1 | 1,2 | 17,7 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,1 | 3 | 0,0 | 0,5 | 0,691 |
| Error | 2,8 | 40 | 0,1 | | |
| (3 x 3) Intersección | 119,9 | 1 | 119,9 | 1851,3 | 0,000 |
| Tiempo | 7,5 | 2 | 3,7 | 57,6 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) | 2,1 | 2 | 1,0 | 15,9 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,3 | 4 | 0,1 | 1,0 | 0,400 |
| Error | 2,9 | 45 | 0,1 | | |
| (4 x 2) Intersección | 118,4 | 1 | 118,4 | 1534,9 | 0,000 |
| Tiempo | 2,6 | 1 | 2,6 | 33,8 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) | 4,0 | 3 | 1,3 | 17,1 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,3 | 3 | 0,1 | 1,1 | 0,367 |
| Error | 3,1 | 40 | 0,1 | | |

La disminución del contraste entre los individuos expuestos y los controles, con la consecuente pérdida de sensibilidad observada luego de las 12h, podría ser atribuible al descenso marcado de los valores de VTP, tanto en los individuos control como en los tratados, durante el ensayo y que oportunamente fuera relacionado con la reducción en los niveles de alimentación durante el experimento (ver sección VII.d.1.). Este hecho podría haber enmascarado en parte el efecto producido por el metal y en consecuencia reducir la sensibilidad de la respuesta hasta que los valores de VTP no se hubieran adaptado al nuevo régimen de alimentación.

En el ensayo EXP-00, del mismo modo que se observara en la experiencia EXP-99, luego de apreciarse una respuesta rápida de los valores de VTP al Cd(II), se observó una estabilización de los valores del parámetro en una nueva situación de equilibrio, que fue reflejada en el ANOVA como una no interacción entre los factores concentración y tiempo de exposición. En este segundo ensayo, como los tiempos de exposición entre muestreos fueron más prolongados que en el primero, la interacción entre ambos factores no pudo observarse aún al comienzo del ensayo.

La menor concentración de Cd acumulada en la branquia capaz de inducir una reducción significativa de los valores de VTP fue de 1,2 y 8,4 nmol/g (PH) a las 6 y 384h respectivamente. Valores de acumulación de 7,9 y 4,2 nmol/g a las 48 y 192h no produjeron efecto significativo, por lo tanto se observa un descenso de la sensibilidad con el tiempo de ensayo. Como se mencionara anteriormente, esta reducción podría deberse en parte al descenso de la actividad nucleolar con el cambio de alimentación durante el ensayo, pero también, podría deberse a la activación de mecanismos de defensa y detoxificación de las células mediado por metalotioneínas u otras proteínas de estrés. Esta última hipótesis, coincide con la observación realizada en una línea celular de hepatoma de rata, donde a concentraciones subletales de Cd relativamente altas, las proteínas de estrés son inducidas aún cuando la síntesis general de proteínas en la célula es detenida (Goering *et al.*, 1993; Ovelgönne *et al.*, 1995).

La reducción de los valores de VTP branquial podría interpretarse como una respuesta a la reducción general de los procesos sintéticos, el crecimiento y la proliferación celular. Se ha observado que en diferentes líneas celulares estos procesos se ven inhibidos a concentraciones de Cd(II) mayores a 1 μ M (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Tal respuesta general de la célula se debe a un sobrepaso de límites de protección brindados a la célula por las metalotioneínas (Nomiyama y Nomiyama, 1986) y el glutatión (Singhal, 1987), con la resultante presencia de Cd⁺² libre y la consecuente interacción de éste con otras macromoléculas (principalmente proteínas ricas en grupos tiol o con cofactores metálicos) y la generación indirecta de estrés oxidativo.

En tal sentido se ha observado que el Cd⁺² libre afecta la homeostasis del Ca⁺² y Zn⁺² e inhibe las funciones de varias enzimas y proteínas reguladoras dependientes de estos dos metales (Beyersmann y Hechtenberg, 1997), e interfiere con los mecanismos de

reparación del ADN y de control del ciclo celular (Hartwig *et al.*, 2002). Por otro lado, el Cd^{+2} libre es capaz de inducir indirectamente la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ya sea mediada por hierro (Casalino, *et al.*, 1997), como producto de reacciones inflamatorias (Albergoni y Viola, 1995), ó inhibiendo la actividad de enzimas antioxidantes como GS-Px, GS-R y CAT (Vaglio y Landriscina, 1999) o SOD (Novelli *et al.*, 1998). La consecuencia de tales mecanismo, es la inducción de un daño celular generalizado como producto de la peroxidación de lípidos (Casalino, *et al.*, 1997; Novelli *et al.*, 1998; Shaikh *et al.*, 1999; Vaglio y Landriscina, 1999), alteración de las proteínas (De Smet y Blust, 2001) y daño en el ADN (Banfalvi *et al.*, 2000) que finalmente conducirán a las respuestas generales mencionadas previamente.

Cuando se relacionan los mecanismo de acción previamente descriptos para el Cd(II) con los mecanismos que regulan la biogénesis de los ribosomas, y en consecuencia la actividad del nucleolo, encontramos varias posibles zonas de contacto. En primer lugar debe resaltarse que la mayor sensibilidad de los fibroblastos embrionales de rata en comparación con los fibroblastos de piel humana reside en que en el primer tipo celular la acumulación de Cd en el núcleo es 12 veces mayor que en el último (Lin *et al.*, 1995). Luego, observamos que el punto principal de regulación de la biogénesis de los ribosomas, la transcripción del ARNr, es reducida por la inhibición de la síntesis proteica (Jacobs *et al.*, 1999; Hanna *et al.*, 1998; Grummt 1999) que es un efecto inducido característicamente por altas concentraciones de Cd en todos los sistemas evaluados (Cohen *et al.*, 1991). Por otro lado, la nucleolina, aumenta la especificidad de la transcripción del ARNr al ser fosforilada por la caseína quinasa II (CKII), un evento regulado por una ruta de señalización específica y coordinado con el crecimiento celular (Bouche, *et al.*, 1984), proceso que también ha sido observado es afectado por el Cd(II) (Piersma *et al.*, 1993; Palmiter 1995). Otro punto de contacto es a nivel del procesamiento y ensamble del pre-ARNr, puesto que se ha observado que el daño en el ADN reduce los niveles de ARNm de varias proteínas, como la fibrilarina, que forma parte de las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas involucradas en el procesamiento del ARNr y de la nucleolina mediante la estabilización de la proteína supresora de tumores, p53 (Jelinsky y Samson, 1999), en tal sentido, si bien se ha observado que a muy bajas concentraciones, a las que no se observa daño en el ADN, el Cd puede interferir la interacción entre la proteína p53 (con dedos de cinc) y el ADN (Hartwin, 2001) es muy probable que a altas concentraciones, a las que induzca daños en el ADN esta proteína pueda estabilizarse y ser la responsable de la inhibición de la

proliferación celular observada *in vitro* en células de carcinoma embrionario de ratón tratadas con 10 µM Cd (Piersma *et al.*, 1993) y en linfocitos de *Ictalurus melas* frente a exposiciones *in vitro* a 40 µM Cd(II)/L e *in vivo* a 20 µg Cd(II)/L (Albergoni y Viola, 1995).

En consecuencia, la reducción en el VTP branquial en respuesta a las concentraciones de Cd(II) ensayadas, se corresponde con mecanismos celulares desencadenados producto del daño celular en respuesta a efectos citotóxicos y/o genotóxicos inducidos por el Cd. Por lo tanto, se deduce que tal respuesta a nivel nucleolar estaría indicando disfunciones celulares a nivel del epitelio branquial tempranamente a partir de las 6h de exposición en los pejerreyes sometidos a concentraciones de Cd(II) tan bajas como 1 y 5 µg/L (8,9 y 44,5 nmol/L) pero con niveles de acumulación del metal en el tejido mayores o iguales a 1,15 µM.

VII.e.1.2. Respuesta del NTP branquial

Cuando se analizó la respuesta del NTP en la branquia de *O. bonariensis* frente a la exposición de los individuos al Cd(II) (Figura VII.18.), el ANOVA-bifactorial indicó que, a excepción del modelo 4 x 2 en EXP-00, en ninguno de los dos ensayos (EXP-99 y EXP-00) existió un efecto significativo del metal, del tiempo o de su interacción sobre los valores de éste parámetro (Tablas VII.7. y VII.8).

Tabla VII.7. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la banquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|-------|----|-------|--------|--------------|
| (3 x 5) Intersección | 561,0 | 1 | 561,0 | 4061,0 | 0,000 |
| Tiempo | 0,7 | 4 | 0,2 | 1,3 | 0,275 |
| Conc. Cd(II) | 0,5 | 2 | 0,3 | 1,9 | 0,164 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 1,3 | 8 | 0,2 | 1,2 | 0,312 |
| Error | 10,4 | 75 | 0,1 | | |

Durante la experiencia EXP-99 (Panel A, Figura VII.14.), la diferencia de valores de NTP respecto a la media oscilaron ente 0,2 y -0,5 no observándose diferencias significativas para ninguno de los tratamientos ensayados (LSD: p<0,05).

En la experiencia EXP-00 (Panel B, Figura VII.14.), de los tres modelos de ANOVA-bifactorial utilizados (Tabla VII.8), sólo aquel que consideró las tres concentraciones (1, 5 y 10 mg Cd(II)/L) evaluadas durante los dos primeros tiempos de exposición (6 y 48h) mostró un efecto altamente significativo (ANOVA-bifactorial, $p < 0,05$) del Cd(II) sobre el NTP. Sin embargo sólo se halló un descenso altamente significativo de los valores del parámetro en los individuos expuestos a 10 mg Cd(II)/L durante 48h. Debido a que esta tendencia no fue observada durante el experimento previo (EXP-99) y que los individuos expuestos a 5 mg Cd(II)/L revirtieron la tendencia luego de las 192h.

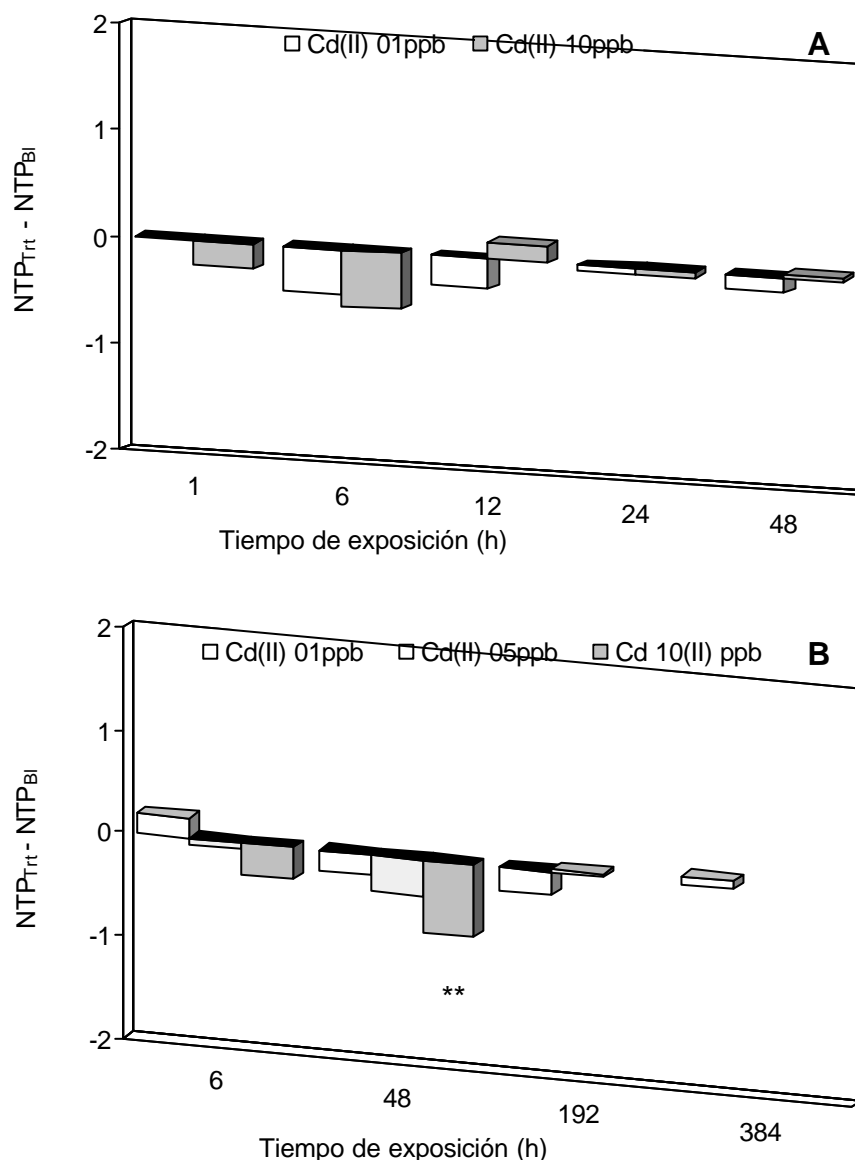


Figura VII.18. Respuesta del NTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cd(II).

Diferencia de valores de NTP branquial entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cd(II) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-99, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cd(II) ensayadas. ** diferencia altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

La respuesta del NTP frente a la exposición al cadmio es difícil de explicar en términos de los posibles mecanismos subyacentes. Esto se debe a que la misma sólo guardó una relación clara con la concentración de Cd(II) a las 48h de exposición y luego se vio contrarrestada. Una posible interpretación podría ser dada en función de los mecanismos de reparación del ADN. Se ha observado en células humanas que el daño causado por ruptura en la cadena del ADN sobre las secuencias ADN_r, puede ser luego eficientemente reparado (Fritz *et al.*, 1996). Lo mismo se ha encontrado luego de la formación de dímeros de pirimidina u otros fotoproductos (Balajee *et al.*, 1999). Por otro lado, otra alternativa posible para subsanar el daño podría ser mediante la activación de la expresión de otra de las tantas copias del gen que existen en la NOR de la célula.

Tabla VII.8. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la branquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|--------|----|--------|---------|--------------|
| (2 x 4) Intersección | 299,30 | 1 | 299,30 | 3399,24 | 0,000 |
| Tiempo | 0,27 | 3 | 0,09 | 1,02 | 0,392 |
| Conc. Cd(II) | 0,02 | 1 | 0,02 | 0,18 | 0,670 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,37 | 3 | 0,12 | 1,42 | 0,253 |
| Error | 3,52 | 40 | 0,09 | | |
| (3 x 3) Intersección | 326,13 | 1 | 326,13 | 3364,40 | 0,000 |
| Tiempo | 0,21 | 2 | 0,10 | 1,08 | 0,349 |
| Conc. Cd(II) | 0,15 | 2 | 0,07 | 0,77 | 0,470 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,65 | 4 | 0,16 | 1,69 | 0,170 |
| Error | 4,36 | 45 | 0,10 | | |
| (4 x 2) Intersección | 267,34 | 1 | 267,34 | 2252,62 | 0,000 |
| Tiempo | 0,44 | 1 | 0,44 | 3,68 | 0,062 |
| Conc. Cd(II) | 2,05 | 3 | 0,68 | 5,75 | 0,002 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,31 | 3 | 0,10 | 0,86 | 0,470 |
| Error | 4,75 | 40 | 0,12 | | |

Cual sea el mecanismo subyacente, es evidente que las células de epitelio branquial son capaces de mantener el NTP frente a la exposición a Cd(II) y que harían a este parámetro insensible frente a los efectos reflejados por el VTP y claramente relacionados con daño a nivel celular.

VII.e.2. Efecto del Cd(II) sobre la actividad nucleolar en el hígado.

Previamente se han expuesto y discutido las respuestas de los parámetros nucleolares VTP y NTP en la branquia de *O. bonariensis* en función de los niveles de Cd(II) en el agua y el tiempo de exposición obtenidos a partir de dos experiencias complementarias. A continuación, se expondrán y discutirán los resultados obtenidos a partir de los mismos pejerreyes expuestos en las experiencias anteriores (EXP-99 y EXP-00), pero ahora evaluando la respuesta de los parámetros nucleolares VTP y NTP en el tejido hepático.

VII.e.2.1. Respuesta del VTP hepático

Los valores de VTP hepático en los pejerreyes durante la experiencia EXP-99 y EXP-00 (Figura VII.19.) fueron afectados significativamente ($p < 0,05$; Tabla VII.9. y VII.10.) tanto por la concentración de Cd(II) como por el tiempo de ensayo. Sin embargo, no se observó una interacción entre estos dos factores para ninguno de los dos ensayos.

Tabla VII.9. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|--------|----|--------|-------|--------------|
| (3 x 5) Intersección | 4684,9 | 1 | 4684,9 | 994,6 | 0,000 |
| Tiempo | 634,3 | 4 | 158,6 | 33,7 | 0,000 |
| Conc. Cd(II) | 59,7 | 2 | 29,8 | 6,3 | 0,003 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 17,0 | 8 | 2,1 | 0,5 | 0,886 |
| Error | 353,3 | 75 | 4,7 | | |

Durante la experiencia EXP-99, si bien ninguno de los tratamientos mostró en forma individual valores de VTP significativamente ($p < 0,05$; LSD) diferente a los presentados por los individuos control. A pesar de ello, los valores de VTP en los individuos expuestos a 1 μg Cd/L fueron siempre mayores (24% en promedio), indicando que la respuesta de los valores de VTP hepático se correspondió a la exposición al Cd(II). En los peces expuesto a 10 μg Cd/L los valores de VTP fueron similares o menores (en especial al final del experimento decrecieron hasta un 40%) a los valores de VTP observados en los blancos, hecho que sólo puede ser interpretado integrando esta información con la obtenida en EXP-00.

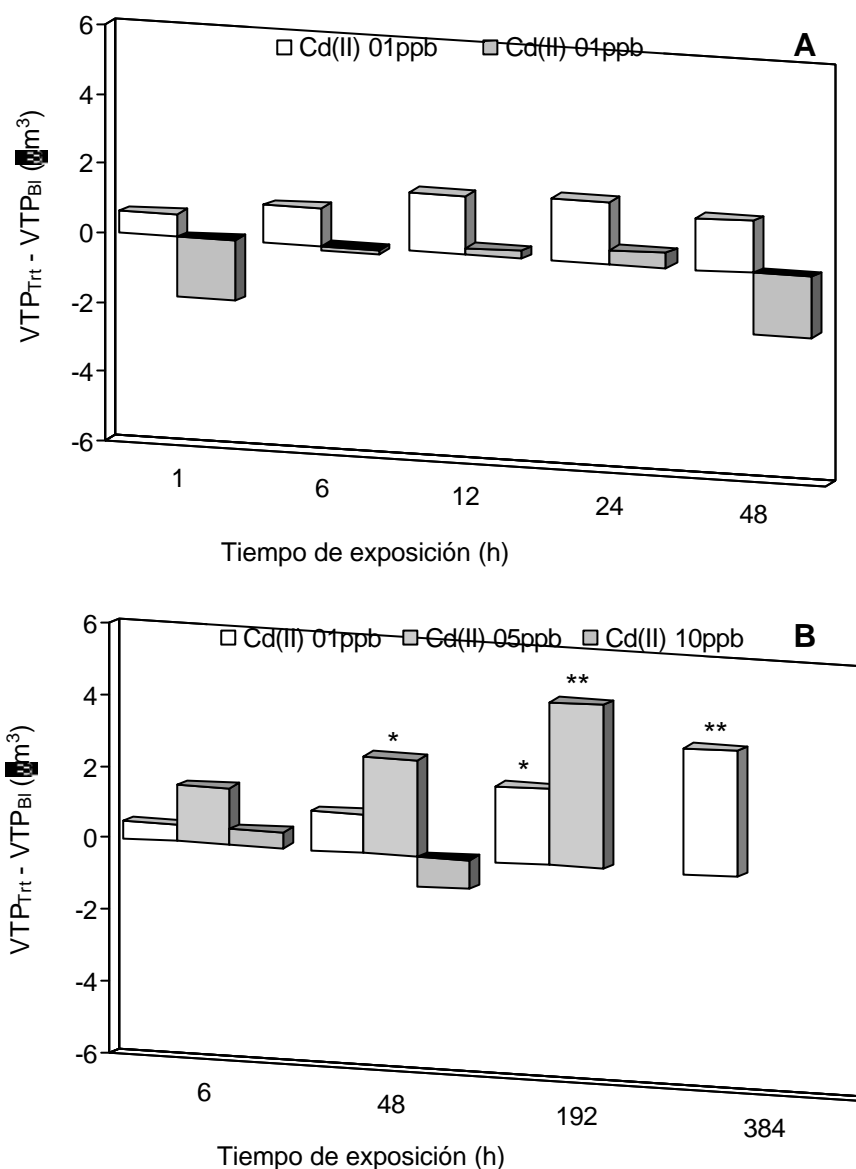


Figura VII.19. Respuesta del VTP en el hígado de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cd(II).

Diferencia de valores de VTP hepático entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cd(II) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-99, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cd(II) ensayadas. * y ** diferencia significativa ($p < 0,05$) y altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

Los valores de VTP en los pejerreyes expuestos durante la experiencia EXP-00 (más prolongada) mostraron un comportamiento semejante respecto a los niveles de Cd(II) en el agua, a los expuestos en EXP-99. Los peces expuestos a $1 \mu\text{g Cd(II)/L}$ mostraron un incremento de los valores de VTP con el tiempo de exposición, haciéndose significativamente ($p < 0,05$; LSD) mayores al valor presentado por los pejerreyes control a partir de las 192h de exposición e incrementándose hasta un 69% hacia las 348h. En

los peces expuestos a 5 µg Cd/L esta tendencia se vio incrementada tanto en función de la concentración de Cd(II) (respuesta más acentuada) como del tiempo de exposición (respuesta más rápida), observándose diferencias significativas ($p < 0,05$; LSD) respecto a los controles ya a partir de las 48h de exposición llegando a incrementarse hasta un 67% al final del ensayo. A pesar de que el ANOVA-bifactorial (3 x 3) no mostró interacción entre el factor concentración de Cd(II) y factor tiempo, probablemente debido a la variabilidad de los datos, el gráfico es bastante elocuente respecto al incremento de efecto sobre los valores de VTP que causa la interacción entre estas dos variables. Por otro lado, los valores de VTP en los individuos expuestos a 10 µg Cd/L presentaron una reversión de la tendencia observada en las concentraciones previas, observándose una desaparición del efecto del Cd(II) sobre los valores de VTP, siendo estos (al igual que lo ocurrido en el experimento EXP-99) similares o menores a los observados en los peces control (2% menores en promedio).

Tabla VII.10. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|---------|----|---------|---------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 4073,64 | 1 | 4073,64 | 1159,67 | 0,000 |
| | Tiempo | 189,32 | 3 | 63,11 | 17,97 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) | 43,47 | 1 | 43,47 | 12,38 | 0,001 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 13,78 | 3 | 4,59 | 1,31 | 0,285 |
| | Error | 140,51 | 40 | 3,51 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 6279,47 | 1 | 6279,47 | 1427,68 | 0,000 |
| | Tiempo | 114,20 | 2 | 57,10 | 12,98 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) | 87,56 | 2 | 43,78 | 9,95 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 10,83 | 4 | 2,71 | 0,62 | 0,654 |
| | Error | 197,93 | 45 | 4,40 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 6200,33 | 1 | 6200,33 | 1433,45 | 0,000 |
| | Tiempo | 71,42 | 1 | 71,42 | 16,51 | 0,000 |
| | Conc. Cd(II) | 45,22 | 3 | 15,07 | 3,49 | 0,024 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 9,43 | 3 | 3,14 | 0,73 | 0,542 |
| | Error | 173,02 | 40 | 4,33 | | |

Las concentraciones de Cd(II) en el hígado que indujeron el VTP fueron muy pequeñas, siendo en algunos casos la sensibilidad de la respuesta del parámetro mayor a la del método para determinar los niveles del metal en el tejido. La mayor diferencia de concentración de Cd(II) detectable en el tejido que causó un incremento de los valores del VTP fue 0,435 nmol/g (PH), mientras que ya a una diferencia de 1,115 nmol/g (PH) los valores de VTP se vieron inhibidos.

La explicación a este comportamiento de los valores de VTP en el hígado respecto a las concentraciones de Cd(II) se corresponden con estudios previos donde se observó que concentraciones de Cd(II) menores a 1 μM inducían la actividad sintética, el crecimiento y la proliferación celular en varios tipos celulares, mientras que concentraciones mayores inhibían estos procesos (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Además se observó que la inducción causada por tan bajas concentraciones de Cd(II) es muy rápida, motivo por el cual se cree que el mecanismo involucrado en la misma implicaría la estimulación de receptores de membrana (ej, receptores de lectinas; Chen y Smith, 1992) que mediante la fosfolipasa C activarían la ruta regulatoria del inositol-3-fosfato y el diacilglicerol que mediante el incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular (Smith, *et al.*, 1989; Hague *et al.*, 2000) activan a la proteinquinasa C (Block *et al.*, 1992), y probablemente la Ca^{+2} /calmodulinquinasa. Esta vía fosforila factores de transcripción que finalmente conducen a la inducción de genes que aumentan la actividad sintética, el crecimiento y la proliferación celular, como por ejemplo mediante los "genes tempranos" (c-fos, c-jun, c-myc; Tang y Enger, 1993; Matsuoka y Call, 1995). Este mecanismo podría estar actuando indirecta o directamente sobre la actividad nucleolar, ya que se ha observado que la fosforilación es un importante mecanismo de regulación, a nivel de los procesos de transcripción, procesamiento, ensamble y tránsito, durante la biogénesis de los ribosomas (Leary y Huang, 2001). Además, se ha observado que el factor de transcripción Myc actúa directamente aumentando los niveles de nucleolina (Nsr1p) y nucleofosmina (B23/NO38) junto a otros conjunto de proteínas multifuncionales involucradas en el ensamble y el tránsito intranuclear de las partículas pre-ribosomales (Greasley *et al.*, 2000; Boon *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha detectado que bajas concentraciones de Cd(II) son capaces de inhibir proteínas regulatorias con "dedos de cinc" como por ejemplo el represor de tumores p53 (Meplan *et al.*, 1999) o activar "elementos de respuesta" en genes específicos, estimulando la síntesis de determinadas proteínas (ej metalotioneínas; Koizumi *et al.*, 1992; hemo-oxigenasa; Takeda *et al.*, 1995). Estos mecanismos de inducción génica con la consecuente activación de la proliferación celular a bajas concentraciones de Cd han sido tomados como posible explicación del efecto carcinogénico del Cd (Beyersmann y Hechtenberg, 1997).

El retorno del VTP a valores similares a los de los individuos control, no debería interpretarse aquí como una desaparición del efecto del Cd al aumentar su concentración, sino que debiera entenderse como la aparición de los mecanismos

inhibitorios descritos en la bibliografía y observados en la branquia en respuesta a altas concentraciones de Cd, que comienzan a prevalecer sobre los mecanismos de inducción causados por bajos niveles del metal, produciendo una aparente “neutralización” del efecto.

De acuerdo a los resultados obtenidos en relación con la respuesta nucleolar en el hígados de *O. bonariensis* y a los antecedentes bibliográficos, el incremento observado en el VTP hepático estaría indicando la ausencia de síntomas de hepatotoxicidad en los pejerreyes expuestos a las concentraciones subletales de Cd(II) ensayadas. De todos modos, debe remarcarse que esta exaltación significativa de la actividad nucleolar no es normal y en consecuencia podría considerarse como un indicador de la capacidad del Cd de inducir oncogenes con la consecuente probabilidad de disparar efectos carcinogénicos en las células hepáticas de los pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de este metal.

VII.e.2.2. Respuesta del NTP hepático

El análisis del efecto de la concentración de Cd(II) y el tiempo de exposición sobre los valores de NTP (Figura VII.20.) en el hígado de *O. bonariensis* indica que el parámetro fue afectado significativamente ($p < 0,05$ ANOVA-bifactorial; Tabla VII.11. y VII.12.) por la concentración del metal tanto en EXP-99 como en EXP-00. El tiempo sólo afectó los valores de NTP en EXP-99 y únicamente se observó interacción entre ambos factores en el ANOVA-bifactorial (2 x 4) del experimento EXP-00.

Tabla VII.11. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-99.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|-------|----|-------|--------|--------------|
| (3 x 5) Intersección | 201,3 | 1 | 201,3 | 3049,5 | 0,000 |
| Tiempo | 1,2 | 4 | 0,3 | 4,5 | 0,003 |
| Conc. Cd(II) | 0,6 | 2 | 0,3 | 4,8 | 0,011 |
| Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,2 | 8 | 0,0 | 0,4 | 0,934 |
| Error | 5,0 | 75 | 0,1 | | |

Cuando se observan en particular los valores de NTP obtenidos en el experimento EXP-99, resulta complejo interpretar los resultados arrojados por el análisis estadístico puesto que no es posible visualizar una tendencia clara de los valores de NTP en función de la concentración del metal o del tiempo de exposición y sólo los individuos

expuestos a 1 $\mu\text{g Cd(II)/L}$ durante 6h mostraron valores significativamente menores al de los individuos control. Sólo es posible notar que respecto a los valores de NTP en los individuos control, los valores presentados por los individuos expuestos a 1 $\mu\text{g Cd(II)/L}$ fueron siempre menores (9% en promedio) mientras que en los peces expuestos a 10 $\mu\text{g Cd(II)/L}$ fueron siempre mayores (4% en promedio). Estas diferencias, si bien mínimas, parecieron ser suficientes respecto a la variabilidad del parámetro como para aparecer como significativas en el análisis estadístico.

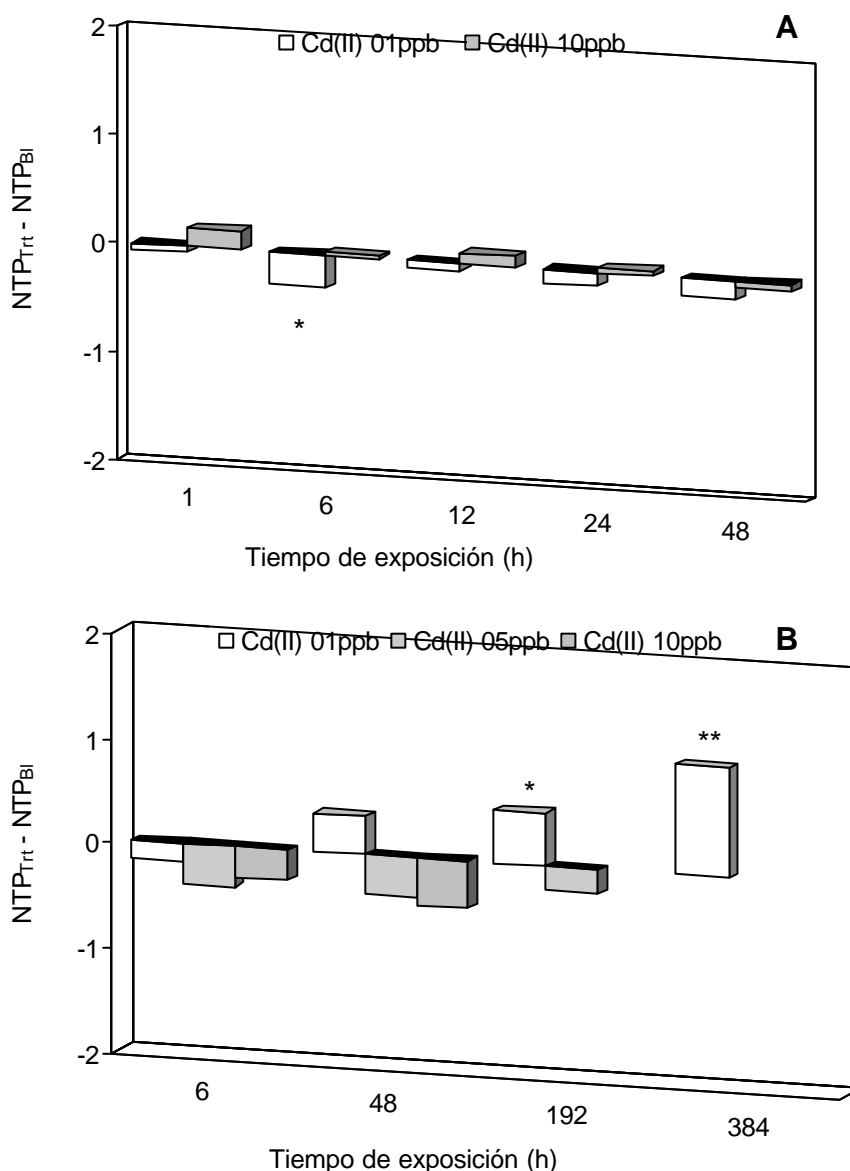


Figura VII.20. Respuesta del NTP en el hígado de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cd(II).

Diferencia de valores de NTP hepático entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cd(II) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-99, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cd(II) ensayadas. * y ** diferencia significativa ($p < 0,05$) y altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

Durante la experiencia EXP-00 (Panel B, Figura VII.20.), los valores de NTP mostraron un comportamiento opuesto al observado durante la experiencia EXP-99. En los peces expuestos a 1 µg Cd(II)/L, los valores de NTP se fueron incrementando con el tiempo de exposición, haciéndose significativamente mayores ($p = 0,046$; LSD) a los de los individuos control a partir de las 192h de ensayo, incrementándose hasta un 46% a las 348h. Contrariamente, los valores de NTP en bs pejerreyes expuestos a 5 y 10 µg Cd(II)/L fueron siempre menores (12 y 14% en promedio respectivamente) a los presentados por los controles, pero nunca las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$; LSD) respecto a los controles ni entre ellas.

Tabla VII.12. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|--------|----|--------|---------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 371,05 | 1 | 371,05 | 1924,96 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,21 | 3 | 0,07 | 0,36 | 0,780 |
| | Conc. Cd(II) | 2,32 | 1 | 2,32 | 12,02 | 0,001 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 2,31 | 3 | 0,77 | 3,99 | 0,014 |
| | Error | 7,71 | 40 | 0,19 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 369,24 | 1 | 369,24 | 1722,60 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,15 | 2 | 0,07 | 0,35 | 0,709 |
| | Conc. Cd(II) | 2,85 | 2 | 1,43 | 6,65 | 0,003 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,90 | 4 | 0,22 | 1,05 | 0,394 |
| | Error | 9,65 | 45 | 0,21 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 302,13 | 1 | 302,13 | 1141,70 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,10 | 1 | 0,10 | 0,39 | 0,537 |
| | Conc. Cd(II) | 2,20 | 3 | 0,73 | 2,77 | 0,054 |
| | Conc. Cd(II) x Tiempo | 0,81 | 3 | 0,27 | 1,02 | 0,394 |
| | Error | 10,59 | 40 | 0,26 | | |

De acuerdo a los resultados previos, la respuesta en el NTP hepático no muestra un comportamiento claro en función del Cd(II), mostrando además una tendencia diferente de un ensayo a otro. La reducción temporaria del NTP observada a las 6h durante la primera experiencia podría interpretarse del mismo modo que como se ha planteado en la branquia, mientras que el aumento en los valores de este parámetro en función del tiempo en los peces expuestos a 1µgCd(II)/L durante la segunda experiencia, como una activación de nuevas NOR probablemente como respuesta a los mecanismos de inducción génica planteados previamente para las bajas concentraciones de Cd(II). La

diferencia entre ensayos pareciera indicar una sensibilidad al Cd mayor en los individuos de la experiencia EXP-99.

VII.e.3. *Relación entre la respuesta hallada en la actividad nucleolar branquial y hepática de O. bonariensis frente al Cd(II).*

De los dos parámetros nucleolares estudiados, el VTP fue el más claramente afectado por el Cd(II) en ambos tejidos, tanto en función de la concentración como del tiempo de exposición. Contrariamente, el NTP (excepto en los individuos expuestos a 1 µg Cd(II)/L durante EXP-00) no presentó un relación dosis-respuesta clara en ninguno de los tejidos y su respuesta fue generalmente temporaria.

Al comparar el efecto causado por el Cd(II) sobre el VTP en la branquia y en el hígado, se observa que, en varios aspectos, éste fue diferente en cada uno de los tejidos estudiados. En la branquia el efecto fue más rápido (desde las 6h de exposición; Figura VII.17) y en todos los casos los valores de VTP decrecieron alcanzando un nuevo valor de equilibrio significativamente menor respecto al de los individuos control. Por el contrario, en el hígado el efecto fue más retardado (desde las 48h de exposición; Figura VII.19) y mientras las concentraciones más bajas (1-5 µg Cd(II)/L) causaron un aumento de los valores de VTP, la más alta (10 µg Cd(II)/L) no produjo modificación aparente de los valores del parámetro o tendió a causar una reducción de los mismos.

Este efecto diferencial del Cd(II) sobre la branquia y el hígado puede ser explicado principalmente por el nivel de exposición disímil al que se ha visto sometido cada uno de los tejidos. Los niveles de Cd(II) hallados en la branquia fueron aproximadamente entre 5 a 17 veces mayores que en el hígado (ver Tabla V.7, Capítulo V), hecho lógico, puesto que en la branquia la exposición es directa y es este tejido el que representa la primera barrera y a su vez la principal puerta de entrada del metal al organismo. Tal diferencia en el nivel de exposición al Cd(II), resulta crítica para comprender la respuesta particular observada en cada uno de los tejidos, puesto que como se explicara previamente, varios estudios revisados por Beyersmann y Hechtenberg (1997) demuestran que concentraciones del metal inferiores a 1 µM estimulan la proliferación celular, mientras que concentraciones superiores la inhiben. En consecuencia los procesos sintéticos de la célula, entre ellos la actividad nucleolar, se verán estimulados o inhibidos dependiendo de la concentración intracelular del cadmio.

El mismo fenómeno también fue observado en el molusco *Crassostrea virginica*, donde la relación ARN/ADN en individuos expuestos a 0,005 μM de Cd(II) se ve incrementada respecto a los controles, que en individuos expuestos a 0,01 μM de Cd(II) no presenta diferencias aparentes, mientras que en individuos expuestos a 0,04 y 0,2 μM de Cd(II), donde la capacidad complejante de las metalotioneínas ha sido sobrepasada, se ve drásticamente reducida (Roesijadi *et al.*, 1995). En consecuencia, el efecto diferencial del Cd sobre la actividad sintética de la célula en función de su concentración pareciera tratarse de un fenómeno generalizable a otros grupos de animales, y por lo tanto representa un mecanismo plausible para la explicación de las diferencias en el comportamiento hallado en el VTP branquial y hepático de *O. bonariensis*.

El comportamiento del NTP en la branquia y el hígado de los pejerreyes expuestos a Cd(II) en ninguno de los dos tejidos mostró una respuesta clara en función a la exposición al metal. En ambos tejidos su respuesta fue temporaria y no guardó relación con el nivel de Cd(II) en el tejido. En un sólo caso el NTP hepático mostró un comportamiento diferente incrementándose con el tiempo de exposición. El posible mecanismo por el cual el Cd pudiera estar afectando este parámetro no es claro, como se mencionara previamente, su reducción temporaria podría atribuirse a daño en secuencias específicas del ADNr, que reduzcan el número de nucleolos por la desactivación de NORs o por el cambio de patrón de segregación, y que luego estas secuencias pudieran ser reparadas o reemplazadas por la activación de otras de las tantas copias de ADNr que permanecen inactivas, restableciendo así en número de NORs activas o alternativamente su patrón de segregación.

VII.f Respuesta de la actividad Nucleolar en la branquia y el hígado de O. bonariensis frente al Cr(VI).

En las secciones anteriores se han expuesto los resultados obtenidos de estudio del comportamiento de los dos parámetros nucleolares seleccionados, tanto en organismos no expuestos como en organismos expuestos a concentraciones subletales de Cd(II). A continuación se exponen y discuten los resultados obtenidos a partir de dos ensayos EXP-98 y EXP-00 donde se evaluó la respuesta de los parámetros nucleolares VTP y NTP en la branquia y el hígado de juveniles de *O. bonariensis* expuestos a concentraciones subletales de Cr(VI) en el agua por periodos máximos de 48 y 384h.

VII.f.1. Efecto del Cr(VI) sobre la actividad nucleolar en la branquia.

En primer lugar se presentarán las respuestas obtenidas en los valores de VTP y NTP en las células del epitelio branquial de los pejerreyes expuestos a 100 y 1000 μg Cr(VI)/L durante la experiencia EXP-99.

VII.f.1.1. Respuesta del VTP branquial

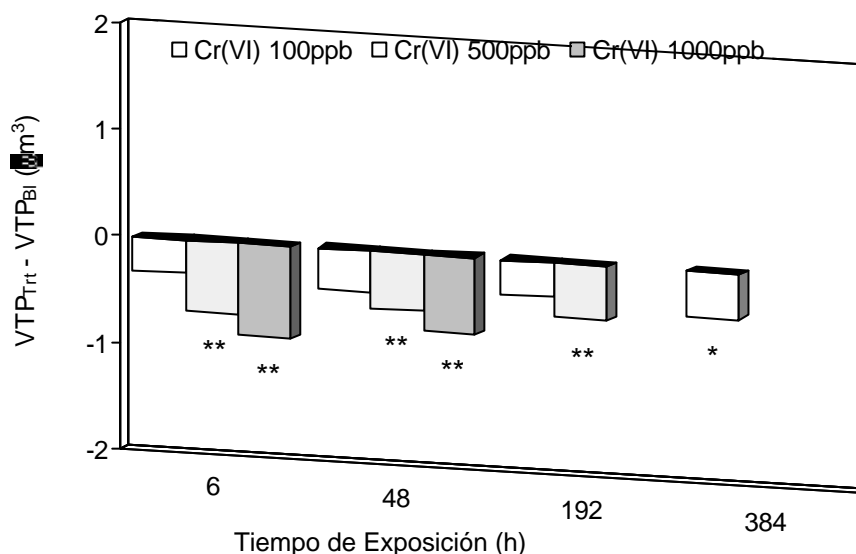


Figura VII.21. Respuesta del VTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI).

Diferencia de valores de VTP branquial entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cr(VI) durante diferentes tiempos de exposición. EXP-00, series: concentraciones nominales de Cr(VI) ensayadas. * y ** diferencia significativa ($p < 0,05$) y altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

El VTP en la branquia de *O. bonariensis* (Figura VII.21.) fue afectado significativamente por la concentración de Cr(VI) y el tiempo de ensayo ($p < 0,005$; ANOVA-bifactorial, Tabla VII.13.). No se observó interacción entre los dos factores evaluados, a excepción del modelo 3 x 3 del ANOVA-bifactorial que mostró una interacción significativa entre la concentración de Cr(VI) y el tiempo. Los valores de VTP en la branquia de los individuos expuestos a las tres concentraciones ensayadas mostraron un descenso respecto a los valores de los individuos control y este fue mayor y más temprano cuanto mayor la concentración de Cr(VI). Por otro lado, la respuesta no se vio

incrementada en función del tiempo de exposición indicando que la respuesta en el VTP se produjo rápidamente (entre las 6 y 48 de exposición) y luego se mantuvo en un nuevo valor de equilibrio.

Tabla VII.13. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para la branquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|-------|----|-------|---------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 83,00 | 1 | 83,00 | 1124,93 | 0,000 |
| | Tiempo | 7,90 | 3 | 2,63 | 35,69 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 1,30 | 1 | 1,30 | 17,68 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,02 | 3 | 0,01 | 0,09 | 0,968 |
| | Error | 2,36 | 32 | 0,07 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 96,43 | 1 | 96,43 | 1268,56 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,09 | 2 | 0,04 | 0,57 | 0,571 |
| | Conc. Cr(VI) | 2,80 | 2 | 1,40 | 18,42 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 6,53 | 4 | 1,63 | 21,48 | 0,000 |
| | Error | 2,74 | 36 | 0,08 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 95,13 | 1 | 95,13 | 1084,58 | 0,000 |
| | Tiempo | 3,95 | 1 | 3,95 | 45,04 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 3,51 | 3 | 1,17 | 13,32 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,08 | 3 | 0,03 | 0,32 | 0,815 |
| | Error | 2,81 | 32 | 0,09 | | |

Así los individuos expuestos a 100 µg Cr(VI)/L mostraron un descenso significativo respecto a los controles a partir de las 48h de exposición y luego la diferencia se mantuvo cercana al límite de significancia hasta el final del experimento con valores en promedio un 27% menores al de los controles. La respuesta en los pejerreyes expuestos a 500 y 1000 µg Cr(VI)/L fue más rápida, mostrando un descenso significativo ya a partir de las 6h de exposición. Luego los valores de VTP se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del ensayo observándose un efecto mayor en los peces expuestos a la mayor concentración. La reducción en los valores de VTP en los pejerreyes expuestos a 500 y 1000 µg Cr(VI)/L fue en promedio de un 33 y 41% respectivamente.

Cuando se relaciona el efecto observado sobre el VTP branquial, con los niveles del metal acumulados en el tejido, se observa que el menor incremento detectable en los niveles de Cr, respecto a los organismos control, que produjo una reducción significativa en el VTP, fue de 1,76 nmol/g (PH).

La reducción del VTP branquial, se corresponde con la capacidad de inhibición de la actividad sintética, el crecimiento y la proliferación celular observada para el Cr(VI) que en general conduce a la muerte programada de la célula por apoptosis. Por ejemplo en cultivos de células CHO tratadas con 150 y 300 μM de cromato de sodio la eficiencia para formar colonia se redujo hasta en un 95% con una disminución de la síntesis de ADN y proteínas de hasta un 81 y 40% respectivamente, observándose patrones de apoptosis en el 90% de las células desprendidas (Blankenship, *et al.* 1994). Otros dos estudios realizados en cultivos primarios de linfocitos tratados con concentraciones de Cr(VI) 5 y 25 μM (como CrO_4^{2-}) o de hasta 200 μM (como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), observaron el mismo efecto dado por una reducción de la viabilidad y un aumento en la inhibición de la síntesis de ADN en función de la concentración de Cr(VI) y del tiempo de exposición, causando apoptosis hasta en un 90% de las células (Rajaram *et al.*, 1995; Vasant *et al.*, 2001).

Esta propiedad inhibitoria de las funciones sintéticas de la célula del Cr(IV) puede explicarse sobre la base de la capacidad de dañar el ADN que presenta el metal y relación entre el nucleolo y la proteína supresora de tumores p53. La relación entre el Cr y la p53 queda evidenciada a partir de trabajos donde se ha observado que el "elemento de respuesta" P53 es inducido por el Cr(VI) (Tully *et al.*, 2000) y que ratones deficientes de este gen son más susceptibles a este metal (Bagchi *et al.*, 2002). También se ha podido establecer la respuesta de la proteína p53 frente a daños en el ADN (Kastan *et al.*, 1991). Así mismo, se ha probado que el Cr(VI), luego de incorporado por la célula, es capaz de ser reducido intracelularmente (Wetterhahn, 1979) y dañar el ADN principalmente mediante la formación de aductos ternarios constituidos por el Cr(III) con el ADN y alternativamente con el glutatión (Liu y Dixon, 1996), la cisteína (Zhitkovich *et al.*, 2001) o el ácido ascórbico (Quievryn *et al.*, 2003). La vinculación entre el nucleolo y la proteína p53, ha quedado evidenciado en un estudio donde se demuestra que disfunciones en la biosíntesis de ribosomas no pueden ser independizadas del arresto celular mediado por la proteína p53 (Pestov *et al.*, 2001). La relación entre el daño en el ADN, la proteína p53 y el nucleolo, ha sido establecida en un estudio donde el metanosulfonato, un compuesto que daña el ADN y estabiliza la proteína p53, causó la reducción en los niveles de ARNm de proteínas involucradas a nivel del procesamiento y ensamble de las partículas pre-ribosomales (Jelinsky y Samson, 1999). Un estudio reciente, ha logrado integrar toda esta información y demostrar que la disrupción de las funciones nucleolares, por ejemplo producto de

daño en el ADN, inducen el aumento de los niveles de p53 que conducen al arresto del ciclo celular, postulando así al nucleolo como un *sensor de estrés* (Rubbi y Milner, 2003). Los resultados obtenidos en los estudios mencionados previamente, se corresponden con la respuesta observada a nivel del VTP y brindan un sustento molecular a las observaciones morfológicas halladas en el presente estudio.

Por lo tanto, la reducción del VTP en la branquia de los pejerreyes expuestos a Cr(VI), estaría indicando en mayor medida la disrupción de las funciones nucleolares en respuesta al daño en el ADN, producto de la reducción intracelular del metal a Cr(III), que conducirían a la represión de las actividades sintéticas de la célula debido a la inducción de arresto del ciclo celular mediado por la proteína p53.

VII.f.1.2. Respuesta del NTP branquial

Los resultados obtenidos del análisis de la respuesta del NTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI) (Figura VII.22.), indican que ni la concentración del metal ni el tiempo de ensayo afectaron significativamente los valores de este parámetro (Tabla VII.14.). Tampoco se observó ningún tipo de interacción entre ambos factores.

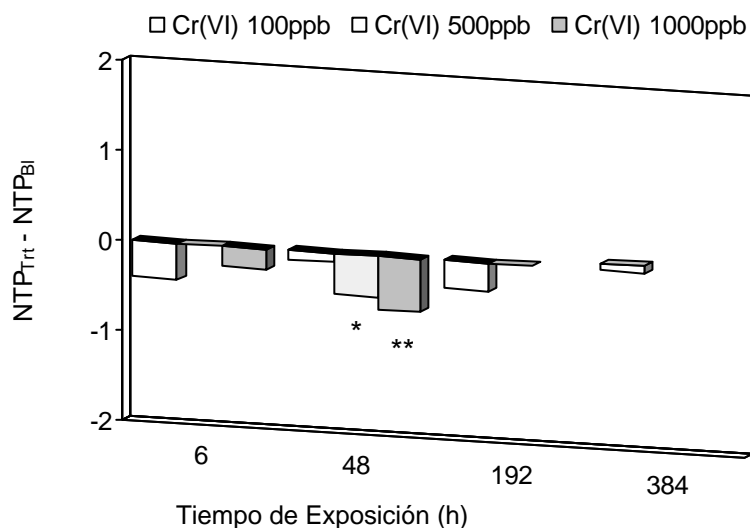


Figura VII.22. Respuesta del NTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI).

Diferencia de valores de NTP branquial entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cr(VI) durante diferentes tiempos de exposición. EXP-00, series: concentraciones nominales de Cr(VI) ensayadas. * y ** diferencia significativa ($p < 0,05$) y altamente significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo control. N = 6.

Pese a la ausencia de efecto indicada por los modelos de ANOVA-bifactorial evaluados, puede observarse una tendencia general a la reducción de los valores de NTP en los peces expuestos a Cr(VI) respecto al de los individuos control, con valores significativamente menores en los individuos sometidos a 500 y 1000 µg Cr(VI)/L durante 48h. Los pejerreyes expuestos a la máxima concentración presentaron la máxima respuesta a las 48h con una reducción del 22,8% en los valores de NTP. Luego de las 48h, en los peces expuestos a 500 µg Cr(VI)/L, el efecto se revirtió retornando a los valores normales.

Al igual que como se interpretó la respuesta del NTP en la branquia de los pejerreyes expuestos a Cd(II), en los peces expuesto a Cr(VI), una explicación posible al descenso transitorio del NTP podría atribuirse a una inactivación de NORs producto del daño directo sobre el DNAr inducido por el Cr o cambio en el patrón de segregación de los nucleolos, que pudieran ser posteriormente revertidos por reparación o algún otro mecanismo que restituyera el patrón de segregación.

Tabla VII.14. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para la branquia de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | SS | v | MS | F | p | |
|---------|-----------------------|--------|----|--------|---------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 235,41 | 1 | 235,41 | 1774,96 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,43 | 3 | 0,14 | 1,07 | 0,376 |
| | Conc. Cr(VI) | 0,32 | 1 | 0,32 | 2,42 | 0,130 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,35 | 3 | 0,12 | 0,87 | 0,468 |
| | Error | 4,24 | 32 | 0,13 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 256,37 | 1 | 256,37 | 2029,99 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,01 | 2 | 0,00 | 0,02 | 0,978 |
| | Conc. Cr(VI) | 0,53 | 2 | 0,27 | 2,11 | 0,137 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,90 | 4 | 0,23 | 1,79 | 0,152 |
| | Error | 4,55 | 36 | 0,13 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 215,34 | 1 | 215,34 | 2003,35 | 0,000 |
| | Tiempo | 0,03 | 1 | 0,03 | 0,29 | 0,597 |
| | Conc. Cr(VI) | 0,83 | 3 | 0,28 | 2,57 | 0,072 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,92 | 3 | 0,31 | 2,86 | 0,052 |
| | Error | 3,44 | 32 | 0,11 | | |

VII.f.2. Efecto del Cr(VI) sobre la actividad nucleolar en el hígado.

Luego de haber presentado los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la respuesta de los parámetros nucleolares VTP y NTP en la branquia cuando los pejerreyes fueron expuestos a diferentes concentraciones subletales de Cr(VI), a continuación se exponen los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la respuesta del VTP y NTP en el tejido hepático de los organismos estudiados en el ensayo EXP-00 y de pejerreyes ensayados en otra experiencia complementaria (EXP-98) donde se evaluó la respuesta del VTP y NTP hepático frente a la exposición de los organismos a 1000 µg Cr(VI)/L durante 4h.

VII.f.2.1. Respuesta del VTP hepático

Los resultados obtenidos en relación a la respuesta del VTP hepático en los pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de Cr(VI) en el agua (Figura VII.23.) variaron entre los dos ensayos realizados.

Tabla VII.15. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-98.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|---------|----|---------|--------|--------------|
| (3 x 5) Intersección | 24762,7 | 1 | 24762,7 | 1216,4 | 0,000 |
| Tiempo | 3507,7 | 3 | 1169,2 | 57,4 | 0,000 |
| Conc. Cr(VI) | 151,9 | 1 | 151,9 | 7,5 | 0,008 |
| Conc. Cr(VI) x Tiempo | 144,2 | 3 | 48,1 | 2,4 | 0,081 |
| Error | 1140,0 | 56 | 20,4 | | |

La experiencia EXP-98 mostró una mayor sensibilidad en la respuesta del VTP hepático, observándose un efecto significativo de la concentración de Cr(VI) y del tiempo de ensayo sobre los valores de este parámetro nucleolar (ANOVA-bifactorial; Tabla VII.15.). Sin embargo no se observó interacción entre ambos factores, indicando que el VTP rápidamente encuentra un nuevo valor de equilibrio diferente al de los individuos control. En particular (Panel A; Figura VII.23.) se observa que los valores de VTP disminuyen tempranamente mostrando una reducción significativa ($p < 0,05$; LSD) desde la hora de exposición y que luego se estabilizó en valores que en promedio fueron 24% menores a los hallados para los peces no expuestos.

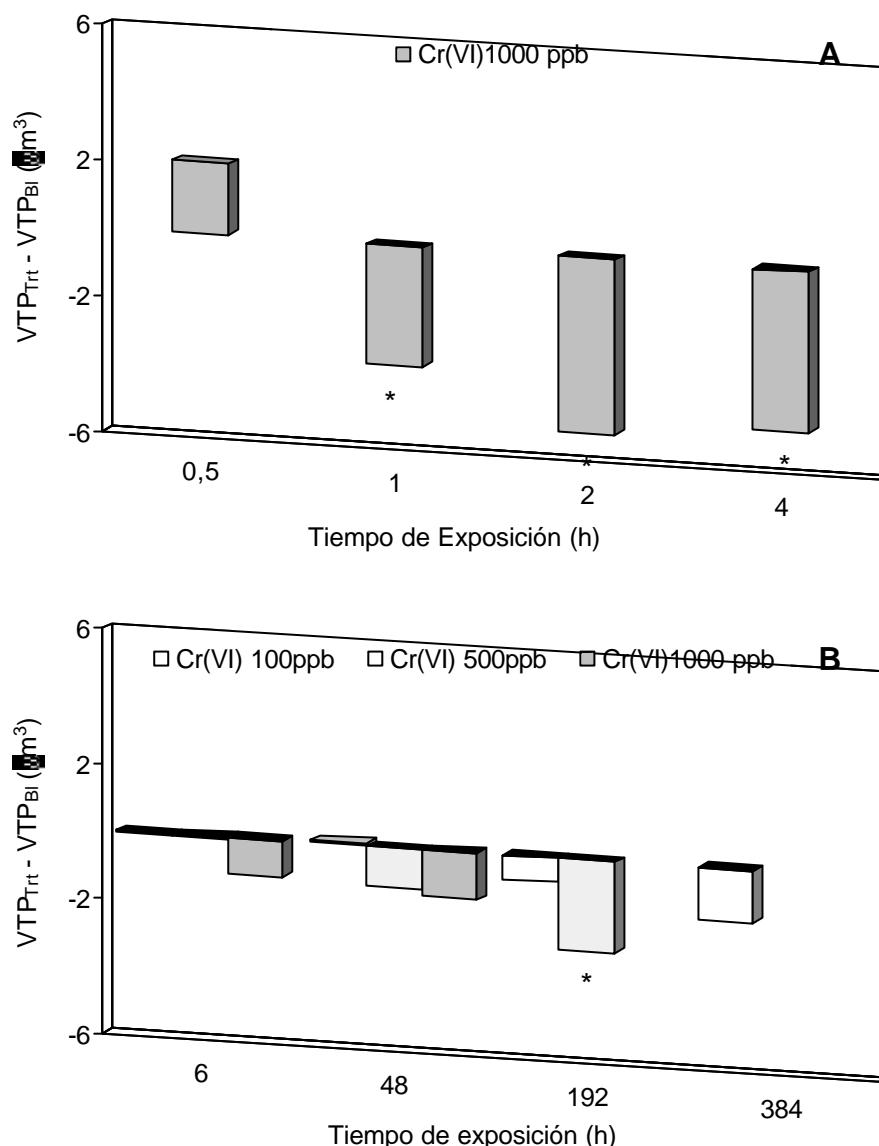


Figura VII.23. Respuesta del VTP en el hígado de *O. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI).

Diferencia de valores de VTP hepático entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cr(VI) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-98, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cr(VI) ensayadas. * diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo control. N = 6.

Durante la experiencia EXP-00, si bien la tendencia observada fue similar a la observada en EXP-98, la respuesta mostrada por los valores de VTP fue más tardía y menos marcada que en experimento previo. Por consiguiente ninguno de los modelos estadísticos evaluados a priori indicó un efecto significativo de la concentración de Cr(VI) sobre el VTP (ANOVA-bifactorial, Tabla VII.16.). Sin embargo la prueba a posteriori muestra una reducción significativa ($p < 0,05$; LSD) de los valores en los peces

expuestos a 500 µg Cr(VI)/L luego de 192h de exposición, con valores 39% menores a los normales. Además si se realiza un ANOVA-bifactorial más acotado, considerando un modelo (3 x 2) entre los valores de VTP obtenidos en los peces control y los expuestos a 100 y 500 µg Cr(VI)/L durante 48 y 192h se obtiene un efecto significativo ($p = 0.024$; ANOVA-bifactorial (3 x 2)) de la concentración de Cr(VI) sobre el parámetro estudiado. Esto puede explicarse como consecuencia del desfase entre el modelo estadístico utilizado (lineal) y la respuesta biológica estudiada (sigmoidea) en el intervalo de tiempos y concentraciones ensayadas. En tal sentido, puede verse (Panel B; Figura VII.19.) que la porción lineal de la respuesta biológica comenzaría a partir de las 48h de exposición. La demora en la respuesta se correspondería con el retardo observado en la cinética de incorporación del Cr en el hígado (Ver Capítulo V).

Tabla VII.16. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de VTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|---------|----|---------|--------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 3532,60 | 1 | 3532,60 | 867,77 | 0,000 |
| | Tiempo | 287,25 | 2 | 143,62 | 35,28 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 13,09 | 2 | 6,54 | 1,61 | 0,214 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 11,41 | 4 | 2,85 | 0,70 | 0,597 |
| | Error | 146,55 | 36 | 4,07 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 3563,34 | 1 | 3563,34 | 921,25 | 0,000 |
| | Tiempo | 297,80 | 2 | 148,90 | 38,50 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 14,73 | 2 | 7,36 | 1,90 | 0,164 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 9,53 | 4 | 2,38 | 0,62 | 0,654 |
| | Error | 139,25 | 36 | 3,87 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 4202,15 | 1 | 4202,15 | 936,69 | 0,000 |
| | Tiempo | 87,49 | 1 | 87,49 | 19,50 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 10,49 | 3 | 3,50 | 0,78 | 0,514 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 2,31 | 3 | 0,77 | 0,17 | 0,915 |
| | Error | 143,56 | 32 | 4,49 | | |

Al relacionar la respuesta del VTP hepático con los niveles de Cr hallados en el tejido, se observa que la menor diferencia de concentración de Cr en el tejido de los organismos expuestos respecto a los controles, capaz de inducir un descenso significativo de los valores de VTP, fue de 2,13 nmol/g en los individuos expuestos a 500 µgCr(VI)/L luego de 192h de exposición. Un hecho curioso fue que la diferencia de concentración a las 48h de exposición en los individuos expuestos a 1000 µgCr(VI)/L fue de 13,7 nmol/g pero sin embargo no redujo significativamente el valor del VTP.

Los mecanismos que indujeron la reducción del VTP hepático en los pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de Cr(VI) ensayadas, podrían ser equivalentes a los propuestos para explicar el descenso del VTP observado en la branquia. La falta de respuesta a las 48h en los individuos expuestos a 1000 µgCr(VI)/L estaría indicando que la respuesta en el VTP hepático no depende sólo de la concentración sino que también estaría condicionada por el tiempo de exposición, y por lo tanto el tiempo que le toma al Cr, alcanzar una concentración tóxica en el tejido.

VII.f.2.2. Respuesta del NTP hepático

Los valores de NTP en el hígado de *O. bonariensis* (Figura VII.24.) no se vieron afectados significativamente (Tablas VII.17. y VII.18.) por la concentración de Cr(VI) en el agua en ninguno de los dos ensayos realizados (EXP-98 y EXP-00), y sólo se observó un efecto significativo del tiempo en los organismos expuestos en la experiencia EXP-00.

Tabla VII.17. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-98.

| Modelo | SS | v | MS | F | p |
|-----------------------|-------|----|-------|--------|--------------|
| (3 x 5) Intersección | 147,1 | 1 | 147,1 | 1607,2 | 0,000 |
| Tiempo | 0,2 | 3 | 0,1 | 0,6 | 0,599 |
| Conc. Cr(VI) | 0,0 | 1 | 0,0 | 0,3 | 0,617 |
| Conc. Cr(VI) x Tiempo | 0,2 | 3 | 0,1 | 0,9 | 0,456 |
| Error | 5,1 | 56 | 0,1 | | |

Los valores de NTP hepático en los individuos ensayados en EXP-98 no se vieron afectados significativamente por la concentración de Cr(VI) en el agua (Tabla VII.17.) y no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$; LSD) respecto a los controles para ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados (Panel A; Figura VII.24.), siendo éstas siempre menores al 10%. Además, los valores oscilaron por sobre y debajo del de los controles a lo largo del ensayo sin mostrar una tendencia definida, indicando claramente que el parámetro no fue afectado por los niveles de Cr(VI) durante el término del ensayo.

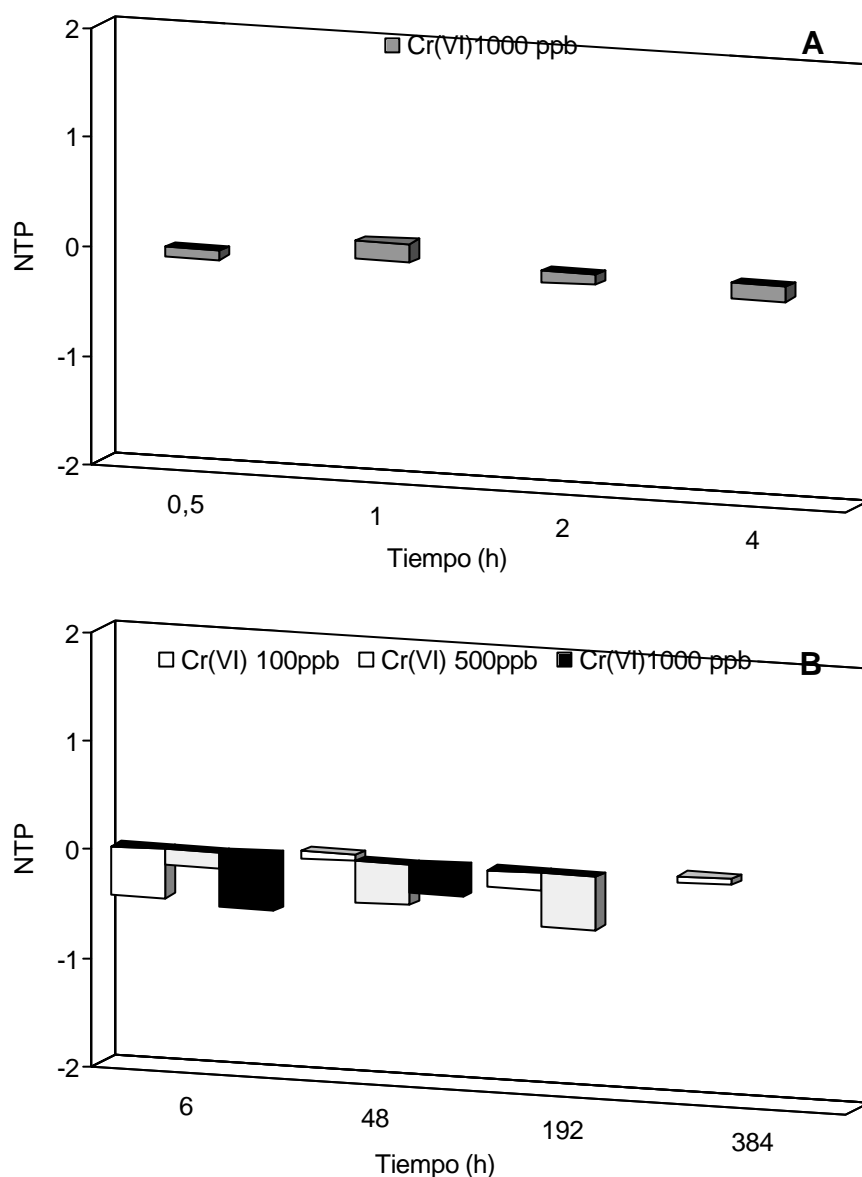


Figura VII.24. Respuesta del NTP en el hígado de *Q. bonariensis* expuesto a concentraciones subletales de Cr(VI).

Diferencia de valores de NTP hepático entre pejerreyes expuestos a distintas concentraciones subletales de Cr(VI) durante diferentes tiempos de exposición. Panel A: EXP-98, Panel B: EXP-00. Series: concentraciones nominales de Cr(VI) ensayadas. N = 6.

Los valores de NTP en los pejerreyes expuestos a Cr(VI) en el ensayo EXP-00 (Panel B; Figura VII.24.) tampoco mostraron efectos significativos en repuesta a los niveles del metal en el agua en ninguno de los tres modelos de ANOVA-bifactorial analizados (Tabla VII.18.). Además, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$; LSD) respecto a los controles para ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados. Los valores de NTP en los pejerreyes expuestos a 100 $\mu\text{g Cr(VI)/L}$ no mostraron una tendencia definida mostrando tanto valores mayores como menores al de los

pejerreyes control. Por otro lado, aunque los valores de NTP en los peces expuestos a 500 y 1000 µg Cr(VI)/L nunca presentaron diferencias significativas respecto e los peces no expuestos, ni mostraron una clara tendencia en función de la concentración y el tiempo de exposición, siempre fueron menores al presentado por los controles, pudiendo estar esto indicando una posible tendencia a la reducción de los valores del parámetro en el hígado en respuesta a la exposición al Cr(VI).

Tabla VII.18. ANOVA-Bifactorial realizado a partir de los valores de NTP obtenidos para el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cr(VI) durante la experiencia EXP-00.

| Modelo | | SS | v | MS | F | p |
|---------|-----------------------|---------|----|---------|--------|--------------|
| (2 x 4) | Intersección | 3532,60 | 1 | 3532,60 | 867,77 | 0,000 |
| | Tiempo | 287,25 | 2 | 143,62 | 35,28 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 13,09 | 2 | 6,54 | 1,61 | 0,214 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 11,41 | 4 | 2,85 | 0,70 | 0,597 |
| | Error | 146,55 | 36 | 4,07 | | |
| (3 x 3) | Intersección | 3563,34 | 1 | 3563,34 | 921,25 | 0,000 |
| | Tiempo | 297,80 | 2 | 148,90 | 38,50 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 14,73 | 2 | 7,36 | 1,90 | 0,164 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 9,53 | 4 | 2,38 | 0,62 | 0,654 |
| | Error | 139,25 | 36 | 3,87 | | |
| (4 x 2) | Intersección | 4202,15 | 1 | 4202,15 | 936,69 | 0,000 |
| | Tiempo | 87,49 | 1 | 87,49 | 19,50 | 0,000 |
| | Conc. Cr(VI) | 10,49 | 3 | 3,50 | 0,78 | 0,514 |
| | Conc. Cr(VI) x Tiempo | 2,31 | 3 | 0,77 | 0,17 | 0,915 |
| | Error | 143,56 | 32 | 4,49 | | |

La falta de respuesta en el NTP de los hepatocitos de *O. bonariensis* expuestos a las concentraciones ensayadas de Cr(VI), podrían explicarse por un lado, como consecuencia de valores del metal en el tejido insuficientemente elevados como para inducir una respuesta a nivel de este parámetro y por otro como consecuencia de la reducción del Cr(VI) en el plasma y los glóbulos rojos (Korallus, 1986; Kerger *et al.*, 1997) y la consecuente reducción de toxicidad que esto acarrea (De Flora, 2000).

VII.f.3. Relación entre la respuesta hallada en la actividad nucleolar branquial y hepática de *O. bonariensis* frente al Cr(VI).

Cuando se comparan las respuestas de los parámetros nucleolares, VTP y NTP, en cada uno de los tejidos estudiados, frente a la exposición de los peces al Cr(VI) se observa que la respuesta fue comparable. En ambos tejidos los valores de VTP

decrecieron en respuesta a la exposición al Cr(VI), observándose una menor sensibilidad y un retardo en la respuesta a nivel hepático. Este retraso en la respuesta del VTP hepático se puede relacionar con el mayor tiempo que le toma al Cr en alcanzar la menor concentración capaz de producir una respuesta sobre este parámetro.

De los dos parámetros nucleolares, el VTP fue el que, en ambos tejidos, presentó una respuesta más clara frente al Cr(VI), mostrando una dependencia con la concentración del elemento. Contrariamente, el NTP sólo fue afectado transitoriamente por el Cr(VI) en la branquia, donde sus valores disminuyeron significativamente hacia las 48h de exposición, mientras que en el hígado sólo mostró una tendencia a la reducción de sus valores, pero sin presentar una clara relación con la dosis del metal.

Como se mencionara en las secciones precedentes, la respuesta del VTP en la branquia y en el hígado podría ser interpretada como producto del mismo mecanismo de acción inducido por el Cr(VI). De los distintos modos de acción descriptos para este metal, el que pareciera ser, en mayor medida, el responsable de la reducción en el VTP de ambos tejidos, es la capacidad del Cr(VI) para inducir daño en el ADN, principalmente debido a la formación de aductos (Zhitkovich *et al.*, 2001), aunque también como producto del estrés oxidativo inducido por los radicales orgánicos formados durante la reducción intracelular del metal (Bagchi *et al.*, 2002). Estudios recientes sostienen que este daño en el ADN es responsable de la disrupción funcional del nucleolo que, por intermedio de un aumento de la proteína p53, induciría a la reducción de la actividad sintética de la célula y al arresto celular, conduciendo finalmente a la muerte por apoptosis (Rubbi y Milner, 2003).

La diferencia en el tiempo de respuesta y la sensibilidad (concentración mínima de Cr en el tejido) en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* expuestos a Cr(VI), observada en relación a los blancos, podría explicarse por un lado, debido al diferente grado de exposición (en la branquia es directa) y por otro, a la rápida reducción del Cr(VI) en el suero y los glóbulos rojos luego de que es incorporado por los epitelios (Kerger *et al.*, 1996; Kerger *et al.*, 1997; Korallus, 1986; Langard *et al.* 1978) y la consecuente pérdida de toxicidad (De Flora, 2000).

VII.g Comparación entre la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* frente al Cd(II) y el Cr(VI).

Cuando se comparan los efectos provocados por cada uno de los metales estudiados sobre la actividad nucleolar en la branquia de *O. bonariensis*, se observa que pese a que las concentraciones ensayadas de Cr(VI) en el agua fueron dos órdenes de magnitud (en moles, 213 veces) mayores a las de Cd(II), los efectos de uno y otro metal sobre el VTP fueron equivalentes. Una explicación a este fenómeno puede ser hallada al comparar los niveles de Cd y Cr medidos en la branquia de los individuos expuestos respectivamente a cada metal (ver Tabla V.11). De esta manera, puede observarse que la menor concentración de Cd en el tejido (en moles) en producir efecto sobre el VTP branquial fue aproximadamente equivalente que la de Cr. Por lo tanto, la respuesta de la actividad nucleolar en la branquia pareciera estar en función de las concentraciones molares de cada metal en el tejido, presentando una sensibilidad equivalente para cada uno de ellos. Esto indicaría que el principal factor que se encuentra regulando la sensibilidad de las respuestas halladas en las características nucleolares en la branquia de *O. bonariensis* frente a cada uno de los dos metales estudiados, es la eficacia del tóxico en ser incorporado y acumulado en el tejido (factor de bioacumulación: Cd(II) \cong 6000; Cr(VI) \cong 600; Tablas V.4 y V.8) y no a una mayor o menor eficacia en la disrupción de los mecanismos que regulan la actividad del nucleolo.

De un modo diferente, la respuesta del VTP a cada uno de los metales estudiados en el hígado fue diferente. El Cd(II) produjo un incremento del VTP desde las 48h (Figura VII. 19 B) mientras que el Cr(VI) causó un descenso de los valores de este parámetro recién a partir de las 196h (Figura VII. 23 B). Además, al comparar los niveles de cada metal acumulados en el tejido en función de la respuesta observada, se aprecia que la menor concentración de Cd en el tejido que produjo un efecto significativo sobre el VTP hepático fue aproximadamente la mitad de la de Cr. De acuerdo a esto, el efecto diferencial de cada metal sobre la actividad nucleolar en el hígado podría interpretarse como la conjunción de dos factores, el nivel de acumulación en el tejido y el mecanismo de acción. Como se mencionara en la sección precedente, se ha observado que concentraciones bajas de Cd(II) ($<1\mu\text{M}$, Beyersmann y Hechtenberg, 1997) inducen los procesos sintéticos, el crecimiento y la proliferación celular. Contrariamente, es sabido que el Cr(VI) inhibe esos procesos e incluso induce la muerte celular por apoptosis, principalmente mediados por la proteína supresora de tumores, p53 (Tully *et al.*, 2000;

Bagchi *et al.*, 2002) que actúa en respuesta al daño en el ADN (Kastan *et al.*, 1991), causado por los aductos ternarios que el Cr(III) forma con el ADN y la cicteína (Zhitkovich *et al.*, 2001), el glutatión (Liu y Dixon, 1996) o el ascorbato (Quievryn *et al.*, 2003), como consecuencia de la reducción intracelular del Cr(VI) (Wetterhahn, 1979; Connett y Wetterhahn, 1983; Susuki y Fukuda, 1990; O'Brien *et al.*, 1992),

Esto pareciera estar indicando que el VTP hepático presenta una mayor sensibilidad al Cd que al Cr. Sin embargo, esta diferencia de sensibilidad no se debería a una característica del tejido sino que podría ser explicada como una reducción de la toxicidad del Cr en función de un cambio en su estado de oxidación. En este sentido, de un modo semejante a lo observado cuando el Cr(VI) es incorporado mediante el epitelio del tracto digestivo (Kerger *et al.*, 1996; Kerger *et al.*, 1997) o respiratorio (Korallus, 1986; Langard *et al.*, 1978), el epitelio branquial y la sangre podría estar causando la reducción del Cr(VI) a Cr(III) previo a su absorción sistémica, atenuando así su "toxicidad" (De Flora, 2000). La mayor concentración de Cr en el hígado podría explicarse no como el resultado de una mayor absorción de Cr(VI), sino como la incorporación de Cr(III) ligado irreversiblemente a la hemoglobina, durante la hemocateresis (Korallus, 1986).

VII.h Conclusiones particulares

Como comentario general respecto al presente capítulo, podemos resaltar que se trata del primer estudio donde se evalúa la respuesta de la actividad nucleolar en tejidos de pejerreyes expuestos a contaminantes ambientales. Además, por primera vez se evalúan los efectos del Cd(II) y Cr(VI) sobre las características nucleolares en peces.

De acuerdo a los objetivos planteados al inicio del presente capítulo, respecto al comportamiento de actividad nucleolar en la branquia e hígado de *O. bonariensis* bajo condiciones normales de experimentación y en respuesta a la exposición de los individuos a concentraciones subletales de Cd(II) y Cr(VI), podemos concluir que:

- NTP y VTP resultan los parámetros más adecuados para estudiar la actividad nucleolar debido a su variabilidad reducida y a que presentan una distribución normal que permite el uso de métodos estadísticos paramétricos que en general son más potentes.

- Mientras el NTP puede considerarse una característica particular de cada tejido independiente de su actividad metabólica (2,6 en la branquia y 1,8 en el hígado) que no presenta variaciones con el tiempo ni responde a la condición fisiológica de pez, el VTP puede considerarse un reflejo del grado de actividad metabólica particular de cada tejido (1,47 en la branquia y 12,6 en el hígado) que presenta variaciones temporales y responde a la condición fisiológica del organismo. Estas características particulares de cada uno de los dos parámetros estudiados los hacen complementarios, ya que mientras las variaciones en el NTP indican cambios en la *programación genética* relacionada a la organización de el/los nucleolo/s (ej. número de NORs activas y grado de segregación de las mismas), las variaciones en el VTP indican respuestas a nivel de la *modulación fisiológica* del nivel de actividad nucleolar en relación con la condición del individuo.
- La respuesta del NTP en los individuos expuestos a concentraciones subletales de Cd y Cr no muestra una relación clara ni con la concentración ni con el tiempo de exposición en ninguno de los tejidos. En general, la respuesta de este parámetro durante el ensayo presenta una tendencia a la reducción temporaria de sus valores (particularmente próximo a las 48h), seguido del restablecimiento de los mismos (una excepción lo representó el NTP hepático de los pejerreyes expuestos a 1 $\mu\text{gCd(II)/L}$ en el ensayo EXP-00 que sufrió un incremento en función de la dosis).
- La respuesta del VTP a la exposición de los pejerreyes a concentraciones subletales de Cd(II) y Cr(VI) presenta, en ambos tejidos, una relación evidente en función de la concentración de cada metal en el agua (y más aún en los tejidos) y del tiempo de exposición. En la branquia, el VTP responde de manera semejante frente a ambos elementos, reduciendo los valores del parámetro en función de la concentración y del tiempo de exposición, hasta alcanzar un nuevo valor de equilibrio, dependiente de la concentración del metal en el agua. Contrariamente en el hígado, el VTP responde de modo diferente frente al Cd(II) y el Cr(VI), mientras que frente al primero puede incrementarse o reducirse según la concentración del metal, frente al segundo siempre tiende a reducirse.

- El VTP refleja fielmente los efectos que a nivel celular han sido descritos previamente para cada metal. Consistentemente con las observaciones realizadas *in vitro*, sobre la capacidad del Cd(II) de inducir o inhibir la actividad sintética, el crecimiento y la proliferación celular dependiendo que su concentración en el medio de cultivo sea menor o mayor a 1 μ M (Beyersmann y Hechtenberg, 1997), en el presente estudio se ha observado que el VTP aumenta a concentraciones bajas de Cd(II) en el tejido (< 2 μ M), mientras que decrece cuando los niveles de Cd(II) son altos (> 19 μ M). Por otro lado, de acuerdo con la bibliografía consultada, donde sólo se observó un efecto inhibitorio del Cr(VI) sobre la actividad sintética, crecimiento y proliferación celular (Blankenship *et al.*, 1994; Rajaram *et al.*, 1995; Shumilla y Barchowsky, 1998; Vasant *et al.*, 2001), el VTP sólo ha mostrado un decrecimiento monótono en función de la concentración del metal en el tejido.

- La explicación de las respuestas observadas a nivel de los parámetros nucleolares en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* expuesto a niveles subletales de Cd(II) y Cr(VI) es compleja debido, por un lado, al amplio espectro de mecanismos de acción descritos para cada metal y, por otro, a los sofisticados sistemas de regulación de la actividad nucleolar. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, pueden hacerse las siguientes consideraciones:
 - El incremento del VTP en respuesta a bajas concentraciones de Cd(II) en los tejidos, podría atribuirse principalmente a la interacción del Cd(II) con receptores celulares de membrana (ej, receptores de lectinas; Chen y Smith, 1992) que activan a la fosfolipasa C con la consecuente liberación de inosito trifosfato y el diacilglicerol que elevan los niveles de Ca⁺² intracelular (Smith, *et al* 1989) y activan la proteína quinasa C (Block *et al.*, 1992), y probablemente la Ca⁺²/calmodulinquinasa, con la consecuente fosforilación de factores de transcripción, que finalmente conducen al aumento de la expresión génica (ej. "genes tempranos"; Tang y Enger, 1993; Matsuoka y Call, 1995). Este mecanismo podría estar actuando indirecta o directamente sobre la actividad nucleolar, ya que se ha observado que la fosforilación es un importante mecanismo de regulación, a nivel de los procesos de transcripción, procesamiento, ensamble y tránsito, durante la biogénesis de los ribosomas (Leary y Huang, 2001). Otro posible mecanismo, más específico, podría ser

atribuido a la acción directa o indirecta del Cd sobre proteínas de unión a elementos de respuesta específicos ubicados en genes determinados (ej metalotioneínas; Koizumi *et al*, 1992; hemo-oxigenasa; Takeda *et al*, 1995), conduciendo finalmente a la inducción de la síntesis de las proteínas por ellos codificadas.

- La reducción del VTP en respuesta a altas concentraciones de Cd(II) en los tejidos podría explicarse como consecuencia del sobrepaso de los límites de protección brindados a la célula por las metalotioneínas y el glutatión, con la resultante generación de especies reactivas de oxígeno mediada por hierro (Casalino, *et al.*, 1997), o como consecuencia de reacciones inflamatorias (Albergoni y Viola, 1995) que inducen peroxidación de lípidos y daño en las proteínas y en el DNA. A esto debe sumarse la capacidad del Cd(II) de interferir con los mecanismos de reparación del ADN y de control del ciclo celular (Hartwig *et al.*, 2002). Además, el Cd(II) libre afecta la homeostasis del Ca^{+2} y Zn^{+2} e inhibe las funciones de varias enzimas y proteínas reguladoras dependientes de estos dos metales.

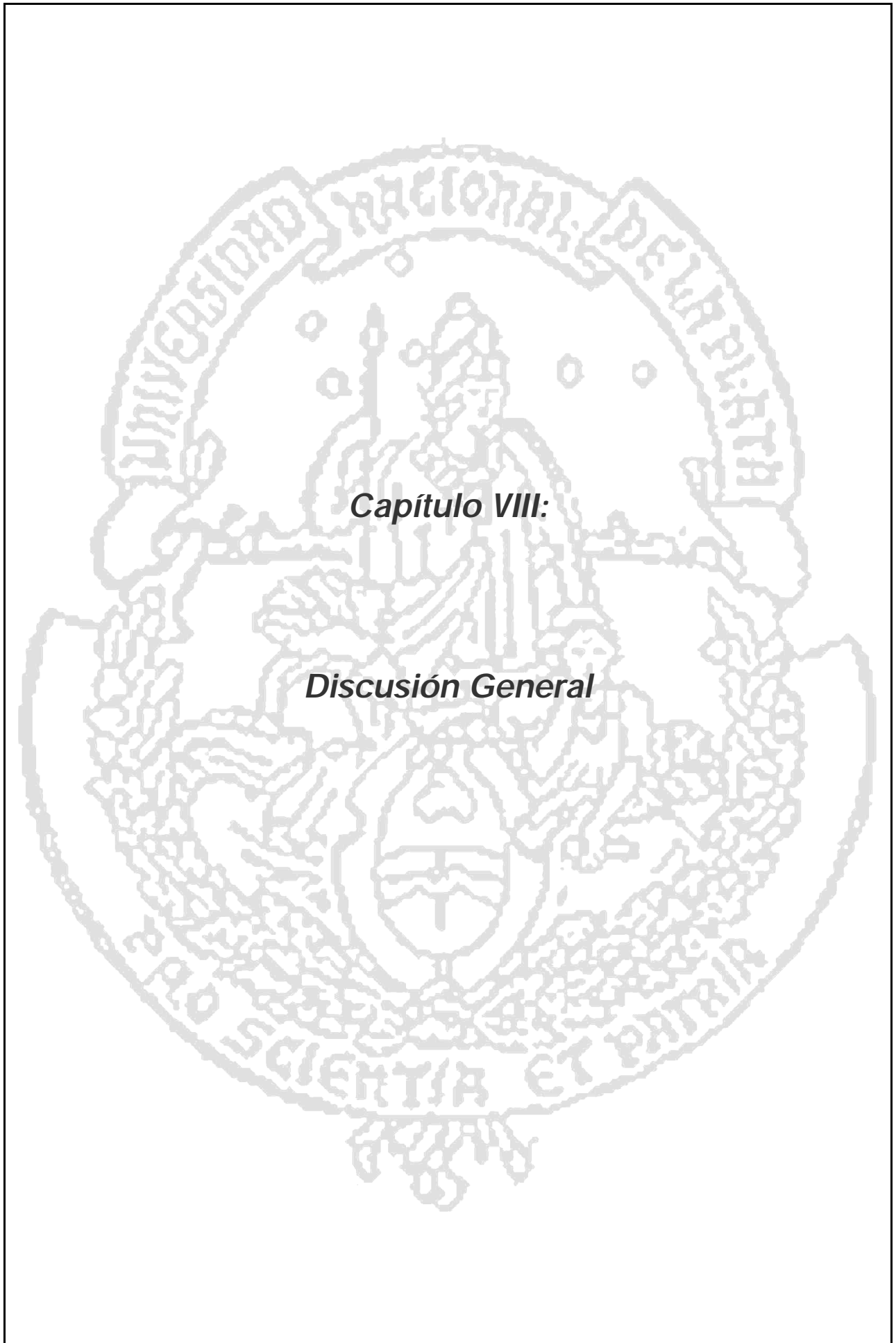
- La reducción en el VTP frente a concentraciones subletales de Cr(VI) podría entenderse principalmente como consecuencia de la inducción de arresto celular y muerte celular por apoptosis, mediados por el supresor de tumores p53 (Tully *et al.*, 2000; Bagchi *et al.*, 2002) como respuesta al daño en el ADN (Kastan *et al.*, 1991), causado mayoritariamente por los aductos ternarios formados por el Cr(III) con el ADN y con el glutatión (Liu y Dixon, 1996), la cisteína (Zhitkovich *et al.*, 2001) o el ácido ascórbico (Quievryn *et al.*, 2003), luego de la reducción del Cr(VI) mediada por estos mismos reductores intracelulares (Connett y Wetterhahn, 1983; Susuki y Fukuda, 1990; O'Brien *et al.*, 1992). Esta idea es consistente con la observación realizada sobre la capacidad del supresor de tumores, p53, de unirse a los factores de transcripción de la ARNpol I, SL-1 y UBF, e inhibir la iniciación de la transcripción del ADNr (Zhai y Comai, 2000). Otros mecanismos de acción descritos para el Cr(VI), como por ejemplo la inducción de estrés oxidativo (Tully *et al.*, 2000; Bagchi *et al.*, 2002), que pudieran estar actuando simultáneamente, no parecieran causar un efecto directo sobre la actividad nucleolar.

- La respuesta transitoria del NTP frente a ambos metales podría explicarse como producto de daño reparable ocurrido específicamente sobre secuencias de ADNr (Fritz *et al.*, 1996), que pudieran ser responsables de la activación/desactivación de las NOR, o como un efecto directo sobre algún factor de regulación de la segregación nucleolar. Además, en la branquia, las 48h de exposición representan un tiempo particular respecto a este parámetro, que podría estar relacionado a alguna propiedad intrínseca del ciclo celular en este epitelio.

- De acuerdo a los resultados expuestos previamente, el VTP fue el parámetro nucleolar más sensible y el que guardó relación con la concentración de ambos metales en el agua y con el tiempo de exposición. Cuando los valores de VTP se contrastan con los niveles de cada metal en los tejidos en función del tiempo, la relación es aún más clara. Además, si se indaga en los mecanismos de acción de los metales ensayados, pueden establecerse mecanismos de acción hipotéticos que se ven sustentados por una amplia bibliografía. Por otro lado, si bien el NTP en determinados momentos de los ensayos mostró relación con la dosis, su respuesta fue temporaria y no guardó relación con la acumulación de los metales en los tejidos a lo largo del tiempo. Por lo tanto el VTP pareciera ser el parámetro más sensible y adecuado para evaluar efectos causados por el Cd(II) y el Cr(VI) a nivel de la actividad nucleolar de la branquia y el hígado *O. bonariensis*, y probablemente también a nivel de otros tejidos y especies de peces diploides. A pesar de lo antedicho, cabe resaltar, que debido a los diferentes mecanismos que estarían determinando el grado de actividad nucleolar, la activación/desactivación de las NOR y la segregación de los nucleolos, sería de esperar que bajo determinadas circunstancias ambos parámetros pudieran aportar información complementaria. Finalmente, los índices utilizados intentando establecer relaciones funcionales entre los parámetros nucleolares estudiados, no aportaron ningún tipo de información adicional a la obtenida a partir de cada parámetro individualmente, poniendo de manifiesto nuevamente la independencia de los mecanismos que regulan la respuesta de uno y otro.

- Respecto de la posible utilización de los parámetros nucleolares como biomarcadores de respuesta, el presente estudio otorga evidencia sobre la

sensibilidad de respuesta que demuestra el VTP frente a la exposición de los pejerreyes a concentraciones de Cd(II) y Cr(VI) hasta 50 y 100 veces menores a los valores de LC50 hallados para la especie. Sin embargo, se observa que este parámetro puede ser afectado por cambios en el estado de condición de los individuos causados por otros factores, como por ejemplo los niveles de alimentación. A pesar de ello, los efectos causados por los tóxicos son aditivos a los producidos por otros factores y por lo tanto pueden ser diferenciados al sustraer los valores de los controles. En consecuencia, el presente estudio demuestra que la utilización de los parámetros nucleolares, en especial el VTP, podrían resultar útiles como biomarcadores de respuesta en ensayos controlados de laboratorio, coincidiendo así con la idea planteada por otros autores que propusieron su utilidad en bioensayos (Arkhipchuk, 1995a) e incluso en baterías de bioensayos (Arkhipchuk *et al.*, 2000). Contrariamente, resulta evidente que su utilización a campo resultaría muy dificultosa a menos que se contara con algunos otros indicadores, intrínsecos y/o extrínsecos, de referencia, o un conocimiento muy acabado de la biología de la especie en el sitio de estudio y de su relación con las características nucleolares.



Capítulo VIII. Discusión General

En los capítulos precedentes se han examinado de manera aislada la bioacumulación y los efectos letales y subletales de diferentes concentraciones de Cd(II) y Cr(VI) en el agua sobre *O. bonariensis*, y se han discutido en forma independiente las posibles explicaciones de los efectos hallados en cada caso en particular. El presente capítulo tiene por objeto integrar la información generada en este estudio e interpretarla a la luz de los antecedentes bibliográficos, con el objeto de proponer una explicación general para las respuestas halladas en los pejerreyes frente a diferentes niveles de los metales estudiados y discutir los posibles efectos esperables en los sistemas naturales.

VIII.a Respuesta biológicas en O. bonariensis frente a la exposición a diferentes niveles de Cd(II) en el agua.

VIII.a.1. La bioconcentración y los efectos letales agudos del Cd(II) y su relación con las características fisicoquímicas del agua.

Como se mencionara oportunamente, los efectos tóxicos del Cd(II) sobre los organismos acuáticos están íntimamente ligados a la especiación química que este metal presente y al grado de biodisponibilidad del mismo. Para el Cd, al igual que para otros cationes bivalentes, la especie química que ha demostrado mayor toxicidad es el ión Cd^{+2} libre (Wood *et al.*, 1997; Playle, 1998) y se ha observado que su biodisponibilidad se ve afectada en mayor medida por la concentración de Ca^{+2} en el agua, aunque también en menor medida por otros factores como la disminución del pH y el aumento de la materia orgánica disuelta (Playle *et al.*, 1993, Meinelt *et al.*, 2001). No obstante, otras especies menos tóxicas del Cd también pueden estar biodisponibles y ser incorporadas al organismo mediante mecanismos alternativos (Van *et al.*, 1999). En el presente estudio, los pejerreyes fueron expuestos a soluciones de CdCl en aguas óxicas, duras, con un pH neutro y cantidad despreciable de materia orgánica. En tales condiciones, es de esperar que la especie dominante de este elemento sea el ión metálico libre y el factor que afecte en mayor medida su biodisponibilidad sea la concentración de Ca^{+2} (dureza = 200 mg $CaCO_3/L \cong 80$ mg Ca^{+2}/L).

En un estudio realizado con el objeto de estudiar la **acumulación** del Cd^{+2} en la branquia de *Pimephales promelas* a corto plazo (2,5 h) en condiciones similares a las ensayadas en el presente estudio para el pejerrey ($Cd^{+2} = 6$ $\mu g/L$ y $Ca^{+2} = 80$ mg/L),

encontraron que la acumulación del Cd se ve completamente prevenida por el Ca^{+2} (Playle *et al.*, 1993). Tal resultado se contradice con el aumento significativo de los niveles de acumulación del Cd observados en la branquia de *O. bonariensis* luego de 48 h de exposición (5 veces la concentración observada en los controles). La explicación a esta aparente incongruencia, ha sido dada por el mismo grupo de investigadores, que en un estudio posterior con la misma especie, pero a mayor plazo de exposición (9 d), hallaron que tal efecto protector del Ca^{+2} desaparecía completamente luego de las 24h (Hollis *et al.*, 1997). De todos modos, ninguno de los dos extremos, protección completa o falta total de protección, pareciera ser completamente cierta, puesto que estos mismos investigadores en un estudio reciente realizado en truchas expuestas a Cd^{+2} ($2\mu\text{g/L}$) durante periodos prolongados (30d), observaron que el Ca^{+2} prevenía parcialmente la acumulación del Cd en la branquia y otros tejidos (Hollis *et al.*, 2000a). Por lo tanto estos autores, concluyeron que modelar matemáticamente la acumulación del Cd en función de la concentración del Ca^{+2} , en peces expuestos crónicamente, era un problema complejo producto de las diferencias en el número de sitios máximos de unión del metal a la branquia, estimados en los diferentes estudios. De lo anterior, cabe destacar que los niveles de acumulación de Cd en el pejerrey, se verán afectados en mayor o menor medida por los niveles de Ca^{+2} y en consecuencia durante exposiciones en escenarios naturales su bioacumulación dependerá principalmente de la dureza del agua, viéndose incrementada en aguas blandas, o reducida en aguas muy duras.

La magnitud y la rapidez con que se acumule el Cd en la branquia y su relación con la concentración de Ca^{+2} en el agua, son relevantes debido a que estarán relacionados con los efectos biológicos agudos que este metal induzca sobre la especie. En tal sentido, se ha propuesto como concepto general que, la concentración de un metal bivalente en la branquia, que causa la muerte de los individuos, es constante e independiente de la dureza del agua (Borgman, 1983; Playle *et al.*, 1993). Esta afirmación ha sido probada para el Ni y Cu (Meyer *et al.*, 1999) y utilizada como premisa básica para la construcción de un modelo conceptual que explica la relación entre el Ln (LC50) del Cd^{+2} y el Ln(dureza) (Meyer, 1999), que fuere descrita hasta ese momento, únicamente sobre una base empírica (USEPA, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, se corresponden con las observaciones previas realizadas en relación a los niveles del metal en la branquia, el

papel protector del Ca^{+2} y las concentraciones letales. En tal sentido, se ha observado que el efecto del Cd ha sido mayor en aquellos los individuos expuestos al metal en agua moderadamente dura, y que la pendiente de la recta que establece la relación entre los logaritmos naturales de las durezas ensayadas y los logaritmos naturales de las $\text{LC}_{50(96\text{h})}$ observadas, se corresponde a la de otras especies (USEPA, 2000), presentando un valor próximo a uno, en coincidencia a lo predicho por el modelo conceptual de Meyer (1999). Además, el modelo desarrollado en el presente estudio para explicar el comportamiento de los valores de LC_{50} en función del tiempo, que fuere basado, al igual que el propuesto por Meyer (1999), en la asunción de que la concentración del metal en la branquia capaz de inducir la muerte de los organismos es constante, mostró un ajuste muy satisfactorio a los datos experimentales, reforzando así la importancia de la relación entre la toxicidad aguda y la concentración del Cd en la branquia.

Por otro lado, los niveles de acumulación del metal en los diferentes tejidos pueden brindar información sobre si los organismos están siendo, estuvieron o no fueron expuestos al metal. En tal sentido se ha hallado en *O. mykiss* que una relación entre los niveles de Cd en la branquia y en el hígado (concentración de Cd branquia/hígado) $\cong 1$, indica que los organismos no han sufrido exposición al metal, si ésta es > 1 , revela que los peces se encuentran en fase de exposición y si es < 1 indica que se encuentran en fase de recuperación (Handy, 1992a). Los resultados hallados en el presente estudio, muestran que los niveles de Cd en la branquia y en el hígado del pejerrey cumplen con esta regla, observándose que ésta relación en los pejerreyes control fue próxima a 1, mientras que en los expuestos fue mayor a 1. De esta manera, se confirmaría que la exposición durante los experimentos ha sido efectiva pese a las bajas concentraciones de Cd ensayadas.

El patrón de acumulación del Cd en los diferentes tejidos durante la fase de exposición ha demostrado ser también útil como indicador para determinar cuan sensible es una especie al metal. En tal sentido, se ha visto que en especies tolerantes como *Noemachelus barbatulus*, el Cd tiende a acumularse predominantemente en el hígado, mientras que en especies sensibles como *Salmo gairdneri* éste se acumula predominantemente en la branquia (Norey *et al.*, 1990). De acuerdo al patrón de acumulación hallado para el pejerrey (Tabla V.11), y en acuerdo con los niveles de LC_{50} observados (comprendido entre el grupo de especies más sensibles, Figura VI.3),

este organismo se incluiría dentro el grupo de las especies sensibles al Cd, con una mayor afinidad del metal por acumularse en la branquia.

En los peces, la branquia es considerada el órgano blanco de los **efectos letales agudos** causados por metales como el Cd⁺² (Evans 1987; Wood 1992). Además, ha sido demostrado, por un lado, que tal efecto se debe en mayor medida a que los metales actúan como tóxicos de "superficie activa", que causan daño al unirse a sitios aniónicos ubicados en, o sobre la branquia, y por otro, que las consecuencias fisiológicas de tales efectos de "superficie" son de mucha mayor importancia que cualquier otro efecto causado a nivel sistémico por el ingreso y acumulación del metal en el organismo (Wood *et al.*, 1997). Las consecuencias fisiológicas atribuibles a la acción de metales bivalentes, están vinculadas principalmente con: i) la alteración en la ionoregulación, ii) interferencia con la transferencia de gases, iii) el desbalance ácido-base, y iv) la disrupción en la excreción de nitrógeno (Wood 1992). A nivel fisiológico, el Cd⁺² ha demostrado inducir en mayor medida hipocalcemia (Roch y Maly, 1979; Verbost *et al.*, 1989; Wicklund Glynn *et al.*, 1994), pero también se ha observado que es capaz de afectar la transferencia de gases (Wilson y Taylor, 1993). En particular, la hipocalcemia ha sido relacionada directamente con la mortalidad observada durante exposiciones agudas (Roch y Maly, 1979). El papel de la hipocalcemia como causante de la mortalidad de los peces durante exposiciones agudas a Cd⁺², explica la razón por la cual el efecto letal del Cd⁺² disminuye al aumentar la dureza del agua. En aguas blandas, el Cd⁺² entra a la branquia y bloquea a las Ca⁺²-ATPasas basolaterales, induciendo una pérdida neta de Ca⁺² que conduce a la muerte del organismo por hipocalcemia, mientras que en aguas duras, la mayor supervivencia de los peces no sólo se debe a que el Ca⁺² reduce la capacidad del Cd⁺² de bloquear las Ca⁺²-ATPasas basolaterales, sino a la menor pérdida neta de Ca⁺² como consecuencia de que el medio externo posee una concentración de este ión más próxima al medio interno del pez, previniendo de este modo la muerte del individuo por hipocalcemia (Hollis *et al.*, 1997). Esta idea fue confirmada en un estudio posterior del mismo grupo de investigadores, donde la medición del flujo unidireccional de Ca⁺² en truchas expuestas y no expuestas a Cd⁺², en aguas con concentraciones de Ca⁺² crecientes (hasta 48 mg/L), permitió determinar que en las truchas mantenidas en aguas con concentraciones de Ca⁺² iguales o mayores a 30,8 mg/L, el flujo de Ca⁺² hacia el interior del organismo es equivalente, independientemente de que éstas hayan sido, o no, expuestas a Cd⁺² (Hollis *et al.*, 2000b). La mayor sensibilidad a la *toxicidad aguda*

del Cd^{+2} observada en los pejerreyes expuestos en agua moderadamente dura, podría ser entonces justificada por medio del mecanismo previamente descrito.

VIII.a.2. Respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de *O. bonariensis* frente a concentraciones subletales de Cd(II) y su relación con los niveles de acumulación del metal en los tejidos.

A diferencia de la alta toxicidad observada durante exposiciones agudas frente a concentraciones letales de Cd^{+2} , ante exposiciones crónicas o subcrónicas a concentraciones subletales, el metal pareciera no producir, en los peces, efectos significativos a nivel fisiológico. Por ejemplo, en truchas expuestas a concentraciones subletales de Cd^{+2} ($3\mu\text{g/L}$), se ha observado que el descenso en la concentración de Ca^{+2} en el organismo y la mínima mortalidad observada durante los primeros días de exposición, se revierte casi completamente luego del décimo día (McGeer *et al.*, 2000). Este estudio demuestra que, si la concentración de Cd^{+2} en el agua es suficientemente baja como para que la hipocalcemia inducida no sea letal durante las primeras horas de exposición, el organismo mediará mecanismos que contrarresten tal efecto, logrando finalmente una nueva situación de equilibrio de acuerdo al modelo de "daño-reparación" utilizado para explicar la aclimatación frente a la exposición a metales (McDonald y Wood, 1993). Debido a estos mecanismos de compensación, los peces sometidos a concentraciones subletales de Cd^{+2} durante exposiciones crónicas no manifiestan consecuencias a nivel del crecimiento, tasa metabólica, rendimiento en la natación u homeostasis iónica (Hollis *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 2000a; Hollis *et al.*, 2000b; McGeer *et al.*, 2000). Sólo se ha podido observar un efecto sobre el crecimiento, en aquellos peces expuestos a concentraciones que a su vez causan algún grado de mortalidad (Hansen *et al.*, 2002). En el presente trabajo, los pejerreyes expuestos a 1, 5 y 10 $\mu\text{gCd}^{+2}/\text{L}$, no manifestaron respuestas letales, mostraron un patrón de acumulación similar al hallado en las truchas en los trabajos previamente mencionados y, también en concordancia con los trabajos anteriores, no mostraron efectos sobre el crecimiento, la natación u otros síntomas externos.

La ausencia de respuesta a nivel fisiológico inducida por concentraciones subletales de Cd^{+2} , resulta difícil de explicar a la luz de los efectos que a nivel histológico, bioquímico y molecular pueden ser observados en la **branquia** de peces expuestos a niveles subletales del metal. Por ejemplo, a nivel histológico en individuos de *Macropsobrycon uruguayanae* (un pez de perteneciente a la misma familia que el pejerrey), expuestos a

concentraciones subletales de Cd^{+2} por un período de hasta 60 días, se ha observado que el metal induce lesiones específicas a nivel branquial, tales como: i) fusión de lamelas secundarias adyacentes, que reducirían la superficie respiratoria; ii) telangiectasis lamelar, producto de la disrupción de las células en pilar; iii) hiperplasia de células del cloro, como respuesta compensatoria al estrés osmótico; y iv) infiltración inflamatoria, como consecuencia de la necrosis celular (Randi, *et al.*, 1996). Lesiones similares a las descritas previamente, fueron halladas en otro estudio pero realizado con individuos de *Oreochromis mossambicus* expuestos a concentraciones subletales de Cd^{+2} durante 14 d. En ese trabajo, los individuos presentaron además, levantamiento del epitelio branquial, incremento de espacio intercelular y apoptosis de las células del cloro, mostrando a nivel de la ultraestructura branquial, una degeneración de las células pavimentosas y del cloro, con una aceleración del recambio de estas últimas, hecho que según la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, no habría sido suficiente para evitar la disminución de la capacidad de intercambio iónico de tales células (Pratap y Wendelaar Bonga, 1993). En otro estudio reciente, realizado sobre la misma especie, también se evidenciaron cambios ultraestructurales en las células pavimentosas (aumento de microcrestas) y un incremento en la densidad y el área apical de las células del cloro, que los autores interpretaron como adaptaciones para asistir la transferencia de gases y el transporte de Ca^{+2} en respuesta a los niveles subletales de Cd^{+2} (Wong y Wong, 2000)

A nivel bioquímico, se ha observado *in vitro* que el Cd^{+2} altera la homeostasis de Ca^{+2} en la branquia, dado a que reduce su incorporación a nivel de las células del cloro como producto de la competencia por los canales de calcio ubicados en la membrana apical (Wicklund Glynn *et al.*, 1994), y a la posterior inhibición de la Ca^{+2} -ATPasa basolateral (Verboost *et al.*, 1989). También *in vitro*, se ha observado que el Cd^{+2} es capaz de inhibir la Na^+/K^+ -ATPasa pero a concentraciones mucho mayores que las que inhiben la Ca^{+2} -ATPasa (Lemaire-Goñy y Mayer-Constant, 1994; Lionetto *et al.*, 2000). Esto es consistente con las observaciones *in vivo*, donde sólo se ha visto un efecto del Cd^{+2} sobre la homeostasis del Ca^{+2} , sin efecto aparente sobre la regulación del Na^+ (Hollis *et al.*, 1999).

Otro estudio a nivel bioquímico, pero realizado *in vivo*, con el objeto de determinar la acumulación y distribución intracelular del Cd en la branquia de *Brachydanio rerio* expuesto a concentraciones subletales del metal (hasta 3,4 $\mu\text{g}/\text{L}$) durante sólo 24 h,

indica que la acumulación del Cd aumenta con su concentración en el agua, pero de forma no lineal producto de la apertura de vías paracelulares, y que tal aumento induce un cambio en la distribución intracelular del metal, donde éste pasa de acumularse mayoritariamente en la fracción citosólica correspondiente a las metalotioneínas, a otra fracción citosólica correspondiente a proteínas de mayor peso molecular y posteriormente a una fracción, denominada por el autor, de "organelas pesadas", reflejando así la saturación de la capacidad de las metalotioneínas y otros ligandos en la fracción citosólica de complejar el Cd^{+2} , que sería responsable del efecto tóxico inducido por este metal (Wicklund Glynn, 1996). Un fenómeno similar a este último se ha observado durante el desarrollo embrionario de moluscos (*Crassostrea virginica*), expuestos a concentraciones subletales de Cd^{+2} por 24h, donde concentraciones iguales o mayores a 4,5 $\mu g/L$ producen una declinación de la fracción del Cd intracelular unido a metalotioneína a medida que se incrementa la exposición, con la consecuente inhibición del metabolismo y crecimiento de las larvas, indicado por la reducción de la relación ARN/ADN (Webb, 1979; Roesijadi *et al.*, 1992). En otro estudio realizado en *Cyprinus carpio*, pero a más largo plazo (29 d), se ha observado que en los peces expuestos a 56,2 $\mu gCd^{+2}/L$ (concentración que no produce mortalidad), el porcentaje del metal no unido a metalotioneína aumenta con el tiempo de exposición (De Smet y Blust, 2001). Este hecho, se vincula a otro experimento similar realizado por el mismo grupo de investigadores, donde en la branquia de las carpas expuestas al Cd se observa un aumento de la actividad proteásica, de los aminoácidos libres y de la actividad de las enzimas aspartato y alanina aminotransferasa (sin modificación del contenido total de proteínas), a partir del cuarto día de exposición y hasta el final del experimento (29 d), (De Smet y Blust, 2001). Estos estudios ponen de manifiesto que en los peces expuestos a Cd, el porcentaje del metal unido a metalotioneínas aumenta con el tiempo e induce un daño celular que se ve reflejado en el incremento del recambio de proteínas, más que en el contenido total de proteínas.

Puesto que la principal función del nucleolo es la biosíntesis de los ribosomas, que constituyen la maquinaria indispensable para llevar a cabo la síntesis proteica de la célula, un aumento del recambio de las proteínas para reemplazar aquellas moléculas dañadas por el Cd y mantener así los niveles de proteínas de la célula constantes, podrían considerarse contradictorio con la reducción del VTP branquial en función del tiempo de exposición y de la concentración de Cd, observada en el presente estudio. Sin embargo, esta aparente contradicción puede ser explicada haciendo una analogía

con los resultados obtenidos en un estudio realizado por Jelinsky y Samson (1999), donde evaluaron la respuesta global de *Saccharomyces cerevisiae* frente a agentes alquilantes como el metil-metasulfonato. Estos autores, demostraron que pese a la inducción, por parte de la célula, de genes involucrados en la recuperación del daño en el ADN y, en particular, en la puesta en marcha de un programa para la eliminación (proteólisis) y reemplazo (biosíntesis de aminoácidos) de proteínas dañadas por la alquilación, la célula es capaz de reprimir simultáneamente la síntesis de ARNr y la síntesis y ensamble de las proteínas ribosomales. Frente a tal paradójico escenario, los autores interpretaron esta respuesta como un mecanismo mediante el cuál la célula redirigiría la energía comúnmente destinada a la síntesis de ARNr y de proteínas ribosomales (el 75% de los genes más expresados en *Saccharomyces cerevisiae*) a la síntesis de los genes involucrados en las respuestas de protección celular y en el mantenimiento de los niveles basales de proteínas.

Estudios recientes postulan además, que el nucleolo tendría la capacidad de actuar como un sensor de estrés, manteniendo bajo los niveles de la proteína supresora de tumores "p53", que automáticamente se incrementaría en respuesta a la disrupción de las funciones nucleolares inducidas por una gran variedad de agentes (Rubbi y Milner, 2003). Niveles elevados de p53, conducen al arresto celular, con la consecuente inhibición de los procesos sintéticos, el crecimiento y la proliferación celular, efectos que se ha observado son característicamente inducidos por concentraciones elevadas de Cd sobre diferentes líneas celulares (Beyersmann y Hechtenberg 1997).

De acuerdo a las consideraciones previas, la reducción del VTP en la branquia de *O. bonariensis* expuesto a partir de concentraciones de Cd⁺² en el agua de entre 1 y 5 µg/L, estaría indicando un daño celular generalizado a nivel ese tejido, causado probablemente por la combinación de los efectos citotóxicos y genotóxicos que oportunamente fueran descriptos en respuesta a exposiciones a niveles relativamente altos del metal.

Por otro lado, los antecedentes sobre los efectos del Cd en el **hígado** de peces expuestos a concentraciones subletales del metal, son poco numerosos y disímiles entre si. Estos incluyen estudios *in vitro* e *in vivo*, y a su vez dentro de éstos últimos, aquellos donde se han empleado vías de exposición a través de inyecciones intraperitoneales o mediante la exposición de los organismos al Cd a través del agua.

Así por ejemplo, en un estudio *in vitro* realizado con hepatocitos de *Oncorhynchus mykiss* expuestos a concentraciones de Cd^{+2} en el medio de cultivo desde 1 a 10 μM , se halló que bajo tales condiciones el metal es capaz de dañar el ADN y conducir a la muerte celular por apoptosis, principalmente mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (Risso-de Faverney *et al.*, 2001). Por otro lado, estudios *in vivo*, donde individuos de *Oncorhynchus mykiss* fueron repetidas veces inyectados intraperitonealmente con CdCl_2 (0,5-2 mg/Kg), luego de 23 d se observó un aumento significativo de la acumulación del metal en el hígado, asociado principalmente a proteínas de peso molecular intermedio (Castaño *et al.*, 1998). Otros autores, en un experimento similar (utilizando la misma vía de exposición y una concentración de 2,5 mg/Kg), pero en el pez *Sparus aurata*, evaluaron el efecto del Cd sobre enzimas mitocondriales (NAD-isocitrato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa), transaminasas mitocondriales y citoplasmáticas (GOT y GPT), enzimas involucradas en mecanismos de detoxificación (P450) y antioxidantes (Gs-Px, Gs-R y CAT), encontrando que el Cd alteraba la integridad de la membrana mitocondrial, dañaba la estructura de la membrana plasmática, estimulaba mecanismos de detoxificación e inhibía las metaloenzimas del sistema antioxidante de la célula (Vaglio y Landriscina, 1999).

En un trabajo *in vivo*, donde individuos de *Cyprinus carpio* fueron expuestos al Cd^{+2} a través del agua durante 29 d, se halló un incremento de las aminotransferasas hepáticas (ALT y AST), además de un aumento del contenido de aminoácidos libres y de la actividad de las proteasas (daño celular) luego de 4 d de exposición en aquellos peces expuestos a 20 μM (concentración que causa 100% de mortalidad a los 21d), sin embargo, a diferencia de lo hallado en la branquia, no observó ningún efecto luego de 29d en los individuos expuestos a 4 μM (concentración más alta de Cd^{+2} que no produjo mortalidad), indicando así, ausencia de daño celular en los hepatocitos de los peces frente a exposiciones subletales, pese a evidenciarse un incremento de la concentración del metal en el tejido (De Smet y Blust, 2001). La explicación a tal observación puede ser hallada en otro trabajo similar realizado por el mismo grupo de investigadores, donde sólo se varió el agua de ensayo (menor dureza) y que demostró que en los individuos expuestos a la concentración más elevada de Cd^{+2} que no causó mortalidad (0,5 μM), tanto los niveles basales de metalotioneína en el hígado, como su capacidad complejante (de casi el 100%), son suficientemente grandes como para mantener los niveles del Cd no unido a la proteína, invariantes durante todo el tiempo

de exposición, pese al incremento significativo en los valores de acumulación del metal en el tejido (De Smet y Blust, 2001). En otro estudio realizado con individuos de *O. mykiss* expuestos a $3 \mu\text{gCd}^{+2}/\text{L}$ en agua moderadamente dura durante 30 d, se arribó a las mismas conclusiones, indicando que los niveles de metalotioneínas en el hígado, pero no en la branquia, son suficientes para complejar a todo el Cd acumulado en el tejido (Hollis *et al*, 2001).

De los trabajos discutidos previamente, puede inferirse que, en peces expuestos *in vivo* a concentraciones subletales de Cd^{+2} en el agua, durante períodos de tiempo prolongados, el metal no es capaz de generar daño celular generalizado a nivel hepático. Los estudios *in vitro*, o *in vivo*, con peces inyectados intraperitonealmente, indican que la ausencia de efecto no se debe a que el Cd, *per se*, no posea la capacidad de inducir daño, sino que podría interpretarse, por un lado, como resultado del efecto "filtro" que proporciona la branquia, debido a la gran afinidad que el metal posee por este tejido, y por otro, a que los niveles basales de metalotioneína, sumado a la alta capacidad de saturación que éstas poseen en el hígado, proveen a este tejido de un mecanismo de defensa capaz de neutralizar en gran medida los efectos tóxicos del metal.

En los pejerreyes expuestos a concentraciones subletales de Cd^{+2} a través del agua, la respuesta del VTP hepático fue consistente con los antecedentes bibliográficos. El incremento de los valores de VTP, puede ser explicado como producto del efecto inductor de la actividad sintética, el crecimiento y la proliferación celular que se ha visto poseen bajas concentraciones de Cd libre (Beyersmann y Hechtenberg 1997). El mecanismo descrito para explicar este fenómeno, sostiene que el Cd podría interaccionar con receptores de membrana, como por ejemplo los de lectinas (Chen y Smith, 1992) y activar la ruta de señalización de la fosfolipasa C y el inositol-3-fosfato, con el consecuente aumento de Ca^{+2} intracitoplasmático (Smith, *et al* 1989; Hague *et al.*, 2000) y la activación de la proteinquinasa C (PKC) (Block *et al.*, 1992), que finalmente fosforilarán factores de transcripción que activan a los genes de respuesta temprana (Tang y Enger, 1993; Matsuoka y Call, 1995) o que actúan directamente en la transcripción, procesamiento y ensamble de los ribosomas a nivel del nucleolo (Leary y Huang, 2001). Esta hipótesis, que sostiene que bajas concentraciones de Cd^{+2} interfieren con rutas de señalización intracelular, ha sido apoyada reciente por otro estudio donde se observó que, en hepatocitos de *Anguilla anguilla*, este metal es capaz

de reducir los niveles de AMPc inducidos por la epinefrina, con la consecuente disminución de la liberación de glucosa por parte de estas células (Fabbri *et al.*, 2003). El aumento de la expresión de determinados genes, como por ejemplo los proto-oncogenes (c-fos, c-jun y c-myc), mediante la activación de rutas de señalización intracelular, como por ejemplo la de la Fosfolipasa C → Inositol-3-fosfato → Proteína-quinasa C, es considerado uno de los posibles mecanismos carcinogénico del Cd (Beyersmann y Hechtenberg 1997).

Por otro lado, la desaparición aparente del efecto del Cd sobre el VTP en los peces expuestos a la mayor concentración del metal, podría ser interpretado como el inicio de la manifestación de los efectos inhibitorios descritos para el Cd, que comienzan a prevalecer sobre los efectos estimulantes, como producto del daño celular, a nivel del ADN (Risso-de Faverney *et al.*, 2001), de las proteínas y los lípidos (Novelli *et al.*, 1998; Shaikh *et al.*, 1999), causado por el aumento de los niveles del metal en el tejido. Ello, probablemente, como se describiera para la branquia, pueda vincularse al incremento en la proporción de Cd⁺² intracitoplasmático libre, como consecuencia de la saturación de las metalotioneínas y otros ligandos intracelulares (De Smet y Blust, 2001).

De acuerdo a lo previamente expuesto, donde se ha observado por un lado, una gran capacidad de retención del Cd a nivel de la branquia en *O. bonariensis* y elevados niveles basales de metalotioneína con una gran capacidad complejante en el hígado de otras especies de peces, y por otro, la ausencia de respuestas a nivel de la actividad nucleolar en los hepatocitos de *O. bonariensis* y la falta de efectos adversos en el hígado de otras especies de peces durante períodos prolongados de exposición *in vivo* a concentraciones subletales del metal; es factible pensar que, en los ambientes naturales, será poco probable esperar efectos hepatotóxicos en los pejerreyes expuesto subletalmente al Cd, puesto que, antes de producir tales efecto, este metal inducirá disfunciones branquiales que conducirá a la muerte de los organismos por hipocalcemia.

VIII.a.3. Implicancias ambientales de las respuestas observadas a nivel letal y subletal en O. bonariensis frente al Cd(II).

Como se discutiera previamente, la relación entre la acumulación del Cd entre la branquia y el hígado, ubica al pejerrey dentro del grupo de especies sensibles al metal, con un patrón similar al de los salmónidos. La alta sensibilidad predicha por el patrón de acumulación, se correspondió fielmente con los bajos niveles de Cd^{+2} que indujeron efectos letales ($\text{LC50}_{96\text{h}} = 35 \mu\text{g Cd}^{+2}/\text{L}$) y subletales ($\text{LOEC VTP}_{\text{Br}6\text{h}} = 1 \mu\text{g Cd}^{+2}/\text{L}$; $\text{VTP}_{\text{Hi}48\text{h}} = 5 \mu\text{g Cd}^{+2}/\text{L}$) en esta especie. Además, el patrón de acumulación observado, puede resultar útil como índice para evaluar las diferentes fases de exposición en organismos colectados en el campo ($\text{Br/Hi} \cong 1$, no sufrió exposición; > 1 , fase de exposición; < 1 , fase de recuperación).

En las secciones precedentes, quedó demostrado que la toxicidad letal aguda del Cd es influenciada principalmente por la dureza del agua. Cuando se atiende a los niveles de Ca^{+2} en los cuerpos de agua que se corresponden con la distribución natural del pejerrey, se encuentra que pareciera existir una tendencia general a la disminución de la concentración de este elemento en el agua, desde el Río Salado hasta el Bajo Paraná. Por ejemplo, para el Río Salado a la altura de Guerrero, fue citada una concentración de $49 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (Ringuelet, 1972), lo que equivaldría a una dureza aproximada (suma de carbonatos de Ca^{+2} y Mg^{+2}) de $262 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$. En la Laguna de Chascomús se detectaron niveles promedio y mínimos de $20,0$ y $17,2 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 101,2$ y $61,5 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$) (Conzonno y Claverie, 1990), respectivamente, y en la Laguna de Vitel valores en un intervalo de $11,0$ a $33,0 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $94,9$ y $205,4 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$) (Olivier, 1961). Para el Río Samborombón, los valores publicados fueron de $70,2 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 578,7$) (Ringuelet, 1972) y de $17, 22$ y $26 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 86, 87, 155 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$) en su sector bajo, medio y alto respectivamente (Mercado, 2000). Para el Río de la Plata, los valores promedio y mínimo calculados a partir de los datos presentados por Villar *et al.* (1999), fueron $13,3$ y $8,6 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 53,9$ y $48,8 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$), respectivamente, y en un estudio posterior publicado por Villar *et al.* (2001) fue de $9,7 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 30 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$). En el Bajo Paraná, el valor promedio y mínimo de Ca^{+2} calculado a partir de un estudio realizado durante un poco más de un año de muestreo en seis estaciones ubicadas a lo largo de ese sector del río, fueron $7,3$ y $4,1 \text{ mgCa}^{+2}/\text{L}$ (dureza $\cong 32$ y $22 \text{ mgCaCO}_3/\text{L}$), respectivamente (Villar *et al.*, 1998a).

De acuerdo con los trabajos previos, y considerando la dependencia de la sensibilidad al Cd^{+2} en función de la dureza hallada para *O. bonariensis*, se deduce que el pejerrey será más vulnerable a eventuales exposiciones agudas del metal en la zona del bajo Paraná y luego en la zona del Río de la Plata. Contrariamente, su vulnerabilidad será menor en la cuenca del Río Samborombón y Salado. Considerando la ecuación que describe la relación entre los valores de LC50 para el Cd^{+2} en función de la dureza del agua, en el peor escenario (Bajo Paraná), la LC50(96h) estimada para los estadios más sensibles del pejerrey sería de $3,15 \mu\text{gCd}^{+2}/\text{L}$, mientras que para las lagunas de la cuenca del salado esta sería de $91,2 \mu\text{gCd}^{+2}/\text{L}$.

Cuando se atiende a las concentraciones de Cd en agua total hallados en los diferentes cuerpos de agua que habita el pejerrey, se observa que en un estudio realizado en el Bajo Paraná y la margen oeste del Río de la Plata se observó que los niveles de Cd exceden el $\mu\text{g}/\text{L}$ sólo frente a San Isidro, donde se registraron valores de $2 \mu\text{gCd}/\text{L}$ (Villar *et al.*, 1998a). En otro estudio anterior, llevado a cabo en 33 estaciones de muestreo pero ubicadas solamente sobre la margen oeste del Río de la Plata, desde San Isidro hasta Beriso, se observaron en el año 1989 niveles de Cd superiores a 1, 2 y $3 \mu\text{g}/\text{L}$ en 18, 7 y 1 de las estaciones relevadas, respectivamente, con un máximo valor de $3,7 \mu\text{gCd}/\text{L}$ hallado frente a Berazategui a la altura del desagüe cloacal, mientras que ninguna superó el $\mu\text{g}/\text{L}$ en un muestreo posterior realizado en el año 1990 (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992). Curiosamente, en muestreos realizados en las mismas estaciones pero durante los años 1992-93 y 1994-95, no encontraron valores de Cd mayores a $0,1 \mu\text{g}/\text{L}$ para ninguno de los puntos muestreados (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997). Por otro lado los valores de Cd en agua total hallados para cuerpos de agua pertenecientes a la cuenca del Río Salado, fueron menores a $1 \mu\text{g}/\text{L}$ en un estudio realizado en la laguna de Lobos (Ronco y Argemí, 1998), mientras que en otro estudio donde se muestrearon 11 sitios a lo largo de toda la cuenca, se encontró una tendencia al incremento de la concentración de Cd desde la desembocadura (Puente de Guerrero), donde los valores fueron menores a $1 \mu\text{g}/\text{L}$ (límite de detección), hasta el sector alto de la cuenca donde se observaron valores de 4 y $5 \mu\text{g}/\text{L}$ (Laguna de Junín y Río Salado a la altura de Achupallas, respectivamente) (resultados no publicados).

Por lo tanto si se consideran en conjunto las durezas y las concentraciones de Cd en agua total señaladas en los estudios previamente mencionados, vemos que para algunos sectores del Río de la Plata, sería posible que bajo circunstancias extraordinarias, el Cd pudiera llegar a causar efectos letales agudos sobre los estadios más vulnerables del pejerrey. Contrariamente en la cuenca del salado los valores de dureza relativamente elevados observados en sus aguas, ofrecerían un efecto protector, aún cuando los niveles de Cd hallados fueron más elevados.

A diferencia de lo observado durante exposiciones letales agudas, donde los valores de LC50 de los pejerreyes expuestos a Cd⁺² presentaron una fuerte dependencia en función de la dureza del agua, este parámetro no parecería afectar significativamente el efecto del metal durante exposiciones subletales a largo plazo, puesto que los peces parecieran poseer la capacidad de mediar mecanismos que les permiten recuperarse de la hipocalcemia inducida por el metal durante las primeras semanas de exposición (McGeer *et al.*, 2000),

Cuando se comparan los niveles de Cd que indujeron respuesta a nivel de la actividad nucleolar, con las concentraciones del metal observadas en determinadas zonas del Río de la Plata, donde se han detectado, en agua total, hasta 2 µg/L (Villar *et al.*, 1998b), se pone de manifiesto que en tales ambientes el pejerrey podría ser susceptible de sufrir circunstancialmente exposiciones subletales, que produzcan en particular efectos sobre el VTP branquial. Como se discutió previamente en relación a otros efectos causados por el Cd y al funcionamiento del nucleolo, tal reducción podría ser interpretada como una indicación de daño celular. Sin embargo, estimar el costo metabólico asociado a tal respuesta y su impacto sobre parámetros de mayor relevancia biológica como el crecimiento o la reproducción, no resulta sencillo.

Por ejemplo en varios experimentos realizados con truchas arcoiris expuestas entre 3 a 7 µgCd⁺²/L por intervalos de 70 a 178d (Kumada *et al.*, 1980; Giles 1988; Davies *et al.*, 1993) y en truchas "brook" expuestas a 3,4 µgCd⁺²/L por un período de 266 d (Benoit *et al.*, 1976), no se hallaron efectos del metal sobre el crecimiento. Los mismos resultados se obtuvieron en otra serie de trabajos realizados en truchas arcoiris expuestas a 3 µgCd⁺²/L por 30d (Hollis *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 2000a; Hollis *et al.*, 2000b; McGeer *et al.*, 2000; Hollis *et al.*, 2001). En un estudio reciente realizado en truchas toro (*Salvenilus confluentus*) expuestas entre 0,052 – 0,786 µgCd⁺²/L se observó, luego de

55 d, un 28% de reducción en el crecimiento en peso sólo en los individuos expuestos a la máxima concentración, que a su vez causó una mortalidad del 37%, concluyendo que el Cd afecta al crecimiento sólo a concentraciones que son letales (Hansen, *et al.*, 2002).

De acuerdo a los estudios previos realizados en condiciones de laboratorio, la exposición a concentraciones subletales de Cd no presentaría un costo significativo a nivel biológico para los peces. Sin embargo, en los ambientes naturales donde pueden sumarse otros factores de estrés, los efectos del metal podrían estar disminuyendo la capacidad general de respuesta de los peces. Además, como ha sido puesto de manifiesto por el VTP hepático, pequeñas cantidades de Cd podrían inducir la activación de los protooncogenes y aumentar la probabilidad de desarrollo de tumores.

VIII.b Respuesta biológicas en *O. bonariensis* frente a la exposición a diferentes niveles de Cr(VI) en el agua.

VIII.b.1. La bioconcentración y los efectos letales agudos del Cr(VI) y su relación con las características fisicoquímicas del agua.

Del mismo modo que lo observado en truchas (*Salmo gairdneri*) expuestas durante 2 a 4 d a concentraciones desde 2.000 hasta 50.000 µg/L de Na₂CrO₄ (Van der Putte *et al.*, 1981b), en el pejerrey, la acumulación del Cr en la branquia fue mayor (aproximadamente el doble) que en el hígado. Por otro lado, a diferencia de lo hallado en las truchas, donde el metal durante la etapa de depuración fue removido rápidamente de la branquia, pero permaneció elevado en el hígado, en los pejerreyes expuesto a la máxima concentración de Cr, se observó que los niveles del metal se estabilizaron luego de las 384 h tanto en la branquia como en el hígado, indicando que la tasa de eliminación igualó a la de acumulación, y que por lo tanto en ambos tejidos el Cr fue removido o hacia otros tejidos o excretado fuera del organismo. Sin embargo, esta diferencia podría ser debida sólo a los cortos períodos de tiempo durante los que fueron estudiadas las truchas.

Para el Cr, no se han hallado trabajos previos que relacionen los niveles de acumulación en los tejidos con sus efectos letales agudos. Para otros metales como el Cu⁺² y el Ni⁺², se ha demostrado que la concentración de estos en la branquia que

produce mortalidad es constante e independiente de las características del agua (Meyer *et al.*, 1999). En el presente estudio se obtuvo un buen ajuste entre los niveles de acumulación del Cr en los tejidos y el modelo de bioconcentración utilizado. A su vez, se observó que el modelo empleado para interpretar el comportamiento de los valores de LC50 en función del tiempo, desarrollado asumiendo que la concentración de Cr que causa mortalidad a un tiempo dado es constante, mostró una buena correlación con los datos experimentales. En consecuencia, la relación entre los niveles de acumulación y la toxicidad letal aguda del Cr, pareciera presentar un comportamiento similar a la de los cationes previamente mencionados, pese a que, bajo las condiciones ensayadas las especies dominantes de Cr hayan sido los aniones $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ o CrO_4^{-2} (Jop *et al.*, 1987). Esto conduce a pensar que, los niveles de Cr en la branquia también podrían ser utilizados como indicadores de exposición al metal, al menos durante exposiciones agudas.

Los niveles de toxicidad letal aguda del Cr, hallados en la bibliografía, indican una respuesta relativamente homogénea de las distintas especies de peces de agua dulce frente a este metal. En este sentido, los valores de $\text{LC50}_{(96\text{h})}$ se ubicaron todos en el mismo orden de magnitud con valores máximos de 93.600 $\mu\text{gCr(VI)/L}$ para *Cyprinus carpio* (Rehwoldt *et al.*, 1972) y mínimos de 7.460 $\mu\text{gCr(VI)/L}$ para *Lepomis gibbosus* (Turnbull *et al.*, 1954). La respuesta observada en *O. bonariensis* frente a exposiciones letales agudas de Cr(VI), muestran al pejerrey como una especie sensible a este elemento, con valores promedio de $\text{LC50}_{(96\text{h})}$ que van desde 1.523,3 a 5.470,3. $\mu\text{g Cr(VI)/L}$ (Tabla VI.5.).

Los efectos agudos del Cr, parecieran estar relacionados con su capacidad de inhibir inespecíficamente los mecanismos de transporte de iones a nivel de la branquia, induciendo principalmente alteraciones en el balance osmótico y ácido-base. Estudios en *Periophthalmus dipsas*, han demostrado que el Cr(VI) es capaz de inducir una inhibición generalizada de la actividad ATPásica total en la branquia. Por un lado, generaría un desbalance en los niveles de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} , producto de la inhibición de las ATPasas dependientes de estos iones; y por otro, una interrupción en el transporte de HCO_3^- y NH_4^+ producto de la inhibición de las ATPasas dependientes de aniones (Ca^{+2} , HCO_3^-)-ATPasa y (Mg^{+2} , HCO_3^-)-ATPasa, que conducirían además a un aumento de los niveles de Cl⁻ en el plasma (Thaker *et al.*, 1996). Esta observación es consistente con el aumento de la mortalidad, la disminución de la osmolaridad y la

reducción de la concentración de algunos electrolitos en el plasma sanguíneo, observada en truchas (*Salmo gairdneri*) expuestas a Cr(VI), a medida que disminuye el pH del medio (Van der Putte *et al.*, 1982). Un incremento de la mortalidad asociado a un descenso de la concentración de Na^+ , fue también observado en larvas de carpa común (*Cyprinus carpio*) expuestas a Cr(VI) en medios de pH decreciente (Stouthart *et al.*, 1995). Tal disrupción en la homeostasis del Na^+ , es consistente con la hipertrofia e hiperplasia de las células del cloro, observada en respuesta a la exposición a Cr, en la branquia de *Barbus conchoni* (Gill *et al.*, 1987). Debido a que el transporte activo de Na^+ hacia la sangre es mediado por las células del cloro (Flik *et al.*, 1993), la respuesta observada, podría ser interpretada como un mecanismo de compensación, frente a la inhibición del transporte de este ión causada por el Cr.

La mayor toxicidad del Cr(VI) en función de la disminución del pH (Van der Putte *et al.*, 1981a), se relaciona a su vez con un aumento de la acumulación del metal en la branquia al aumentar la acidez del medio (Van der Putte *et al.*, 1981b). Puesto que a menor pH la especie que prevalece es la HCrO_4^- sobre la CrO_4^{2-} (Jop *et al.*, 1987), se especula que, debido a su monovalencia, la primera puede ser incorporada más fácilmente a través de la branquia (Trama y Benoit, 1960). La conclusión a la que arriban estos autores, se contrapondría a la hipótesis ampliamente aceptada para mamíferos, donde se sostiene que la principal vía de ingreso del CrO_4^{2-} a la célula es a través de canales de SO_4^{2-} y PO_4^{3-} (Wetterhahn, 1979; Wiegand *et al.*, 1985; Ottenwälder y Wiegand, 1988). Esta discrepancia, podría deberse a que los mecanismos de incorporación del CrO_4^{2-} en la branquia de los peces difiere al de los mamíferos, o más probablemente, a una interpretación errónea de porque la disminución del pH incrementa la acumulación del Cr en la branquia, como consecuencia de que en el año en que realizaron el trabajo Trama y Benoit (1960), aún no había sido establecido el mecanismo que es hoy más aceptado y que fuera propuesto por Wetterhahn (1979). Por otro lado, debido a que a pH bajo, la especie dominante, el HCrO_4^- , incrementa el poder oxidante del Cr(VI) (Sillen y Martell, 1964), el incremento de toxicidad del metal al aumentar la acidez del medio, ha sido también explicado como producto de este fenómeno (Stouthart *et al.*, 1995).

Durante exposiciones agudas, el Cr(VI) también pareciera interferir en algún punto con la transferencia de gases. De acuerdo a un estudio realizado en truchas, pareciera que los peces pueden contrarrestar fisiológicamente éste efecto del Cr y mantener la tasa

de transferencia de oxígeno constante a expensas de aumentar la frecuencia ventilatoria (Van der Putte *et al.*, 1982). Sin embargo, en el estudio anterior, el incremento en el hematocrito, la hemoglobina y el ácido láctico, observado en los peces expuestos al metal, estarían indicando que tal compensación no sería completamente efectiva. La disrupción a nivel del intercambio gaseoso, ha sido asociado a la pérdida de rigidez del sistema de células en pilar, junto a la separación y disrupción del epitelio de las lamelas branquiales, que fuere observado en adultos de *Barbus conchoni* expuestos a Cr (Gill *et al.*, 1987). Estas alteraciones de la estructura branquial parecieran, al menos en parte, impedir la normal captación del oxígeno y circulación del flujo sanguíneo. Además, se ha observado que el Cr, como otros metales pesados, incrementa la secreción mucosa en la branquia y en la piel (Stouthart *et al.*, 1995). El aumento de secreción mucosa a nivel de la branquia aumenta la distancia de difusión del oxígeno desde el agua hasta la sangre (Mallatt, 1985) y se ha podido correlacionar con la reducción en la concentración de oxígeno en la sangre arterial de las carpas (Ultsch y Grosss, 1979). Esta interferencia del Cr con el adecuado intercambio de gases podría ser un factor adicional que contribuya con el efecto letal causado por el metal sobre los pejerreyes.

VIII.b.2. Respuesta de la actividad nucleolar en la branquia y el hígado de O. bonariensis frente a concentraciones subletales de Cr y su relación con los niveles de acumulación del metal en los tejidos.

De acuerdo a los estudios citados previamente, el Cr es capaz de ser incorporado por los peces a través de la branquia, donde es mayoritariamente acumulado durante la fase de exposición. Este comportamiento del Cr, fue corroborado en los pejerreyes, observándose un aumento significativo de la acumulación del metal en branquia, tejido donde además, ésta fue máxima. El mecanismo actualmente más aceptado para explicar la incorporación del cromo (como CrO_4^{-2}) por la célula, es a través de canales de SO_4^{-2} y/o PO_4^{-3} (Wetterhahn, 1979; Ottenwälder y Wiegand, 1988; De Flora y Wetterhahn, 1989). Sin embargo, se ha observado que la acumulación del metal se ve incrementada al disminuir el pH del agua (Van der Putte *et al.*, 1981b), donde la especie dominante del Cr(VI) no es ya el anión divalente, CrO_4^{-2} , sino el anión monovalente, HCrO_4^- (Jop *et al.*, 1987).

Independientemente de cual sea el mecanismo, una vez ingresado a la célula, el Cr(VI) es rápidamente reducido a Cr(III), ya sea enzimáticamente (Gunaratnam y Grant, 2001)

ó mediante la interacción con reductores intracelulares como el glutatión (Liu y Dixon, 1996), la cisteína (Zhitkovich *et al* 2001) o el ácido ascórbico (Quievryn *et al.*, 2003). Durante este proceso se forman las especies inestables Cr(V) y Cr(IV), que finalmente conducen a la generación de la especie termodinámicamente más estable, el Cr(III) (Stearns y Wettterhahn, 1994). Durante la reducción del Cr(VI) se generan además especies reactivas de oxígeno (Kawanishi *et al.*, 1986; Kortenkamp *et al.*, 1996) y radicales hidroxilos, thiotilos y carbonilos, capaces de inducir estrés oxidativo (Aiyar *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1994; Stearns y Wettterhahn, 1994). Sin embargo, el mayor efecto tóxico atribuido al cromo, está relacionado con la capacidad de las especies Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), formadas durante la reducción del Cr(VI), de interaccionar con las macromoléculas, dañándolas e interfiriendo sus actividades biológicas. En tal sentido el cromo es capaz de unirse y producir cambios estructurales en las proteínas (Gayatri *et al.*, 1997), y de dañar el ADN, induciendo rupturas de cadena (Sugiyama *et al.*, 1986), generando sitios alcalinos lábiles (Cantoni y Costa, 1984) o formando uniones cruzadas ADN-ADN (Xu *et al.*, 1996) o ADN-proteína (Costa, 1991), aductos binarios Cr-ADN, o ternarios Cr-ADN-(glutatión, cisteína / histidina / ascorbato) (Zhitkovich *et al.*, 1995; Zhitkovich *et al.*, 2001; Quievryn *et al.*, 2002).

La capacidad del Cr(VI) de unirse a las proteínas de manera generalizada e inespecífica durante su reducción intracelular, ha quedado de manifiesto en un estudio donde concentraciones subletales de K₂CrO₄ (5, 10 y 15 mg/L) durante 2 a 6 días, inducen la inhibición general del sistema de ATPasas branquiales, renales y hepáticas en el pez, *P. dipes* (Thaker *et al.*, 1996). Un efecto similar fue observado en el pez *Channa punctatus*, donde se manifestó una inhibición general de las enzimas involucradas en el metabolismo de los hidratos de carbono, al exponer a los individuos a concentraciones subletales (2,5 mg/L) crónicas (60 y 120 d) del metal (Sastry y Sunita, 1983).

Por otro lado, como se mencionara previamente, el Cr es capaz de inducir varios tipos de daño en el ADN de las células. Este efecto genotóxico del cromo ha sido puesto de manifiesto en experimentos in vivo con peces. Por ejemplo, en juveniles de la carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*) expuestos a concentraciones de Cr(VI) de 25, 50 y 100 ng/ml durante 3, 7 y 9 d, se observó un incremento de la frecuencia de micronúcleos en función de la concentración del metal en el séptimo día, con una pequeña atenuación del efecto hacia el noveno día (Al Sabti *et al.*, 1994). Una

observación similar fue obtenida a en individuos de *Pimephales promelas* expuestos a 2,5 mg/L durante 7, 14 y 21 d, en los cuales se evidenció que la frecuencia de micronúcleo aumenta respecto a los individuos control hasta el día 14 y luego retorna a los mismos valores que los presentados por los individuos control hacia el día 21 (Torres de Lemos *et al.*, 2001).

La capacidad del Cr, de inducir una inhibición generalizada de los sistemas enzimáticos de la célula y de causar daños en el ADN, ha sido reflejada claramente por la actividad nucleolar, tanto en la branquia como en el hígado de *O. bonariensis*, mostrando una reducción general de los valores de VTP en función de la concentración de Cr y del tiempo de exposición. Esta observación es consistente con un estudio reciente, donde se ha postulado que el nucleolo actuaría como un censor de estrés, respondiendo frente a diferentes factores capaces de inducir una disrupción funcional en este dominio nuclear (ej. daño en el ADN), mediante la inducción de un aumento de la proteína p53, que finalmente conducirá a la reducción de la actividad sintética de la célula, al arresto celular e incluso finalmente, a la muerte por apoptosis (Rubbi y Milner, 2003).

La menor respuesta observada en el VTP hepático respecto al VTP branquial, podría ser explicada, por un lado, a los menores niveles de acumulación del Cr observados en el hígado (ver Capítulo V), y por otro, al hecho que el Cr(VI) es rápidamente reducido a Cr(III) al atravesar la branquia e ingresar a la circulación sanguínea (Langard *et al.*, 1978; Korallus, 1986; Kerger *et al.*, 1997), donde además parte de este es ligado irreversiblemente a la hemoglobina (Korallus, 1986) y la transferrina (Harris, 1977), con la consecuente pérdida de reactividad, y por lo tanto, reducción de su toxicidad (De Flora, 2000).

VIII.b.3. Implicancias ambientales de las respuestas observadas a nivel letal y subletal en O. bonariensis frente al Cr(VI).

La relación entre los niveles de Cr en la branquia y el hígado de *O. bonariensis*, indican que esta relación es de 10 veces mayor en la branquia de los pejerreyes no expuestos y que luego de 384 h de exposición esta diferencia sólo se reduce al doble, indicando un aumento proporcionalmente mayor en el hígado, en respuesta a la exposición al metal. Sin embargo, como la branquia siempre presentó valores mayores a los del hígado, la relación entre el contenido de Cr entre ambos tejidos, no parece ser un

indicador adecuado para establecer, en los ambientes naturales, si los peces están siendo o no expuestos al metal. Sin embargo, la determinación de los niveles de Cr en la branquia, que resultan letales para *O. bonariensis*, podría resultar un buen indicador para establecer posibles efectos letales del metal durante exposiciones a campo, puesto que el modelo para predecir los valores de LC50 en función del tiempo de exposición, basado en la asunción de que la concentración del metal en la branquia que produce mortalidad es constante (Meyer *et al.*, 1999), se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales.

Por otro lado, si se observa independientemente la relación para cada tejido entre los organismos expuestos y no expuestos, se encuentra que mientras en la branquia la concentración de Cr se incrementó 25,5 veces con la exposición al metal, en el hígado, éste incremento fue de 38,5 veces. Cuando se compara el incremento de los niveles de Cr en el hígado de *O. bonariensis* en función de la exposición, se observa que este fue casi 3 veces mayor al hallado en individuos de *S. fossilis* expuestos a la misma concentración, pero durante 28 d (Khangarot *et al.*, 1999). Esta mayor acumulación en el hígado de *O. bonariensis* respecto a *S. fossilis*, podría explicar en parte la mayor sensibilidad mostrada por los pejerreyes en comparación con la mayor parte de las demás especies de peces comparadas. En este sentido, *O. bonariensis* se ha mostrado como una especie sensible al Cr(VI) tanto frente a exposiciones letales agudas (LC50_(96h) entre 1523,3 a 5470,3 µg/L; ver capítulo VI) como durante exposiciones subletales a corto y mediano plazo (LOEC para el VTP_(6 y 384h) de 500 y 100 µgCr(VI)/L respectivamente; ver capítulo VII).

Respecto a las variables fisicoquímicas del agua que influyen sobre la toxicidad del Cr, estudios previos han determinado que el pH del agua es el parámetro que posee mayor relevancia. Por ejemplo, en truchas (*Salmo gairdneri*) expuestas a concentraciones de Cr(VI) entre 1 y 50 mg/L en agua, con un pH de 7,8 o de 6,5 durante 2 y 4 d, se observó que en los organismos mantenidos al menor pH, el Cr indujo un mayor efecto sobre la mortalidad y la acumulación del metal en la branquia (Van der Putte *et al.*, 1981b), y sobre los cambios morfológicos inducidos en ese tejido (Van der Putte *et al.*, 1981a). También el efecto fue mayor sobre las alteraciones en la frecuencia ventilatoria, la osmolaridad del plasma, la concentración de electrolitos, los niveles de hemoglobina, valores del hematocrito, y la concentración de glucosa y lactato en el plasma (Van der Putte *et al.*, 1982). Un efecto similar fue hallado en *Tilapia sparrmanii*

expuestas a 0,098 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ durante 96h a pH 5, 7,5 y 9, observándose que los peces expuestos a menor pH presentaron una menor capacidad de coagulación y un mayor sangrado interno (Gey van Pittius *et al.*, 1992). Un experimento similar con la misma especie, mostró mayor incremento del número de eritrocitos y leucocitos en la sangre de los individuos expuestos al Cr al pH más bajo (Wepener *et al.*, 1992). Otro estudio realizado en estadíos tempranos de la carpa común (*Cyprinus carpio*), expuestos a 3,9 y 9,6 mmol/l de Cr(VI) durante un período de entre 6 a 264 h en aguas con un pH de 7,8 y 6,3, arrojó resultados concordantes con los anteriores, donde sólo los peces expuestos a la mayor concentración de Cr(VI) y al menor pH mostraron un incremento en la mortalidad, un descenso de los niveles de Na, aumento en el número de células mucosas de la piel, y la aparición de arrugas y espacios circulares oscuros en el epitelio branquial (Stouthart *et al.*, 1995).

De acuerdo a diferentes estudios limnológicos, donde se informan valores de pH para diferentes cuerpos de agua en los que comúnmente habita el pejerrey, se observa que éste parámetro puede variar tanto en un mismo lugar en función del tiempo, como de un lugar a otro. Por ejemplo, un estudio realizado durante un año y medio en el Bajo Paraná, mostró valores máximos promedio de pH en Junio ($7,75 \pm 0,13$ media y desviación estándar, $n = 4$) y mínimos promedio en Abril ($6,35 \pm 0,31$ media y desviación estándar, $n = 4$) con un valor máximo y mínimo de 7,9 y 6,1 en cada mes respectivamente (Villar *et al.*, 1998b). Por otro lado, en un estudio realizado durante casi dos años en la Laguna de Chascomús, no se observó una variación estacional del pH, sino que este fue un cambio más irregular (probablemente relacionado a eventos de lluvias y sequías), obteniéndose un valor promedio de 8,6, con niveles máximos y mínimos de 9,0 y 8,0 respectivamente (Conzonno y Claverie, 1990). Respecto a la variación espacial, pareciera existir un gradiente del pH con valores que van en aumento desde el Bajo Paraná hasta las lagunas de la cuenca del Río Salado. Por ejemplo los valores de pH promedio (con su desvío estándar), máximo y mínimo obtenidos en diferentes estudios para varios cuerpos de agua la región fueron respectivamente: para el Bajo Paraná $7,75 \pm 0,13$, 7,9 y 6,1 (Villar *et al.*, 1998b) y $7,1 \pm 0,05$ (Villar *et al.*, 1998a), para el Río de la Plata $7,80 \pm 0,31$, 8,0 y 7,2 (Villar *et al.*, 1998b), para el Río Samborombón $8,36 \pm 0,06$, 8,4 y 8,3 (Mercado, 2000), para la Laguna de Chascomús $8,6 \pm 0,24$, 9,0 y 8,0 (Conzonno y Claverie, 1990) y para la laguna de San Miguel $8,71 \pm 0,69$, 9,20 y 8,23 (Gabellone, *et al.*, 2001).

Por otro lado, los niveles promedio (y su desvío estándar) y máximos de Cr total en agua, obtenidos para algunos de los cuerpos de agua previamente mencionados han sido respectivamente: para el Bajo Paraná $19,75 \pm 5,12$ y $27 \mu\text{g/L}$ y para la margen occidental el Río de la Plata $44,25 \pm 30,11$ y $102 \mu\text{g/L}$ (Villar *et al.*, 1998a). En otro estudio realizado sobre la margen occidental del Río de la Plata, se han hallado valores de Cr total en agua de 30 , 80 y $56 \mu\text{g/L}$ a la altura de Bernal, Punta Colorada y Ensenada respectivamente en un muestreo realizado en 1989 y de 5 , 7 , 17 , 15 , $35 \mu\text{g/L}$ frente a Palermo, el Riachuelo, Bernal y Quilmes, respectivamente, en otro muestreo posterior realizado en el año 1990 (AGOSBA-OSN-SIHN, 1992). Un estudio posterior realizado sobre la misma zona, pero durante los períodos 1992-93 y 1994-95, hallaron valores máximos (y promedios) de Cr total en agua frente a las costas de San Isidro, Palermo, Riachuelo, A. Sarandí, A. Santo Domingo, Bernal, Berazategui, Punta Colorada, Punta Lara, Ensenada, Berizo y Punta Blanca de 11 (6,7), 15 (9,3), 37 (25), 1.800 (1000), 4.100 (1500), 35 (20), 25 (16), 16 (11), 26 (25), 21 (12), 24 (19), 14 (10) $\mu\text{g/L}$, respectivamente durante el primer muestreo y 260 (80), 26 (19), 130 (54), 110 (65), 200 (50), 52 (30), 43 (27), 37 (21), 36 (22), 33 (18) $\mu\text{g/L}$, respectivamente (sin datos para Berizo y Punta Blanca) durante el segundo muestreo (AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997). En otro estudio realizado en la desembocadura del Riachuelo han llegado a determinar hasta $72.200 \mu\text{g}$ de Cr total/L (Kreimer *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio realizados en la Cuenca del Río Salado, sobre la base de 11 sitios muestreados, se observó una tendencia a al incremento de los valores del metal desde la desembocadura hacia la naciente, con valores mínimos de Cr total en el agua de $35 \mu\text{g/L}$ para la Laguna de Monte y máximos de 71 y $69 \mu\text{g/L}$ para el Río Salado a la altura de Achupallas y la Laguna de Junín, respectivamente (datos no publicados).

De acuerdo al gradiente de pH observado en la región, la zona donde los efectos letales o subletales del Cr sobre el pejerrey podrían ser más acentuados, se correspondería con el Bajo Paraná, especialmente durante el otoño. Contrariamente, los ambientes acuáticos vinculados a las cuencas de los Ríos Samborombón y Salado, representan los sitios que ofrecen mayor protección frente a los posibles efectos tóxicos del Cr. De acuerdo a los niveles de Cr encontrados en los diferentes cuerpos de agua mencionados, es evidente que el Río de la Plata representa el sitio más crítico. Debido a las concentraciones máximas de Cr allí encontradas ($72.200 \mu\text{g/L}$, Kreimer *et al.*, 1996; $4.100 \mu\text{g/L}$, AA-AGOSBA-ILPLA-SHN, 1997), es esperable que, bajo

determinadas circunstancias particulares, en estas zonas puntuales se puedan esperar efectos letales del Cr sobre los pejerreyes. Por otro lado, en algunos casos (ej, San Isidro y A. Santo Domingo) las concentraciones promedio se encuentran próximas a aquellas que han inducido efectos subletales a nivel de la actividad nucleolar branquial y por lo tanto, bajo determinadas circunstancias, podría ser factible observar efectos subletales inducidos por éste metal sobre esta especie. Contrariamente, en la Cuenca del Río Salado, de acuerdo a la mayor alcalinidad de sus aguas y las concentraciones de Cr observadas, pareciera menos probable que el metal esté causando algún tipo de efecto letal o incluso subletal sobre el pejerrey.

Si bien, como se ha discutido en el capítulo precedente, la respuesta a nivel de la actividad nucleolar estaría indicando un daño celular generalizado (alteración del metabolismo celular por inhibiciones enzimáticas inespecíficas y daño en el ADN), las consecuencias de estas alteraciones sobre la capacidad de supervivencia, el crecimiento y la reproducción de los individuos, aún es poco clara. En tal sentido, no se han hallado en la bibliografía disponible, relaciones entre los efectos subletales previamente descritos y su impacto sobre los parámetros biológicos mencionados. Por ejemplo, en el mediano plazo evaluado en el presente estudio durante las exposiciones subletales, pese a advertir reducciones en la actividad nucleolar branquial y hepática, no se observó una disminución en el crecimiento promedio de los individuos expuestos al metal, aunque quizás ésta falta de efecto, se deba sólo a un tiempo de exposición insuficientemente prolongado. Por otro lado, en otro trabajo, se ha demostrado que, en *Saccobranchus fossilis*, exposiciones a concentraciones subletales de Cr(VI) (como $K_2Cr_2O_7$) durante 28 d, afectan la respuesta inmune y reducen la resistencia a enfermedades (Khangarot *et al.*, 1999), indicando que éste metal podría llegar a reducir la capacidad de supervivencia de *O. bonariensis* en sus ambientes naturales. Por lo tanto, es evidente que es materia pendiente, el establecimiento de relaciones entre las respuestas subletales observadas frente a la exposición de los peces al Cr y las posibles consecuencias sobre otros parámetros de mayor relevancia biológica y ecológica.

VIII.c Comparación entre los patrones de acumulación, la letalidad y la respuesta de la actividad nucleolar en *O. bonariensis* expuestos a Cd y el Cr. Posibles explicaciones según sus mecanismos de acción.

Cuando se analizan en conjunto la acumulación, los efectos letales y los efectos subletales observados en individuos de *O. bonariensis* expuestos a diferentes niveles de Cd y el Cr en el agua, puede destacarse como hecho más evidente, la diferencia de toxicidad presentada por estos dos metales frente a la especie estudiada.

Cuando se compara como ha sido la **acumulación** de cada uno de estos metales en los diferentes tejidos de los pejerreyes, se observa que en la branquia, la concentración final y el FA del Cd (en moles) fueron, respectivamente, 2 y 13 veces mayores que los del Cr. Sin embargo, la mayor diferencia fue hallada a nivel del FBC, que fue 900 veces mayor para el Cd, poniendo en evidencia la mucho mayor afinidad que éste metal presenta por la por la branquia. Esta particularidad del Cd, ha sido puesta de manifiesto en estudios previos donde se estimaron las constantes termodinámicas de estabilidad de equilibrio condicional (modelo del ligando biótico) para la unión de este metal con la branquia. Por ejemplo, para *Pimephales promelas*, se hallaron valores de $K_{\text{Cd-branquia}} = 8,6$, que resultan comparativamente altos respecto a los estimados para $K_{\text{Cu-branquia}} = 7,4$ o para $K_{\text{Ca-branquia}} = 5,0$ y $3,4$ (Playle *et al.*, 1993b). La gran afinidad observada, puede ser explicada, al menos en parte, debido a que la especie química dominante del cadmio, en las condiciones ensayadas, el Cd^{+2} , posee una gran capacidad de interactuar con grupos aniónicos ubicados sobre la superficie branquial (Pagenkopf, 1983; Playle, 1998). El metal es luego incorporado en mayor medida a través de transportadores específicos de Ca^{+2} ubicados en la membrana apical (Verbost *et al.*, 1987; 1989; Block y Pärt, 1992), principalmente a nivel de las células del cloro (Wicklund Glynn *et al.*, 1994), para finalmente unirse irreversiblemente a las Ca^{+2} -ATPasas ubicadas en las membranas basolaterales de dichas células (Verbost *et al.*, 1989). Contrariamente, las especies dominantes del cromo, el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ o CrO_4^{-2} , mostraron una menor afinidad por la superficie branquial (bajo valor de FBC), y además su ingreso al tejido podría ocurrir a través de canales inespecíficos para aniones, de modo equivalente a como ha sido descrito para las células de mamíferos (Wetterhahn, 1979; Wiegand *et al.*, 1985; Ottenwälder y Wiegand, 1988), características que probablemente conduzcan a la menor acumulación observada de este metal en la branquia.

Contrariamente, en el hígado, la acumulación del Cr fue 4,2 veces mayor a la del Cd, y si bien, presentó un FBC (concentración respecto al agua) 100 veces menor, su FA (respecto a los individuos control) fue 3,5 veces mayor. Además, la concentración de Cr en el hígado representó el 50% de la hallada en la branquia, esta misma relación para el Cd fue sólo del 5%. Esto muestra que el Cr posee una mayor capacidad para penetrar hacia el interior de los organismos, particularmente al hígado, que el Cd. Una posible explicación a esta observación, es el hecho previamente comentado, sobre la gran afinidad del Cd^{+2} por la superficie branquial, a la que se liga muy fuertemente, y que por lo tanto podría restringir su circulación hacia el interior del organismo. De manera opuesta el Cr(VI), que presentó menor afinidad por los componentes branquiales, podría atravesar este órgano más fácilmente, y luego de reducido a Cr(III), y ligarse a la hemoglobina, en los eritrocitos (Korallus, 1986), y a la transferrina (Harris, 1977), en el plasma. El Cr(III) unido a estas proteínas puede ser así transportados a través de la circulación sistémica, para ser finalmente incorporado por los hepatocitos probablemente mediante mecanismos de endocitosis.

Estos patrones de acumulación, característicos de cada uno de los dos metales estudiados, son consistentes con los efectos letales y subletales observados tras la exposición de *O. bonariensis* a cada uno de ellos. Por un lado, la gran acumulación de Cd en la branquia se corresponde con los marcados efectos letales agudos que, para el pejerrey, presentó este metal. Por otro, la mayor capacidad de alcanzar los órganos internos del Cr, se corresponde con la mayor respuesta de la actividad nucleolar hepática, indicando un grado de daño celular más marcado que el inducido por el Cd, y que por lo tanto mostraría al Cr con una mayor capacidad de inducir efectos subletales.

La diferencia entre los niveles de **toxicidad letal aguda** manifestada por cada uno de estos metales sobre *O. bonariensis*, es consistente con los resultados obtenidos por otros autores. Una explicación al desigual efecto observado, podría ser dado mediante el modelo propuesto por Meyer (2002), donde el autor sostiene que la concentración de un metal en la branquia (órgano blanco de los peces a nivel letal agudo) que es capaz de inducir la muerte de un individuo es constante. Este modelo ha sido probado para metales cuya especie química predominante fueron cationes bivalentes como el Cu^{+2} y el Ni^{+2} (Meyer *et al.*, 2002). Si bien en las condiciones ensayadas el Cr se encuentra en forma aniónica, cuando se comparan los FBC de cada metal en relación a su la toxicidad aguda, se observa que pareciera existir una cierta vinculación entre estas dos

variables. Por ejemplo, si se asume que la concentración de cada metal en la branquia capaz de inducir la muerte es constante y si se supone que esta es la misma para ambos metales, entonces, de acuerdo a los valores de FBC obtenidos, la concentración de Cr en el agua, debiera ser 900 veces mayor a la del Cd para que el nivel de acumulación en el tejido sea el mismo y por lo tanto inducir el mismo efecto letal. Ahora, cuando se comparan las $LC50_{(96h)}$, se observa que la del Cr fue sólo 250 veces mayor a la del Cd. Esto quiere decir que, si el modelo propuesto por Meyer (2002) se cumpliera, la concentración de Cr en la branquia que induce mortalidad, debiera ser 3,6 veces menor a la de Cd. De aquí se deduce que la letalidad de cada metal no depende sólo de su acumulación, sino también, de la capacidad propia de cada metal de causar daño en el tejido e inducir los efectos fisiológicos que desencadenan en la muerte del organismo. En este sentido, el Cr pareciera ser más dañino a nivel celular que el Cd. Por lo tanto, la mayor letalidad observada para el Cd, no se explicaría por una mayor capacidad de disrupción de los mecanismos celulares, sino por su gran afinidad por el tejido branquial, reflejado en este estudio por su alto FBA.

A nivel de los **efectos subletales**, la diferencia más notoria observada entre el Cd y el Cr fue que, mientras el Cd redujo el VTP en la branquia y lo incrementó en el hígado, el Cr indujo una reducción de este parámetro en los dos tejidos. Esto concuerda con el patrón de acumulación previamente mencionado para cada metal y con los mecanismos de toxicidad diferentes propuestos en la bibliografía para cada uno de ellos.

En relación a los efectos subletales inducidos por ambos metales a nivel de la actividad nucleolar en la branquia de *O. bonariensis*, se observó una respuesta equivalente del VTP frente a concentraciones de Cd en el agua dos órdenes de magnitud menores que las de Cr. Sin embargo, si la respuesta del VTP branquial se compara con la concentración de cada metal en el tejido, se observa que la concentración de Cd que indujo una respuesta similar sobre a la del Cr, fue dos veces mayor (Tabla V.11.). Este resultado, es comparable a la concentración estimada de Cd en el tejido (3,6 veces mayor), capaz de inducir la misma respuesta letal que el Cr. Por lo tanto a nivel subletal, la respuesta del VTP branquial también pareciera depender de la acumulación de cada metal en el tejido y de características propias de sus mecanismos de acción.

Las posibles causas de la gran afinidad del Cd por la branquia fueron discutidas previamente. La aparentemente mayor toxicidad a nivel celular (entre 2 a 3,6 veces mayor) observada para el Cr, podría ser explicada sobre la base de diferencias vinculadas, por un lado, al sistema de detoxificación de la célula y por otro, a los mecanismos de acción de cada tóxico. Si bien se ha observado que intracelularmente, el Cr tiene la capacidad de unirse preferentemente a proteínas de bajo peso molecular (LMWCr), la función que estas cumplirían no ha sido, hasta el momento, completamente dilucidada (Wada *et al.*, 1984). Por el contrario, la interacción del Cd con las metalotioneínas, ha sido mucho más estudiada y está actualmente aceptado que representa un sistema de protección muy eficiente frente a la exposición a éste metal (Roesijadi, 1992; Klaassen *et al.*, 1999). Por otro lado, a nivel de los mecanismos de acción, aunque tanto el Cd como el Cr comparten la capacidad de interactuar e interferir directamente con las funciones biológicas de un gran número de proteínas, estos difieren en su modo de accionar sobre el ADN. Se ha observado, que el Cd es débilmente mutagénico y que el daño sobre el ADN, es principalmente debido al estrés oxidativo inducido por el metal (Ochi y Ohsawa, 1985). En cambio, el Cr si bien también posee la capacidad de generar radicales orgánicos (Stearns y Wetterhahn, 1994) y radicales hidroxilos (Shi *et al.*, 1999), tiene la propiedad de interactuar directamente con el ADN e inducir rupturas de cadena (Sugiyama *et al.*, 1986), generar sitios alcalinos lábiles (Cantoni y Costa, 1984), puentes cruzados ADN-ADN (Xu *et al.*, 1996) y ADN-proteínas (Costa, 1991), o también formar con el, aductos binarios Cr(III)-ADN o ternarios Cr(III)-ADN con glutatión, cisteína, o histidina (Zhitkovich *et al.*, 1995).

Cuando se comparan las respuestas a nivel de la actividad nucleolar en el hígado de los pejerreyes expuestos a ambos metales, se observa una clara diferencia entre el efecto del Cd y del Cr. Mientras que las concentraciones mayores de Cd no produjeron cambios significativos en el VTP, las concentraciones más bajas ensayadas incrementaron los valores de este parámetro. Contrariamente, las concentraciones más bajas de Cr no afectaron el parámetro, mientras que las más elevadas indujeron una reducción significativa del VTP. Parte de la explicación a tales diferencias, puede darse en función de los niveles de acumulación diferentes presentados por cada uno de los metales en el hígado y por el mecanismo de acción propio de cada uno de ellos. Los niveles hallados para cada metal en el hígado, muestran que la acumulación (en moles) del Cr fue alrededor de 4 veces mayor que la del Cd (Tabla V.11.). Estos mayores niveles de Cr en el tejido, justificarían la reducción del VTP, como una indicación del

daño celular inducido por los mecanismos de acción previamente descritos para el metal. Por otro lado, el incremento del VTP en respuesta a los bajos niveles de Cd acumulados en el tejido, puede entenderse como resultado de la propiedad de este metal de inducir, a bajas concentraciones, alteraciones en el sistema de señalización intracelular, incrementando la expresión de determinados genes como los proto-oncogenes (ej. c-fos, c-jun, c-myc) con el consecuente posible desarrollo posterior de tumores (Beyersmann y Hechtenberg 1997).

VIII.d Especulaciones sobre los posibles modos y mecanismos de acción del Cd y Cr en O. bonariensis en relación a los resultados obtenidos y al marco teórico vigente.

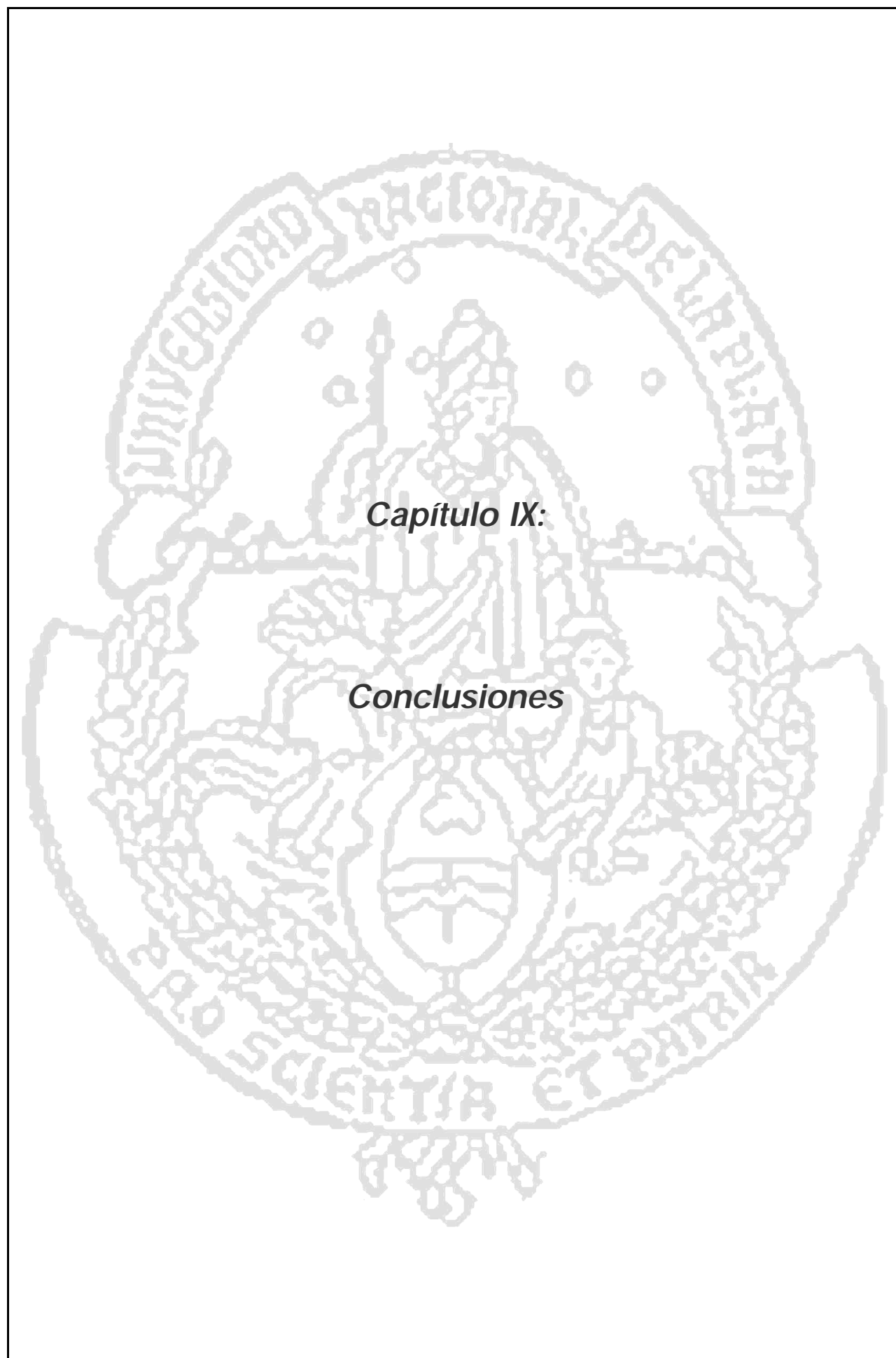
De acuerdo a los resultados obtenidos de la presente evaluación integrada sobre las diferentes respuestas biológicas observadas (acumulación, efectos letales y efectos subletales) en los peces expuestos a Cd y Cr, y a la información recogida de la extensa bibliografía consultada, se realizan aquí especulaciones sobre los posibles modos y mecanismos de acción tóxica de estos metales en *O. bonariensis* en relación al marco teórico actual, intentando generar nuevas hipótesis que puedan sentar las bases para potenciales líneas de investigaciones futuras. En tal sentido podemos decir que:

- i) los efectos letales de ambos metales parecieran deberse principalmente a las disfunciones que causan a nivel de la branquia. En el caso del Cd, su marcada letalidad (a muy bajas concentraciones del metal en el agua), puede ser atribuida a su afinidad por los grupos aniónicos ubicados en la superficie branquial, hecho que incrementa su bioconcentración hasta niveles suficientemente elevados para permitir el ingreso pasivo del metal a través de canales de Ca^{+2} ubicados en la cara apical, principalmente de las células del cloro, y bloquear las Ca^{+2} -ATPasas basolaterales, impidiendo así el ingreso de Ca^{+2} y causando una pérdida neta de este elemento, que conduce a la muerte del organismo por hipocalcemia. La disminución de la activada nucleolar observada en la branquia de los pejerreyes expuestos a este metal, indica que otros daños celulares ocurren como consecuencia de los altos niveles de Cd, pero de acuerdo a la mayoría de los trabajos consultados, estos no parecieran jugar un papel tan importante en la inducción del efecto letal como la pérdida de Ca^{+2} . Por tal motivo, la dureza del agua es el parámetro fisicoquímico que mayor protección ofrece frente a la toxicidad del Cd. En el caso del Cr(VI), su menor afinidad por la branquia hace que

su toxicidad aguda sea más reducida, ya que los niveles de este metal en el agua necesarios para inducir letalidad deberán ser más elevados. Si bien, el mecanismo por el cual el Cr(VI) induce la muerte de los organismos no está claramente dilucidado, es aceptado que el CrO_4^{-2} ingresa a la branquia mediante canales inespecíficos para aniones (SO_4^{-2} , PO_4^{-3}) y que es rápidamente reducido intracitoplasmáticamente, por vía enzimática o mediante reductores naturales (glutarato, ascorbato), a Cr(III) con la consecuente formación de aductos con las proteínas y ADN, y la generación de estrés oxidativo. Se cree la formación de aductos es el principal mecanismo que explica la toxicidad del Cr, puesto que éstos serían capaces de causar un bloqueo masivo e inespecífico de las macromoléculas branquiales. Esta hipótesis, se corresponde con el descenso observado en la actividad nucleolar y que sería indicador daño celular. La inhibición de las funciones biológicas de las proteínas y ácidos nucleicos branquiales, inducirán disfunciones a nivel de la osmoregulación, del intercambio gaseoso, de la regulación ácido base y de la excreción de desechos nitrogenados que conducirán finalmente a la muerte de los peces.

- ii) los efectos subletales del Cd y Cr aún no se son comprendidos claramente. Pese al gran número de estudios realizados para evaluar los efectos subletales del Cd en peces, hasta el momento no se ha encontrado que este metal induzca efectos a este nivel (ej. sobre el crecimiento, capacidad natatoria, consumo de oxígeno). Este hecho puede ser explicado en parte, como consecuencia de la gran afinidad que, se ha observado, posee este metal por la branquia y que actúa restringiendo su ingreso al organismo y manteniendo su nivel en los órganos internos muy bajo. Además, los altos niveles de metalotioneínas y su gran capacidad de complejación del Cd, que han sido observados en el hígado de los peces ofrecen una eficiente protección contra este metal. Además se ha observado que este sistema de protección le permite a los peces aclimatarse al metal cuando las exposiciones no son agudas. Toda la evidencia conduce a pensar que el principal sitio de acción del Cd es la branquia y que su mayor acción tóxica es la interferencia con la fisiología del Ca. Sin embargo, el aumento de la actividad nucleolar hepática inducida por las bajas concentraciones de Cd en este tejido, puede relacionarse con la capacidad que presenta el Cd, a muy bajas concentraciones, de interferir con los mecanismos de señalización celular. En tal sentido, se ha puesto de manifiesto en cultivos celulares tratados con muy bajos niveles de este metal, que el Cd es capaz de

aumentar la expresión génica, induciendo genes del tipo de los oncogenes c-myc, c-jun y c-fos. Este hecho podría estar alertando sobre un posible aumento en la probabilidad de desarrollo de tumores en los peces inducido por el Cd. Los efectos subletales causados en los peces por el Cr han sido mucho menos estudiados. La mayor capacidad de ingresar al organismo evidenciada por su mayor acumulación en el hígado, junto a la reducción de la actividad nucleolar causada por el metal en éste tejido, indican que el Cr estaría causando, en algún grado, daño celular a nivel hepático, que podría acarrear consecuencias sobre el normal desempeño de las funciones biológicas y sobre la capacidad adaptativa de los pejerreyes expuestos a este metal. La capacidad de interferir con el metabolismo de los carbohidratos y de deprimir del sistema inmune halladas por otros autores, conducen a pensar que el Cr pudiera llegar a causar efectos subletales en los peces, pero es evidente que aún es necesaria la realización de un número mayor de estudios dirigidos en este sentido.



Capítulo X. Conclusiones

En relación a las hipótesis postuladas, de acuerdo a los objetivos planteados y en virtud de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que:

- i) en el presente estudio se ha logrado desarrollar un sistema de cultivo para *O. bonariensis* a escala de laboratorio de bajo costo de funcionamiento y fácil mantenimiento, que ha permitido la realización de estudios toxicológicos y biológicos en condiciones controladas de experimentación, con una de las especies de peces dulceacuícolas de mayor interés socioeconómico de la Argentina.

- ii) por primera vez se ha determinado el patrón de acumulación del Cd y el Cr en el hígado y la branquia de *O. bonariensis*, hallando que éste es función de la concentración de cada metal en el agua, del tiempo de exposición y de las características de cada metal. Así, el Cd^{+2} presentó una gran afinidad por la branquia, reflejada por el alto grado de bioconcentración en éste tejido y el reducido poder de "penetración" al interior del organismo evidenciado por los reducidos niveles del metal en el hígado. Por otro lado, el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$, mostró una afinidad mucho menor por la branquia, mostrando una mayor capacidad de ingresar al organismo, y por lo tanto, una mayor acumulación relativa en el hígado que el Cd. La marcada diferencia de concentración entre la branquia y el hígado hallada entre los pejerreyes expuestos a Cd, presenta a esta relación como un buen biomarcador de exposición a concentraciones subletales del metal en el agua, aún durante períodos relativamente prolongados de hasta 384h. Esta relación ha sido menos marcada para el Cr, donde el incremento relativo del metal fue mayor en el hígado, y por consiguiente poseería menor utilidad como indicador.

- iii) respecto a los efectos letales agudos inducidos por el Cd y Cr sobre el pejerrey, la especie presentó una sensibilidad a los mismos comparable a aquella manifestada por el grupo de especies de peces más sensibles a estos metales. El diferente grado de sensibilidad presentado para cada metal, guardó relación directa con la capacidad que cada uno de ellos presentó para bioconcentrarse en la branquia (se evidencia más claramente cuando se expresa en concentraciones molares). Las características del agua y la edad de los individuos influyeron significativamente sobre la toxicidad que cada uno de estos metales presentó sobre la especie,

incrementándose ésta, a medida que la dureza del agua y la edad disminuyeron. La dependencia de la toxicidad letal aguda de estos metales con el tiempo de exposición pudo ser interpretada satisfactoriamente mediante un modelo donde se asume que la concentración en la branquia que causa la muerte de un individuo es constante y que sólo depende del tiempo en que tarde en alcanzarla.

- iv) el estudio de los efectos subletales del Cd y Cr evaluados a través de la respuesta de la actividad nucleolar, mostró al VTP como un parámetro sensible frente a la exposición de los peces a concentraciones subletales de Cd y Cr, tanto a nivel de la branquia como del hígado de los pejerreyes, respondiendo rápidamente y a bajas concentraciones de los metales. Contrariamente el NTP no presentó una respuesta clara frente a la exposición a los metales. La respuesta del VTP, guardó relación tanto con los niveles de acumulación de cada metal en los tejidos como con los mecanismos de acción descritos por otros autores para estos elementos. Sin embargo, este parámetro fue capaz de responder frente a otros factores de estrés, como por ejemplo la reducción en los niveles de alimentación, y por lo tanto el VTP no constituiría un biomarcador específico para los metales estudiados, sino que se comportaría como un biomarcador general de estrés. Dada la buena sensibilidad demostrada, éste parámetro se presenta atractivo como biomarcador de efecto (si se confirmaran para la presente especie los efectos adversos nivel celular que en distintos modelos modelos, han sido atribuidos por otros autores a los cambios nucleolares aquí observados) en estudios realizados en condiciones de laboratorio. Al igual que lo observado para otros biomarcadores (ej. Citocromo P450), su implementación en estudios de campo, requeriría de un profundo conocimiento de la especie y de los ciclos estacionales que pudieran estar afectando su metabolismo.
- v) el enfoque integrado (evaluación de respuestas a nivel letal y subletal en relación con las concentraciones del metal en los tejidos) y comparativo (entre dos metales con comportamiento toxicológico diferente) ha permitido realizar la siguiente generalización: los efectos adversos observados tanto a nivel letal como subletal para ambos metales pueden ser vinculados en mayor medida a la concentración que éstos presentan en los tejidos más que a su concentración en el agua. Esta afirmación queda demostrada por el hecho que: i) el metal que mostró mayor toxicidad letal aguda fue aquél que presentó un mayor grado de bioconcentración

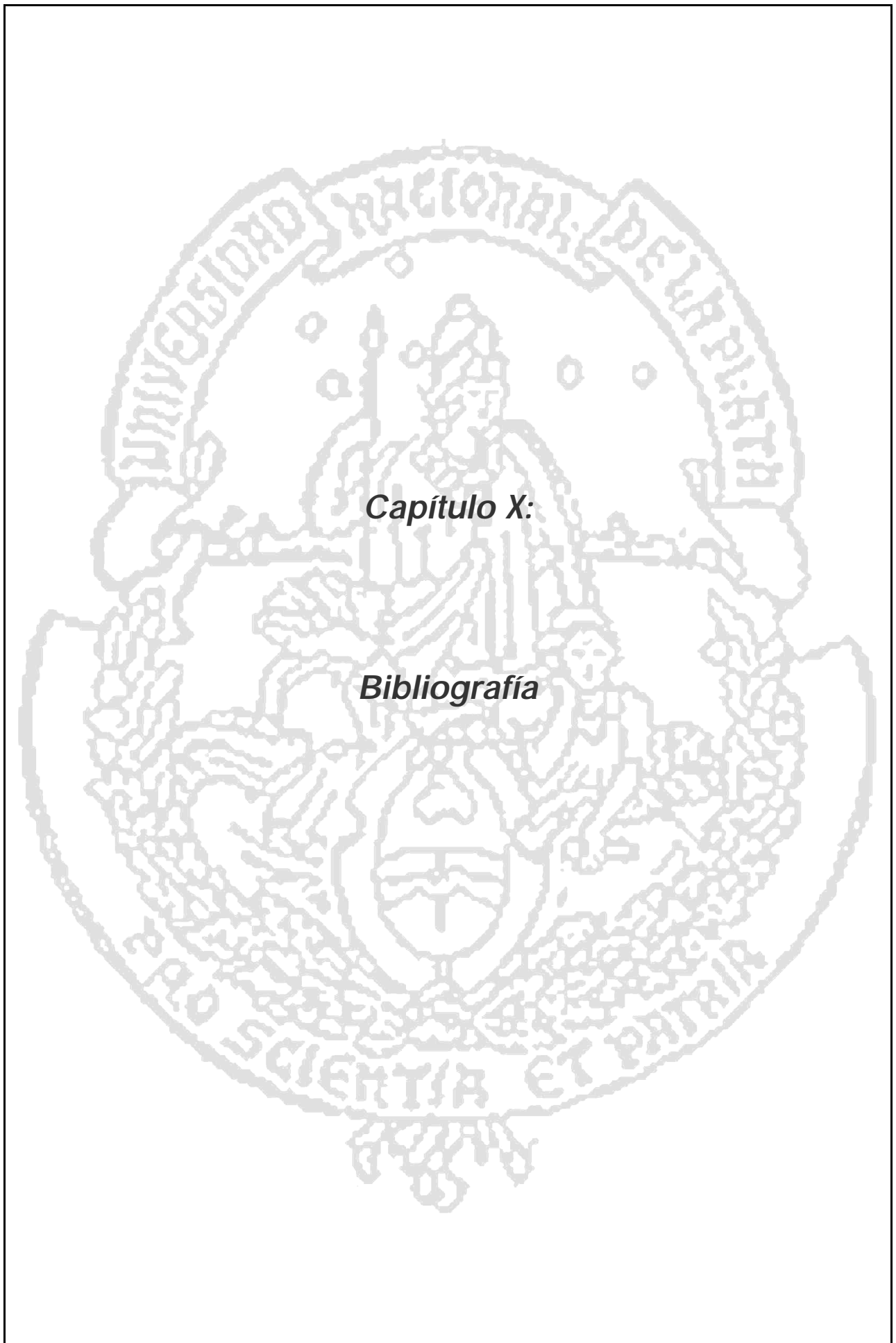
(acumulación respecto a su concentración en el agua) en la branquia, sustentando además la hipótesis de que la branquia es el órgano blanco por excelencia durante exposiciones agudas de los peces a los metales pesados, ii) la relación entre el tiempo de exposición y las LC50 se ajustó satisfactoriamente al modelo desarrollado a partir de la asunción de que la concentración del metal necesaria para inducir un determinado efecto es constante (concentración crítica), iii) pese a haberse descrito mecanismos de acción diferentes para el Cd y el Cr, concentraciones molares semejantes (relativamente elevadas) de ambos metales en los tejidos indujeron respuestas comparables, mientras que concentraciones desiguales causaron respuestas diferentes (por ejemplo a las 48h de exposición los peces expuestos a 10 y 1000 µg/L de Cd y Cr, mostraron una concentración semejante de cada metal -19 y 24 nmol/g, respectivamente- induciendo en ambos casos una reducción significativa del VTP en este tejido -respuesta asociada en la bibliografía a daño celular-, por el contrario en el hígado, donde la concentración de Cd y Cr fueron de 5 y 25 nmol/g, respectivamente, sólo el Cr redujo el VTP (daño), mientras que el Cd no sólo no la redujo, sino que además la estimuló, hecho que podría ser interpretado como un posible desencadenante de disfunción celular, pero a través de un mecanismo completamente diferente al daño anteriormente señalado)

vi) el enfoque integrado ha permitido deducir además que, de acuerdo a los niveles relativamente altos de Cd en la branquia respecto al hígado y a la respuesta del VTP branquial y hepático, el Cd ejercería su mayor acción tóxica, entendida como daño celular generalizado, en la branquia, puesto que sólo una pequeña cantidad del metal fue capaz de llegar al hígado. Sin embargo, el incremento observado del VTP hepático podría estar manifestando la potencialidad de que muy bajas concentraciones de Cd puedan inducir proto-oncogenes y aumentar la susceptibilidad de los organismos de contraer tumores. De un modo diferente, las concentraciones relativamente altas de Cr en ambos tejidos y la reducción del VTP branquial y hepático, pareciera indicar que el Cr tendría la capacidad de desplegar su efecto tóxico tanto en el hígado como en la branquia.

vii) de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio en relación con los niveles de Cd y Cr en el agua que inducen efectos letales y subletales sobre el pejerrey, y al patrón de variación geográfica de las concentraciones de ambos

metales y de las características fisicoquímicas del agua publicadas para el sector meridional de la Cuenca del Plata, i) la vulnerabilidad del Pejerrey al Cd y Cr, debido a las características fisicoquímicas del agua, se incrementa desde las lagunas pampeanas al Bajo Paraná, y que ii) la región donde los niveles de metales en agua se aproximan en mayor medida a aquellas que inducen efectos adversos se corresponden con la zona del Río de la Plata entre San Fernando y Berazategui. Por lo tanto, tomando en cuenta ambos aspectos, la zona que presentaría el peor escenario respecto a la vulnerabilidad del pejerrey sería la zona costera del Río de la Plata frente a San Isidro, donde bajo circunstancias particulares, el pejerrey podría estar sometido a exposiciones letales agudas de Cd y sufrir efectos subletales a nivel de la actividad nucleolar por exposición a Cr.

En el presente trabajo se han podido responder muchas de las preguntas planteadas al comienzo de este estudio y que han contribuido a enriquecer el conocimiento acerca de los efectos tóxicos del Cd y el Cr sobre el pejerrey, sin embargo es evidente que muchas más han sido las que se han originado en el transcurso del mismo.



Capítulo X:

Bibliografía

Capítulo X. Bibliografía

- AA-AGOSBA-ILPLA-SHN 1997. Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (San Fernando – Magdalena). Consejo Permanente para el Monitoreo de la Calidad de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata, Bs. As. pp 157.
- Abel PD, Garner SM 1986. Comparison of median survival times and median lethal exposure times for *Gammarus pulex* exposed to cadmium, permethrine, and cyanide. *Water Res* 20:579-582.
- AGOSBA-OSN-SIHN 1992. Río de La Plata. Calidad de las aguas de la franja costera sur (San Isidro - Magdalena). Servicio de Hidrografía Naval de la Armada Argentina, Bs. As. pp 53.
- Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Watterhahn KE 1990. Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem Res Toxicol* 3:595-603.
- Akiyama T, Murai T, Mori K 1986. Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52:1255–1259.
- Al Akel AS, Shamsi MJK 1996. Hexavalent Chromium: Toxicity and Impact on Carbohydrate Metabolism and Haematological Parameters of Carp (*Cyprinus carpio* L.) from Saudi Arabia. *Aquat Sci* 58:24-30.
- Albergoni V, Viola A 1995. Effects of cadmium on lymphocyte proliferation and macrophage activation in catfish, *Ictalurus melas*. *Fish & Shellfish Immunol* 5:301-311.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3ra edición. Edit. Omega. pp 407-411.
- Allen P 1995. Accumulation profiles of lead and cadmium in the edible tissues of *Oreochromis aureus* during acute exposure. *J Fish Biol* 47:559–568.
- Alliende C, Esponda P 1988. Nucleolar changes induced by isoproterenol in mouse acinar parotid cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 20:67-72.
- Allison JD, Brown DS, Novo-Gradac KT 1991. MINTEQA2/PRO-DEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems: Versión 3.0 User's manual. Washington, D.C. US Environmental Protection Agency.
- Alvarez M, Quezada C, Navarro C, Molina A, Bouvet P, Krauskopf M, Veraa MI 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem Biophys Res Commun* 301:152–158.
- Alvarez MR, Cowden RR 1966. Karyometric and cytophotometric study of hepatocyte nuclei of frogs exposed to cold and prolonged starvation. *Z Zellforsch* 75:240-247.
- Anastassova-Kristeva 1977. The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci* 25:103-110.
- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond A.I. 2002. Direct Proteomic Analysis of the Human Nucleolus. *Curr. Biol.* 12:1-11.
- Anderson PD, D'Apollonia S 1978. Aquatic animals. *Principles of Ecotoxicology* (Scope 12). Bulter GC (ed.). Wiley, Toronto, pp 187-221.
- Ankley GT, Erickson RJ, Phipps GL, Mattson VK, Kosian PA, Sheedy BR, Cox JS 1995. Effect of light intensity on the phototoxicity of fluoranthene to a benthic macroinvertebrate. *Environ Sci Technol* 29:2828-2833.
- APHA-AWWA-WEF 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Edition. Clesceri L.S., Eaton D., Greenberg A.E. (Ed). American Public Health Association, Washington DC.
- Applegate VC, Howell JH, Hall AE, Smith MA 1957. Toxicity of 4346 chemicals to larval lampreys and fish. *US Fish Wildl Serv, Spec Sci Rep – Fish* 207. pp 157.
- Aquino AE 1991. Alimentación de *Odontesthes bonariensis* (Cuv. & Val., 1835) (Osteichthyes, Atherinidae) en el embalse El Cadillal (Tucumán, Argentina). *Biología Acuática* 15:176-177.
- Arkhypchuk VV 1995a. Structural and functional changes of genomes in fish phylogeny and ontogeny. Dr. Biol. thesis, Kiev.

- Arkhipchuk VV 1995b. Changes in the nucleolar characteristics in fish embryo cells under the action of low doses of radiation, *Radiats. Biol. Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* 35:512–517
- Arkhipchuk VV 1995c. The use of nucleolar characteristics in biotesting, *Tsitologiya. Genetika* 29:6–12
- Arkhipchuk VV 1999. Nucleolar variations during the ontogenesis of diploid and tetraploid cyprinid species. *J Fish Biol* 54:513-524.
- Arkhipchuk VV, Malinovskaya MV, Garanko NN 2000. Cyto-genetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells, *Environ. Toxicol.* 15:338–344.
- ASTM 1994. Annual Book of ASTM Standards, Section II: Water and Environmental Technology, Volume 11.01 Water (1). AST, Philadelphia, PA.
- ASTM, 1954. Standard Test Methods for Evaluating Acute Toxicity of Water to Fresh-Water Fishes (D1345-45T). Annual Book of Standards-Water. American Society for Testing and Materials. Philadelphia.
- Bacharach AL, Coates ME, Middleton TR 1942. A biological test for vitamin P activity. *Biochem J* 36:407-412.
- Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180:5-22
- Baic D, Ladewski BG, Frye BE 1979. Quantitative ultrastructural studies of hepatocytes from fed and starved frogs. *J Exp Zool* 210:381-406.
- Baigun C, Delfino R 1994. Relación entre factores ambientales y biomasa relativa del pejerrey en lagos y embalses templado-cálidos de la Argentina. *Acta Biol Venez* 15:47-57.
- Baigún C, Delfino R 2001. Consideraciones y criterios para la evaluación y manejo de pesquerías de pejerrey en lagunas pampásicas. En: *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. F Grossman (ed.). Asyanax, Azul, Bs As, p 132-145.
- Baigún y Delfino, 1999. Anexo L2 Pesca. En: *Plan Maestro Integral, Cuenca del Río Salado. Medio Ambiente, Vol 2, Informe Final*. Sir William Halcrow and Partners, Ministerio de Economía de Buenos Aires, Unidad Ejecutora Provincial
- Bailey HC, Liu DHW, Javitz HA 1985. Time/toxicity relationship in short-term static, dynamic, and plug-flow bioassays. In: *Baier RC, Hansen DJ (Eds). Aquatic toxicology and hazard assessment: Eight symposium*. Philadelphia PA: American Soc. for Testing and Materials (ASTM). STP 891. pp 139-212.
- Balajee AS, May A, Bohr VA 1999. DNA repair of pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA, *Nucl Acids Res* 27:2511–2520.
- Banfalvi G, Littlefield N, Hass B, Mikhailova M, Csuka I, Szepessy E, Chou MW 2000. Effect of cadmium on the relationship between replicative and repair DNA synthesis in synchronized CHO cells. *Eur J Biochem* 267:6580-6585
- Barnhart J 1997 Occurrences, uses, and properties of chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 26:S3–S7.
- Bartlett RJ, James BR, 1979. Behavior of chromium in soils: oxidation. *J Environ Qual* 8:31-35.
- Beaublen S, Nriagu J, Blowes D, Lawson G 1994. Chromium speciation and distribution in the great lakes. *Environ Sci Technol* 28:730-736.
- Beckmann BR, Zaugg WS 1988. Copper intoxication in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) induced by natural springwater: effects on gill Na⁺,K⁺-ATPase, hematocrit, and plasma glucose. *Can J Fish Aquat Sci* 45:1430–1435.
- Beheregaray LB, Sunnucks P 2000. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology*, 9:629–644.
- Belding DL 1927. Toxicity experiments with fish in reference to trade waste pollution. *Trans Am Fish Soc*, 57:100-119.
- Belenguer P., Caizergues-Ferrer M., Labbe J.C., Doree M., Amalric F. 1990. Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 10:3607-3618.
- Benoit DA, Leonard EN, Christensen GM, Fiandt JT 1976. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans Am Fish Soc* 105:550-560.

- Berasain GE, Velasco CAM, Colautti D 2001. Experiencias de cultivo intensivo de larvas, juveniles y reproductores de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. En: F Grossman (ed.) Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Asyanax, Azul, Bs As, p 33-39.
- Bergman HL, Dorward-King EJ, 1997. Reassessment of metals criteria for aquatic life protection. SETAC Tech Pub Series. SETAC Press, Pensacola, USA.
- Berrios S, Koifman J, Fernández-Donoso R 1992. Tissue and sex differences in the expression of nucleoli in mouse somatic cells. *Eur J Morphol* 30:297-303.
- Bertrand E, Houser-Scott F, Kendall A, Singer RH, Engelke DR 1998. Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev* 12:2463-2468.
- Beyersmann D, Hechtenberg S 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:247-261.
- Bilos C, Colombo JC, Rodrigues Presa MJ 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Pollut* 99:1-11.
- Blankenship LJ, Manning FCR, Orenstein JM, Patierno SR 1994. Apoptosis is the model of cell death caused by carcinogenic chromium. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:75-83.
- Bliss CI 1934a. The method of probits. *Science* 79:38-39
- Bliss CI 1934b. The method of probits – a correction. *Science* 79:409-410.
- Block C, Freyermuth S, Beyersmann D, Malviya AN 1992. Role of cadmium in activating nuclear protein kinase C and the enzyme binding to nuclear protein. *J Biol Chem* 267:19824-19828.
- Block M, Pärt P 1986. Increased availability of cadmium to perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rich) gills in the presence of the complexing agents diethyl dithiocarbamate, ethyl xanthate and isopropyl xanthate. *Aquat Toxicol* 8:295-302.
- Block M, Pärt P 1992. Uptake of ¹⁰⁹Cd by cultured gill epithelial cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 23:137-151.
- Bolla S, Holmefjord I 1988. Effect of temperature and light on development of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture* 74:355-358.
- Bonetto AA, Castello HP 1985. Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. *Progr. Des. Cient. y Téc. OEA (Washington), Ser. Biol. Monografía N°31: 1-114.*
- Boon K. van Asperen, Valentijn L, Hermus MC, van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voute, PA, Schwab M, Versteeg R 2001. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 20:1383-1393.
- Borrmann U 1983. En *Aquatic toxicology*. Nriagu J.O. ed. John Willey & Sons, New York, pp 47-72.
- Boschi, E., Fuster De Plaza M.L. 1959. Estudio biológico pesquero del pejerrey del Embalse del Río III. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Publicación N° 8. Dpto.de Investigaciones Pesqueras nro. 8. 1-61p.
- Botkin DB, Keller EA 2000. *Environmental science: earths as a living planet*. Thirst Edition. John Wiley and Sons, New York, pp 649.
- Bouche G, Caizergues-Ferrer M, Bugler B, Amalric F 1984. Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res*12:3025-3035.
- Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F 1998. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* 273:19025-19029.
- Bradley RW, DuQuesnay C, Sprague JB 1985. Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: kinetics and mechanisms of enhanced tolerance induction. *J. Fish Biol* 27:367-379.
- Bragt P.C., Van Dura E.A. 1983. Toxicokinetics of hexavalent chromium in the rat after intratracheal administration of chromates of different solubilities. *Ann Occup Hyg* 27:315-322.
- Brown CL, Núñez JM 1998. Disorders of Development. En *Leatherland JF, Woo PTK (eds), Fish diseases and disorders. Volume 2: Non-infectious disorders*. CAB International, New York, p 1-17.
- Brown M.W., Thomas D.G. Shurben D., Solbe J.F, de L.G., Kay, J., Cryer, A. 1986. A comparison of the differential accumulation of cadmium in the tissues of three species of freshwater fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus*, and *Noemacheilus barbatulus*. *Comp. Biochem. Physiol* 84:213-217.

- Bruno DW, Stamps DJ 1987. Saprolegniasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry. Journal of Fish Diseases, 10:513–517.
- Bruno DW, Wood BP 1999. Saprolegna and other Oomycetes. En Wood BP y Bruno DW (eds.) Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CAB International, New York, pp 866.
- Burbidge RG, Carrasco MC, Brown PA 1973. Growth, length-weight relationship, sex ratio and food habits of the Argentine pejerrey, *O. bonariensis* from lake Peñuelas, Vaparaíso, Chile. J. Fish Biol, 6:299-305.
- Cabrera, S.E., 1960. La alimentación natural del pejerrey del Río de la Plata (Atherinidae: *Basilichthys bonariensis* (C. y V.)). Act. Trab. I Congr. Sudam. Zool., 1. (La Plata, 12-24 octubre 1959). Tomo I, Sec. I, Ecología: 27-34.
- Cabrera, S.E., 1962. La alimentación natural del pejerrey del río de la Plata. Dep. Invest. Pesqueras, Dir. Pesca:27p
- Cabrera, S.E.; Baiz M., Christiansen H.E., Candia C.R., 1973. Algunos aspectos biológicos de las especies de ictiofauna de la zona de Punta Lara (Río de la Plata). 1ra. parte, Alimentación natural del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). Serv. Hidrogr. Naval H. 1028:1-29.
- Caizergues-Ferrer M, Belenguer P, Lapeyre B, Amalric F, Wallace MO, Olson MO 1987. Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. Biochemistry 26:7876-7883.
- Calamari D, Gaggino GF, Pacchetti G 1982. Toxicokinetics of low levels of Cd, Cr, Ni and their mixture in long-term treatment on *Salmo gairdneri* Rich. Chemosphere 11:59–70.
- Calvo J, Dadone LA 1972. Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) I. Escala y tabla de madurez. Rev. Mus. La Plata (N.S.), Zool., 9:153-163.
- Calvo, J. Morriconi E., 1972. Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). III. Estudio de la fecundidad. Época y número de desoves. An Soc Cient Arg 93:75-84.
- Calvo, J.; Morriconi E. Lagreca M., 1967. Estudios ictiológicos: desarrollo gonadal. En: Trabajos Técnicos, 2da. etapa (1966). Convenio Estudio Riqueza Ictícola, La Plata (mimeografiado).
- Calvo, J.; Morriconi E. Zavala Suarez J.E., 1977. Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) II. Proporción de sexos y desplazamientos reproductivos. Physis B, 36:135-139.
- Canevari P, Blanco DE, Bucher E, Casero G, Davidson I 1998. Los humedales de la Argentina. Clasificación, situación actual, conservación y legislación. Wetlands International, SRNYDS, publ. N° 46:i-xiii, 1-208, Buenos Aires.
- Cantoni O, Costa M 1984. Analysis of the induction of alkali sensitive sites in the DNA by chromate and other agents that induce single strand breaks. Carcinogenesis 5:1207-1209.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I 2000. To be or not to be in the nucleolus. Nat. Cell Biol. 2, 107–112
- Carotenuto R, Maturi G, Infante V, Capriglione T, Petrucci TC, Campanella C 1997. A novel protein cross-reacting with antibodies against spectrin is localised in the nucleoli of amphibian oocytes. J Cell Sci 110:2683-2690.
- Carpenter KE 1930. Further reaches on the action of metallic salts on fishes. J Exp Zool, 56:407-422.
- Carson R 1962. Silent Spring. Boston: Houghton Mifflin.
- Casalino E, Sblano C, Landriscina C 1997. Enzyme Activity Alteration by Cadmium Administration to Rats: The Possibility of Iron Involvement in Lipid Peroxidation Arch Biochem Biophys 346:171–179.
- Castaño A, Carbonell G, Carballo M, Fernandez C, Boleas S, Tarazona JV 1998. Sublethal Effects of Repeated Intraperitoneal Cadmium Injections on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol Environ Saf 41:29-35.
- Catoggio JA 1990. Contaminación del Agua. Causas de la Contaminación de Aguas Superficiales y Subterráneas. Precipitaciones Ácidas. Eutroficación; Polución Costera. En Latinamerica Medio Ambiente y Desarrollo. Eds. Fundación J. E. Roulet, Buenos Aires. Pag 137-155
- Çavas T, Ergene-Gözükara S 2003a. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. Mutation Research 538:81–91

- Çavas T, Ergene-Gözükara S 2003b. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research* 534:93-99.
- Chang JH, Olson MO 1990. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 265:18227-18233.
- Chen YC, Smith JB 1992. A putative lectin-binding receptor mediates cadmium-evoked calcium release. *Toxicol Appl Pharmacol* 117:249-256.
- Chew RD, Hamilton MA 1985. Toxicity curve estimation: fitting a compartment model to median survival times. *Trans Am Fish Soc* 114:403-412.
- Chuecas DL, Riley JP 1966. The spectrophotometric determination of chromium in sea water. *Analyt Chim Acta* 35:240-246.
- CIC 1982. Los ambientes lagunares de la Pcia de Buenos Aires. Documento relativo a su conocimiento y manejo. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, 55 pp
- Claus CF, Benijts P, Sorgeloos P 1979. Comparative study of different geographical strains of the brine shrimp *Artemia salina*. En Jaspers E (ed) *Fundamental and applied research on the brine shrimp, Artemia salina (L.) in Belgium*. EMS Special Publications N°2. Institute of Marine Scientific Research, Bredene (Belgium), pp 100.
- Cohen M, Lotta D, Coogan T, Costa M 1991. Mechanisms of metal carcinogenesis: The reaction of metals with nucleic acids. In Foulkes EC (Ed), *Biological effects of heavy metals*. CRC, Boca Raton, pp 19-75.
- Colautti DC, Remes Lenicov M 2001. Primeros resultados sobre cría de pejerreyes en jaulas: crecimiento, supervivencia, producción y alimentación. En: F Grossman (ed.) *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Asyanax, Azul, Bs As, p 54-64.
- Coll Morales J 1986. *Acuicultura Marina Animal*. 2^{da} Edición. Ediciones Mundiprensa, Madrid. pp 670.
- Connett P, Wetterhahn KE 1983. Metabolism of the carcinogen chromate by cellular constituents. *Struct Bond* 54:93-124.
- Conzonno VH, Claverie EF 1990. Chemical characteristics of the water of Chascomús pond (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Limnological implications*. *Rev Brasil Biol* 50:15-21.
- Costa M 1991. DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 92:45-52.
- Couvier, G.; Valenciennes, A. 1835. *Historie Naturelle des Poissons*. Paris, 1-22:1-650.
- Couvier, G.; Valenciennes, A. 1835. *Historie Naturelle des Poissons*. Paris, 1-22:1-650.
- Cranston RE, Murray JW 1978. Determination of chromium species in natural waters. *Analyt Chim Acta* 99:275-282.
- Cranston RE, Murray JW 1980. Chromium species in the Columbia River and estuary. *Limnol Oceanogr* 25:1104-1112.
- Da Silva Cortinhas MC, Cestari MM, Swarça AC, Fenocchio AS. First Chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the South coast of Brazil. Conventional, C- NOR and CMA3 bandings and FISH studies. *Cariología*.
- Dadone, L. Calvo J., 1966. Estudios ictiológicos (desarrollo gonadal del pejerrey). En: *Convenio Estudio Riqueza Ictícola, La Plata* (mimeog.).
- Davies PH, Gorman WC, Carlson CA, Brinkman SR 1993. Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chem Sp Bioavail* 5:67-77.
- de Conto Cinier C, Petit-Ramel M., Faure R., Garin D. 1997. Cadmium Bioaccumulation in Carp (*Cyprinus carpio*) Tissues During Long-Term High Exposure: Analysis by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38:137-143.
- De Flora S 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:533-541.
- De Flora S, Wetterhahn KE 1989. Mechanism of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep* 7:169:244.

- De Robertis EDP, y De Robertis EMF 1991. *Biología Celular y Molecular*. Ateneo, Buenos Aires, pp 327-328.
- De Smet H, Blust R 2001. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 48:255-262.
- Deb SC, Fukushima T 1999. Metals in aquatic ecosystems: mechanism of uptake, accumulation and release – Ecotoxicological perspectives. *Int J Environ Studies*, 56:385-417.
- Debetto P, Luciani S 1988. Toxic effect of chromium on cellular metabolism. *Sci. Total Environ* 71:365–377.
- Derenzini M, Pession A, Trerè D 1990. The quantity of nucleolar silverstained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 63:137-40.
- Derenzini M, Sirri V, Trere D 1994. Nucleolar organizer regions in tumor cells. *Cancer Journal* 7:71-77.
- Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL 1998. Nucleolar function and size in cancer cells. *Amer J Phatol* 152:1291-1297.
- Destefanis S., Freyre L., 1972. Relaciones tróficas de los peces de la laguna de Chascomús con un intento de referenciación ecológica y tratamiento bioestadístico del espectro trófico. *Acta Zool. Lilloana* 29: 17-33.
- Destefanis S., Freyre L., Iriart R. 1967. Régimen alimentario de peces de la laguna de Chascomús. En: *Trabajos Técnicos, 3ra. etapa (1967), 4. Convenio Estudio Riqueza Ictícola, La Plata (mimeog.)*.
- Destefanis S., Freyre L., Iriart R., 1969. Régimen alimentario de peces de la laguna de Chascomús. En: *Trabajos Técnicos, 4ta. etapa (1968-69). Convenio Estudio Riqueza Ictícola, La Plata (mimeog.)*.
- Dorn PB, Salanitro JP, Evans SH, Kravetz L 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ Toxicol Chem* 12:1751-1762.
- Dyer BS 1993. A phylogenetic study of Atheriniform fishes with a systematic revision of South American silversides (Atherinomorpha, Atherinopsinae, sorgentinini) Unpublished Ph. D. Thesis, University of Michigan, Ann Arbor.
- Dyer BS, Chernoff B 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society* 117:1-69.
- Edel J, Sabbioni E 1985. Pathways of Cr(III) and Cr(VI) in the rat after intratracheal administration. *Hum. Toxicol* 4:409–416.
- Ellersieck MR, La Point TW 1995. *Statistical Analysis. Chap 9, Fundamentals of Aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.* edited by Rand GM Taylor & Francis, Bristol. pp 307-344.
- Ellis MM 1937. Detection and measurement of stream pollution. *Bull US Bur Fish*, 48:365-437.
- Erard M, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A, Amalric F 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* 175:525-530.
- Erllich KF, Blaxter JHS, Pemberton R 1976. Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar Biol* 35:105-118.
- Escalante AH 1985. Alimentación del pejerrey *Basilichthys bonariensis* bonariensis (Osteichthyes, Atherinidae) del embalse Río Tercero, prov. de Córdoba. *Neotrópica* 31: 22-26.
- Evans DH 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 71:47-78.
- Fabrizi E, Caselli F, Piano A, Sartor G, Capuzzo A Cd²⁺ and Hg²⁺ affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. *Aquatic Toxicol* 62:55-65.
- Fatica A, Tollervy D 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14:313–318.
- Ferguson EA, Hogstrand C 1998. Acute toxicity to sea-water-acclimated rainbow trout: influence of salinity on toxicity and silver speciation. *Environ Toxicol Chem* 17:589-593.
- Finney 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London
- Fiskesjö G 1983. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. *Physiol Plant* 59:508-511.

- Fiskesjö G 1993. *Allium* Test I: A 2-3 days plant test for toxicity assessment of various chemicals by measuring the root growth of a series of onions (*Allium cepa* L.) Environ Toxicol Water Qual 8:461-470.
- Flik G, van der Velden JA, Dechering KJ, Verbost PM, Schoenmakers TJM, Klar ZI, Wendelaar Bonga SE 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: a review. J Exp Zool 265:356-365.
- Flik G, Verbost PM 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. J Exp Biol 184, 17-29.
- Freyre LR, Maroñas ME, Sendra ED 1994. Demografía del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) de la laguna de Lobos (Provincia de Buenos Aires). Tankay 1: 231-232.
- Freyre LR 1967. Consecuencias de la mortandad de peces por las temperaturas extremas de junio de 1967 en Laguna Chascomús. Agro 9 (15):35-46.
- Freyre LR, 1973. Pollution of the "Carpincho" Pond (Pampasic region, Argentina) and its effects on plankton and fish communities. Environ. Pollut., 1:37-40.
- Freyre LR, Maroñas ME, Sendra ED 1997. Demografía del Pejerrey *Odontesthes bonariensis* de la Laguna de Lobos, Provincia de Buenos Aires. Natura Neotropicalis 28:47-59.
- Freyre LR, Padin O, Denegri MA 1981. Metabolismo energético de peces dulceacuícolas. II. El pejerrey, *Basilichthys bonariensis* Cuvier y Valenciennes (Pisces Atherinidae). Limnobiología 2:227-232.
- Freyre LR, Protogino LC, Iwaszkiw JM 1983. Demografía del pejerrey *Basilichthys bonariensis* (Pisces, Atherinidae) en el Embalse Río Tercero, Córdoba. Descripción de los artes de pesca. Biología Acuática 4:2-39.
- Freyre LR, Sendra ED 1993. Relevamiento pesquero de la laguna Blanca Grande, Provincia de Buenos Aires. Aquatec. 1: 1-9.
- Fritz LK, Suquet C, Smerdon MJ 1996. Strand breaks are repaired efficiently in human ribosomal genes, J. Biol. Chem. 271:12972-12976.
- Gabellone NA, Solari LC, Claps MC 2001. Planktonic and physico-chemical dynamics of a markedly fluctuating backwater pond associated with a lowland river (Salado river, Buenos Aires, Argentina). Lakes & Reservoirs: research and management 6:133-142.
- Gaddum JH 1933. Reports on biological standards III. Methods of biological assay depending on a quantal response. Spec Rep Ser Med Coun. London, pp 183.
- García ME, Castañé PM, Demichelis SO, Ferrari L, Topalián ML 1996. Indicadores de polución en el agua del río reconquista: monitoreo de otoño. En: Zalazar RH (ed.) Cuencas Hídricas: contaminación, evaluación de riesgo y saneamiento. Instituto Provincial del Medio Ambiente, Gobernación de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires. pp 121-123.
- García ML 1987. Contribución al conocimiento sistemático y biológico de los Atherinidae del Mar Argentino. Tesis doctoral nº 487. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- García Romero N 2001. Alteraciones patológicas del pejerrey (*Odontesthes bonariensis* C.) en ambientes naturales y bajo condiciones de cultivo. Revisión. En: Grosman F (ed) Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Asyanax, Azul, Bs As, p 80-90.
- García Romero, N. Granulomatosis Crónica Sistémica (GCS) en pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. J. Fish Pathology (en prensa).
- García Romeu F 1964a. Estudios histológicos e histoquímicos sobre el testículo del pejerrey, *Basilichthys bonariensis* (Cuv. Val.). Agro 6:5-39.
- García Romeu F 1964b. Sobre un caso de hermafroditismo ocasional en el pejerrey, *Basilichthys bonariensis* (C. V.). Agro 6:40-43.
- García Romeu F, Cordero Funes JR 1964. Variación estacional de la altura del epitelio de los conductos eferentes de testículos de pejerrey, *Basilichthys bonariensis* (Cuv. Val.). Agro 6:44-48.
- García-Moreno LM, Aller MA, Conejo NM, Gómez MA, Martín FR, Arias J, Arias JL 2002. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. Hepatol Res 24:275-281.
- Gayatri R, Rajaram A, Rajaram R, Govindaraju K, Rao JR, Nair BU, Ramasami T 1997. Chromium induced structural changes in biomolecules. Proc Indian Acad Sci 109:307-317.

- Geneser F 1988. Histología. Panamericana, Buenos Aires, pp 107-109.
- Gey van Pittius M, van Vuren JHJ, Du Preez HH 1992. Effects of chromium during pH change on blood coagulation in *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp Biochem Physiol* 101C:371-374.
- Ghisolfi L, Joseph G, Amalric F, Erard M 1992. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem* 267:2955-2959.
- Giles MA 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. *Can J Fish Aquat Sci* 45:1045-1053.
- Gill TS, Pant JC 1987. Haematological and pathological effects of chromium toxicosis in the freshwater fish, *Barbus conchonus* Ham. *Water Air Soil Pollut* 35:241-250.
- Ginisty H, Amalric F, Bouvet P 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing, *EMBO J* 17:1476-1486.
- Godoy MP 1946. Contribução a la biologia do Peixe-Rei *Odontesthes bonariensis*. *Rev Bras Biol*, 6:373-384.
- Goering PL, Fisher BR, Kish CL 1993. Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 122:139-148.
- Gómez S.E., 1993. Susceptibilidad a Diversos Factores Ecológicos Extremos, en Peces de la Pampasia Bonaerense, en Condiciones de Laboratorio. Tesis Doctorales Resúmenes 1986-1990. Dto de Postgrado (ed) Fac. Cs. Nat. Y Museo U.N.L.P., Tesis 502: 165-174.
- Gómez SE y Ferriz RA, 2001. Algunos Aspectos de la ecofisiología del pejerrey. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Grossman F (ed). Asyanax, Azul, Bs As, p 15-22.
- Gomez, S.E, 1996. Resistenza alla temperatura e alla salinità in pesci della provincia di Buenos Aires (Argentina), con implicazioni zoogeografiche. En: Atti 4 Convegno Nazionale Assoc. Ital. Ittiol. Acque dolci, Trento, Italy:171-192.
- Gomez, S.E. Toresani N.I., 1993. Nivel mínimo de pH en *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), (Pisces, Atheriniformes). En: Res.Comunicaciones I Jorn. Nac. y VI Regionales de Medio Ambiente, La Plata, noviembre de 1993:53p.
- Gonzalez Regalado T, Mastrarrigo YV 1954. Piscicultura. El Pejerrey. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Rep. Arg.) Dirección de Piscicultura y Pesca Interior. Publ. Misc. 268:1-55.
- Goodman, L.R., D.J. Hansen, D.P. Middaugh, G.M. Cripe, and J.C. Moore. 1985. Method for early life-stage toxicity tests using three atherinid fishes and results with chlorpyrifos. In: Cardwell, R.D., R. Purdy, and R.C. Bahner, eds., *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, ASTM STP 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. pp. 145-154.
- Gotta M, Strahl-Bolsinger S, Renauld H, Laroche T, Kennedy BK, Grunstein M, Gesser SM 1997. Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *EMBO J* 16 3243-3255.
- Greasley PJ, Bonnard C, Amati B 2000. Muc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 28:446-453.
- Grosman F 2001. Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F Grosman (ed.). Asyanax, Azul, Bs As, p 15-22.
- Grosman F, González Castelain J 1996. Experiencias de alimentación y crecimiento con alevinos de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) dirigidas a optimizar la siembra. *Rev Ictiol* 4:5-10.
- Grosman, F., 1995. El pejerrey. Ecología, cultivo, pesca y explotación. Ed. Astyanax. Azul, Argentina. 132p.
- Grummt I 1999. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1999;62:109-54. Review *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62:109-154.
- Grundman E 1967. El núcleo. Cap II, Citología General: Introducción a la morfología funcional de la célula. Labor, Barcelona, 47-65.
- Gulli MP, Faubladiet M, Sicard H, CaizerguesFerrer M 1997. Mitosis-specific phosphorylation of gar2, a fission yeast nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma* 105:532-541.

- Gunaratnam M, Grant MH 2001. The role of glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in isolated rat hepatocytes. *Chemico Biological Interactions* 134:191-202.
- Hague F, Matifat F, Louvet L, Brûle G, Collin T 2000. The carcinogen Cd²⁺ activates InsP3-mediated Ca²⁺ release through a specific metal ions receptor in *Xenopus* oocyte. *Cell Signal* 12:419-424.
- Hancock R 2004. A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J. Struct. Biol* 146:281-90.
- Handa BK 1988. Occurrence and distribution of chromium in natural waters of India. In: Nriagu JO, Nieboer E (Eds.), *Chromium in Natural and Human Environments*. Wiley Interscience, New York, pp. 189-215.
- Handy RD 1992a. The assessment of episodic metal pollution I. Uses and limitations of tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after short waterborne exposure to cadmium of copper. *Archives of Environmental Toxicology* 22:74-81.
- Handy RD 1992b. The assessment of episodic metal pollution II. The effects of cadmium and copper enriched diet on tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Environ Contam Toxicol* 22:82-87.
- Handy RD, Depledge MH 1999. Physiological responses: their measurements and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 8:329-349
- Handy RD, Eddy FB 1990 The interaction between the surface of rain bow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Functional Ecology* 4:385-392.
- Hannan KM, Hannan RD, Rothblum LI 1998. Transcription by RNA polymerase I *Front Biosci* 3:376-398.
- Hansen JA, Welsh PG, Lipton J, Suedkamp MJ 2002. The effects of long-term cadmium exposure on the growth and survival of juvenile bull trout (*Salvelinus confluentus*). *Aquat Toxicol* 58:165-174.
- Harris DC, 1977. Different metal binding properties of the two sites of transferrin. *Biochemistry* 16:560-564.
- Hartley SE 1987. The chromosomes of Salmonid Fishes. *Biol Rev* 62:197-214.
- Hartman WL 1988. Historical changes in the major fish resources of the Great Lakes. In: *Toxic Contaminants and Ecosystem Health: Great Lakes Focus*, Evans MS (ed). John Willey and Sons, New York, pp 103-131.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T. Bürkle A 2002. Interference by toxic metals with DNA repair processes and cell cycle control: Molecular Mechanism. *Environ Health Perspect* 110:797-799.
- Hartwin A 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metals ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling* 3:625-634.
- Haux C, Larsson Å 1984. Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquat Toxicol* 5:129-142.
- Hemmer MJ, Middaugh DP, Comparetta 1992. Comparative acute sensitivity of larval topmelt, *Atherinops affinis*, and the inland silverside, *Menidia beryllina*, to eleven chemicals. *Environ Toxicol Chem* 11:401-408.
- Hernandez-Verdun D 1983. The nucleolar organizer regions. *Biol Cell* 49:191-202.
- Hibiya T 1982. *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*. Kodansha Ltd. Tokyo, pp 147.
- Hogstrand C, Reid SD, Wood CM, 1995. Ca²⁺ versus Zn²⁺ transport in the gills of freshwater rainbow trout and the cost of adaptation to waterborne Zn²⁺. *J Exp Biol* 198:337-348.
- Hogstrand C, Wood CM, 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. In: Taylor EW (Ed), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 61-84.
- Hollis EH, Lennon RE 1954. The toxicity of 1085 chemicals to fish. *Fish Toxicity Project Report N°2 US Fish Wildl Serv, Kearneysville, W. Va.* pp 66.
- Hollis L, Hogstrand C, Wood CM 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallithionein induction, and tissue zinc, copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:468-474.

- Hollis L, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM 1999. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 46:101-119.
- Hollis L, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM 2000a. Effects of long term sublethal Cd exposure in rainbow trout during soft water exposure: implications for biotic ligand modelling. *Aquat Toxicol* 51:93-105.
- Hollis L, McGeer JC, McDonald DG, Wood CM 2000b. Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposed to juvenile rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 19:2725-2734.
- Hollis L, Muench L, Playle RC 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *J Fish Biol* 50:703-720.
- Hopkins LL Jr 1965. Distribution in the rat of physiological amounts of injected Cr51(III) with time. *Am J Physiol* 209:731-735.
- Howell WM 1982. in *The Cell Nucleus*, Vol. XI. Busch H. y Rothlum L. Eds. Academic Press, New York, pp 89-142.
- Howell WM, Black DA 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-5.
- Hughes GM 1984. General anatomy of the gills. In Hoar WS, Randall DJ (Eds), *Fish physiology*, Vol XA. Academic Press, New York, pp 1-72.
- Hunn JB 1989. History of Acute Toxicity Test with Fish 1863-1987. *US Fish Serv Invest Fish Control* 98, 10pp
- Hutton M 1983. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 7:9-24.
- Iriart NR, Ringuet RA, 1966. Relaciones tróficas. Alimentación del pejerrey de la laguna Chascomús. En: *Trabajos Técnicos*, 1ra. etapa (1965). Convenio Estudio Riqueza Ictícola, La Plata (mimeog.).
- Iwaszkiw, J.M. Freyre L.R., 1980. Fecundidad del pejerrey *Basilichthys bonariensis bonariensis* (Pisces Atherinidae) del embalse río Tercero, Córdoba. *Limnobiós* 2(1):36-49.
- Jackson CS, Sneddon J, Heagler MG, Lindow AG 2003. Use of flame atomic absorption spectrometry and the effect of water chemistry for the study of the bioaccumulation of cadmium in *Menidia beryllina* (cope), the tidewater silverside. *Microchemical Journal*, en prensa.
- Jacob ST, Ghosh AK 1999. Control of RNA polymerase I directed transcription: Recent trends. *J Cell Biochem* 75:41-50.
- Jelinsky SA, Samson LD 1999. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1486-1491.
- Jiang PS, Chang JH, Yung BY 2000. *Cancer Lett* 153:151-160.
- Johnson CA, Xyla AG 1991. The oxidation of chromium(III) to chromium(VI) on the surface of manganite (?-MnOOH). *Geochim Cosmochim Acta* 55:2861-2866.
- Jones JR 1938. The relative toxicity of salts of lead, zinc, and copper on the stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) and the effect of calcium on the toxicity of lead and zinc salts. *J Exp Biol* 15:394-407.
- Jop KM, Parkerton TF, Rodgers JH, Dickson KL 1987. Comparative toxicity and speciation of two hexavalent chromium salts in acute toxicity tests. *Environment Toxicol Chem* 6:697-703.
- Jorgensen P et al. 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400
- Kaczynski SE, Kieber RJ 1993. Aqueous trivalent chromium photoproduction in natural waters. *Environ Sci Technol* 27:1572-1576.
- Kaczynski SE, Kieber RJ 1994. Hydrophobic C18 bound organic complexes of chromium and their potential impact on the geochemistry of chromium in natural waters. *Environ Sci Technol* 28:799-804.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304-6311.
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 261:5952-5958.

- Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Guarente L 1997. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 89:381-391.
- Kerger BD, Finley BL, Corbett GE, Dodge DG, Paustenbach DJ 1997. Ingestion of chromium (VI) in drink water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. *J Toxicol Environ Health* 50:67-95.
- Kerger BD, Paustenbach DJ, Corbett GE, Finley BL 1996. Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drink water. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:145-158.
- Khangarot BS, Rathore RS, Tripathi DM 1999. Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in freshwater Catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). *Ecotox Environ Saf* 43:11-20.
- Kieber RJ, Helz GR 1992. Indirect photoreduction of aqueous chromium(VI). *Environ Sci Technol* 26:307-312.
- Klaassen CD 1996. Casarett and Doull's, Toxicology, The basic science of poisons. Fifth Edition. McGraw-Hill, New York pp 1111.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267-294.
- Koizumi S, Suzuki K, Otsuka F 1992. A nuclear factor that recognizes the metal-responsive elements of human metallothionein-II_A gene. *J Biol Chem* 267:18659-18664.
- Korallus U 1986. Biological activity of chromium (VI) – against chromium (III) compounds: New aspects of biological monitoring. In Serrone DM (Ed), Chromium symposium, 1986: an update. Pittsburg: Industrial Health Foundation, Inc., pp 210-230.
- Kortenkamp A, Casadevall M, Faux SP, Jenner A, Shayer ROJ, Woodbridge N, O'Brien P 1996. A Role for Molecular Oxygen in the Formation of DNA Damage during the Reduction of the Carcinogen Chromium(VI) by Glutathione. *Arch Biochem Biophys* 329:199-207.
- Kotas J y Stasicka Z, 2000 Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Poll* 107:263-283
- Kramer JR, Allen HE, Davison W, Godfredsen LK, Meyer JS, Perdue EM, Tipping E, van de Meent D, Westall JC 1997. Chemical speciation and metal toxicity in surface freshwaters. In: Bergman HL; Dorward-King EJ (Eds), Reassessment of metals criteria for aquatic life protection: priorities for research and implementation, Pensacola, FL: SETAC Pellston Workshop on Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection, SETAC Pr. pp 57-70.
- Kreimer ED, Palacios DE, Ronco AE 1996. A proposa for dredging contaminated sediments at the Dock Sud Port, Argentina. Proceedings of the International Symposium on Coastal Ocean Space Utilization (COSU'96). 435-444.
- Krishna L, Gupta VK, Katoch RC, Singh D 1990. Saprolegniasis in Indian major carps – an investigation. *Indian Veterinary Journal* 67:554-555.
- Kumada H, Kimura S, Yokote M 1980. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 46:97-103.
- Langård S, Gundersen N, Tsalev DL, Gylseth B 1978. Whole blood chromium level and chromium excretion in the rat after zinc chromate inhalation. *Acta Pharmacol. Toxicol* 42:142-149.
- Lange TS, Gerbi SA 2000. Transient nucleolar localization of U6 small nuclear RNA in *Xenopus Laevis* oocytes. *Mol Biol Cell* 11:2419-2428.
- Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence, *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1472-1476.
- Laurén DJ, McDonald DG 1987a. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: physiology. *Can J Fish Aquat Sci* 44:99-104.
- Laurén DJ, McDonald DG 1987b. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry. *Can J Fish Aquat Sci* 44:105-111.

- Leary DJ, Huang S 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. FEBS Letters 509:145-150.
- Legierse KCHM, Verhaar HJM, Vaes WHJ, de Bruijn JHM, Hermens JLM 1999. Analysis of the time-dependent acute aquatic toxicity of organophosphorous pesticides: the critical target occupation model. Environ Sci Technol 33:917-925.
- Lemaire-Gony S, Mayer-Gostan N, 1994. In vitro dose-response study of the effect of cadmium on eel (*Anguilla anguilla*) gill Na^+/K^+ -ATPase activities. Ecotoxicol Environ Saf 28:43-52.
- Leuchtenberger C, Schrader F 1951. Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and desoxyribonucleic acid (DNA) in various rat cells. Biol Bull 101:95-98.
- Lewis JD, Tollervey D 2000. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. Science 288:1385-1389.
- Li D, Dobrowolska G, Krebs EG 1996. The Physical Association of Casein Kinase 2 with Nucleolin. J Biol Chem 271:15662-15668.
- Lin CJ, Wu KH, Yew FH, Lee TC 1995. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibro blasts. Toxicol Appl Pharmacol 133:20-26.
- Lionetto MG, Giordano ME, Vilella S, Schettino T 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. Aquat Toxicol 48:561-571.
- Liu QR, Chan PK 1993. Characterization of seven processed pseudogenes of nucleophosmin/B23 in the human genome. DNA Cell Biol 12:149-156.
- Liu S, Dixon K 1996. Induction of mutagenic DNA damage by Chromium (VI) and glutathione. Environ Mol Mutagen 20:71-79.
- López H, Baigún C, Iwaszkiw J, Delfino, R, Padin O 2001. La Cuenca del Salado: Uso y posibilidades de sus recursos pesqueros. Ed. Universidad de La Plata, La Plata, Bs. As. 60 pp.
- López HL, García ML 2001. Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Grosman F (Ed). Asyanax, Azul, Bs As, p 15-22.
- Lopez HL, Garcia ML, Togo C 1991. Bibliografía de los pejerreyes argentinos de agua dulce. En: Situación ambiental de la Provincia de Buenos Aires. A. Recursos y rasgos naturales en la evaluación ambiental. CIC I (6): 1-72.
- Losordo TM, Masser MP, Rakocy J 1998. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: An Overview of Critical Considerations. SRAC Publication No. 451. pp 6.
- Losordo TM, Masser MP, Rakocy J 1999. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems A Review of Component Options. SRAC Publication No. 453. pp 12
- Luchini L, Quiros R, Avedaño T 1984. Cultivo del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) en estanques. Mem Asoc Latinoamer Acuicult, 5:581-587.
- Mac Donagh EJ 1934. Nuevos conceptos sobre la distribución geográfica de los peces argentinos, basados en expediciones del Museo de la Plata. Rev. Museo de La Plata 34:21-170.
- Macdonald A, Silk L, Schwartz M, Playle RC 2002. A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol 133:227-242.
- MacKenzie RD, Anwar RA, Byerrum RU, Hoppert CA 1959. Absorption and distribution of Cr^{51} in the albino rat. Arch Biochem Biophys 79:200-205.
- MacKenzie RD, Byerrum RU, Decker CF, Hoppert CA, Langham RF 1958. Chronic toxicity studies. II. Hexavalent and trivalent chromium administered in drinking water to rats. AMA Arch Ind Health 18:232-234.
- Mallatt J 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can J Fish Aquat Sci 42:630-648.
- Mancini JL 1983. A method for calculating effects on aquatic organism of time-varying concentration. Water Res 17:1355-1361.
- Markovich D y James KM 1999. Heavy Metals Mercury, Cadmium, and Chromium Inhibit the Activity of the Mammalian Liver and Kidney Sulfate Transporter sat-1. Toxicol Appl Pharmacol 154:181-187.

- Marrero Galindez A 1950. Flechas de Plata. Atherínidos argentinos. Pejerreyes y Laterinos. Ed. Breitman, Bs. As.157p.
- Masscheleyn PH, Pardue JH, DeLaune RD, Patric WH Jr 1992. Chromium redox chemistry in Lower Mississippi Valley bottomland hardwood wetland. *Environ Sci Technol* 26:1217-1226.
- Masser MP, Rakocy J, Losordo TM 1999. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems Management of Recirculating Systems. SRAC Publication No. 452. pp 12.
- Matsuoka M, Call KM 1995. Cadmium-induced expression of immediate early genes in LLC-PK1 cells. *Kidney Int.* 48:383-389.
- McCarthy, JF, Shugart, LR 1990. Biological markers of environmental contamination. In McCarthy JF, Shugart LR (Eds), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers, pp 3-14.
- McCarty LS, Mackay D 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and mode of action. *Environ Sci Technol* 27:1719-1728.
- McDonald D.G., Wood C.M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. En: Rankin JC, Jensen FB (Eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London, pp. 297-321.
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM 2000a. Aquatic Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat Toxicol* 50:231-243.
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM 2000b. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat Toxicol* 50:245-256.
- Meinelt T, Playle RC, Pietrock M, Burnison BK, Wienke A, CEW Steinberg CEW 2001. Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances. *Aquat Toxicol* 54:205-215.
- Mélèse T, Zhixiong X 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7:319-324.
- Menni RC, Gómez SE, López Armegol F 1996. Subtle Relationships: Freshwater Fishes and the Chemistry of water in Southern South America. *Hydrobiología* 328:173-197.
- Menone ML de Moreno JEA, Moreno VJ, Lanfranchi AL, Metcalfe TL, Metcalfe CD 2000. PCBs, and Organochlorines in tissues of Silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a Coastal Lagoon in Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 202-208.
- Meplan C, Mann K, Hainaut P 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in culture cells. *J Biol Chem* 274:31663-31670.
- Mercado L 2000. Evaluación de la calidad de aguas de seis sistemas lóticos pampásicos mediante el estudio de variables físicas y químicas. *Rev Mus Argentino Cienc Nat* 2:27-35.
- Mertz W, Roginski EE, Reba RC 1965. Biological activity and fate of trace quantities of intravenous chromium (III) in the rat. *Am J Physiol* 209:489-494.
- Meyer JS 1999. A mechanistic explanation for the Ln(LC50) vs. Ln(hardness) adjustment equation for metals. *Environ Sci Technol* 33:908-912.
- Meyer JS, Santore RC, Bobbitt JP, Debrey LD, Boese CJ, Paquin PR, Allen HE, Bergman HL, Ditoro DM 1999. Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not. *Environ Sci Technol* 33:913-916.
- Middaugh DP, Hemmer MJ, Lamadrid-Rose Y 1986. Laboratory spawning cues in *Menidia beryllina* and *M. pennsylvanica* (Pisces: Atherinidae) with notes on survival and growth of larvae at different salinities. *Environ. Biol. Fish.* 15:107-117.
- Miranda LA, Strobl-Mazzulla PH, Somoza GM 2002. Ontogenetic development and neuroanatomical localization of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in the brain and pituitary gland of pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* *Int. J. Devl Neuroscience* 20:503-510
- Miranda LA, Strobl-Mazzulla PH, Strussmann CA, Parhar I, Somoza MG 2003. Gonadotropin-releasing hormone neuronal development during the sensitive period of temperature sex determination in the pejerrey fish, *Odontesthes bonariensis*. *General-and-Comparative-Endocrinology.* 132:444-453

- Miranda LA, Strüssmann CA, Somoza GM 2001. Immunocytochemical Identification of GtH1 and GtH2 Cells during the Temperature-Sensitive Period for Sex Determination in Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *General and Comparative Endocrinology* 124:45–52.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402:551–555.
- Monserrat JM, Bianchini A 2000. Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9:39–47
- Mosgoeller W, Jordan EG, Hernandez-Verdun D 1996. News and views on the nucleolus in 1996. *Biol Cell* 88:1-4.
- Nakayama E, Kuwamoto T, Tsurubo S, Fujinaga T 1981a. Chemical speciation of chromium in sea water. Part 2. Effects of manganese oxides and reducible organic materials on the redox processes of chromium. *Analyt Chim Acta* 130:401-404.
- Nakayama E, Kuwamoto T, Tsurubo S, Tokoro H, Fujinaga T 1981b. Effect of naturally occurring organic materials on the complex formation of chromium(III). *Analyt Chim Acta* 130:289-294.
- Nanya S, Bicudo HE 1995. Variation of nucleolar area in fat tissue of *Drosophila mulleri* during development. *Cytobios* 81:73-86.
- National Geographic Society, 1998. Millennium Supplement: Population. National Geographic Society, Washington, DC.
- National Geographic Society, 2002. State of the planet map supplement: A world transformed. National Geographic Society, Washington, DC.
- Neely WB 1984. An analysis of aquatic toxicity data: water solubility and acute LC50 fish data. *Chemosphere* 7:813-819.
- Newman MC 1995. Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Newman MC, Unger MA 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Nieboer E, Richardson DHS 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of ions. *Environ Pollut* 1B:2-26.
- Nomiyama K, Nomiyama H 1986. Critical concentration of unbound cadmium in the rabbit renal cortex. *Experientia* 42:149–150.
- Norey CG, Brown MW, Cryer A, Kay J 1990. A comparison of the accumulation, tissue distribution and secretion of cadmium in different freshwater fish. *Comp Biochem Physiol* 97:215–220.
- Novelli ELB, Vieira EP, Rodrigues NL, Ribas BO 1998. Risk Assessment of Cadmium Toxicity on Hepatic and Renal Tissues of Rats. *Environ Res* 79:102-105.
- Nriagu JO 1988. Production and uses of chromium. In: Nriagu JO, Nieboer E (Eds.), *Chromium in Natural and Human Environments*. Wiley Interscience, New York, pp. 81-104.
- O'Brien P, Wang G, Wyatt PB 1992. Studies of the kinetics of the reduction of chromate by glutathione and related thiols. *Polyhedron* 11:3211-3216.
- O'Connell CP 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *J Exp Mar Biol Ecol* 25:285-312.
- O'Flaherty EJ 1996. A physiologically based model of chromium kinetics in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:54-64.
- Ochi T, Ohsawa M 1985. Participation of active oxygen species in the induction of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 143:137–142.
- OECD 1998. *Towards Sustainable Development: Environmental Indicators*, OECD, Paris.
- Olivier S 1959. Sequías, inundaciones y aprovechamiento de las lagunas bonaerenses, con especial referencia al desarrollo futuro de la piscicultura. *Agro* 1:1-94.
- Olivier SR 1961. Estudios limnológicos de la laguna de Vitel (partido de Chascomús, Buenos Aires – Argentina). *Agro* 3:1-128.
- Olson MO, Dundr M, Szebeni A 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 10:189–196.

- Olsson PE, 1989. Disorders associated with heavy metal pollution. In Leatherland JF, Woo PTK (Eds), Fish diseases and disorders, Volume 2: non-infectious disorders. CAB International, New York, pp 105-133.
- Ostrowski de Núñez M 1964. Estudios biológicos sobre *Diplostomus mordax* del cerebro del pejerrey *Basilichthys bonariensis* (Trematoda). *Neotropica* 10(33):114-119.
- Ostrowski de Núñez M 1968. Sobre ciclo biológico de *Austrodiplostomun mordax* Szidat-Nani, 1951. *Neotropica* 14(44):85-88.
- Ostrowski de Núñez M 1977. El ciclo biológico de *Diplostomun* (*Austrodiplostomun*) *compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970 (*Austrodiplostomun mordax* Szidat y Nani, 1951) (Trematoda, Diplostomatidae). *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. "B. Rivadavia", Parasit.* 2:7-63.
- Ottenwälder H, Wiegand HJ 1988. Uptake of $^{51}\text{Cr(VI)}$ by human erythrocytes: Evidence for a carrier-mediated transport mechanism. *Sci Total Environ* 71:561-566.
- Ovelgönne JH, Souren JEM, Wiegant FAC, Van Wijk R 1995. Relationship between cadmium-induced expression of heatshock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology* 99:19-30.
- Pagenkopf GK 1983. Gill surface interaction model for trace metals toxicity to fish: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ Sci Technol* 17:342-347.
- Palmiter RD 1995. Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-I, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicol Appl Pharmacol* 135:139-146.
- Pederson, T. 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26:3871-3876.
- Pelgrom SMGJ, Lock RAC, Balm PHM, Wendelaar Bonga SE 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat Toxicol* 32:303-320.
- Penny C, Adams C 1863. Four report, Royal Commission on Pollution of Rivers in Scotland. Vol 2 Evidence. London, pp 377-391.
- Pession A, Farabegoli F, Trerè D, Novello F, Montanaro L, Sperdi S, Rambelli F, Derenzini M 1991. The Ag-NOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. *Chromosoma* 100:242-250.
- Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF 2001. Evidence of p53-Dependent Cross-Talk between Ribosome Biogenesis and the Cell Cycle: Effects of Nucleolar Protein Bop1 on G1/S Transition. *Mol Cell Biol* 21:4246-4255.
- Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60:791-801.
- Pettine M, Millero FJ 1990. Chromium speciation in sea water: the probable role of hydrogen peroxide. *Limnol Oceanogr* 35:730-736.
- Pettine M, Millero FJ, La Noce T 1991. Chromium(III) interactions in seawater through its oxidation kinetics. *Mar Chem* 34:29-46.
- Pickering y Christie 1980. Sexual differences in the incidence and severity of ectoparasitic infestation of the brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* 16:669-683.
- Piersma AH, Roelen B, Roest P, Haakmat-Hoesenie AS, van Acht-erberg TAE, Mummery CL 1993. Cadmium-induced inhibition of proliferation and differentiation of embryonal carcinoma cells and mechanistic aspects of protection by zinc. *Teratology* 48:335-341.
- Pittman K, Bergh O, Opstad I, Skiftesvik AB, Skjolddal L, Strand H 1990. Development of eggs and yolk sac larvae of halibut. *Journal of Applied Ichthyology* 6,142-160.
- Planta RJ, Brown AJ, Cadahia JL, Cerdan ME, de Jonge M, Gent ME, Hayes A, Kolen CP, Lombardia LJ, Sefton M, Oliver SG, Thevelein J, Tournu H, van Delft YJ, Verbart DJ, Winderickx J 1999. Transcript analysis of 250 novel yeast genes from chromosome XIV. *Yeast* 15:329-50.
- Playle RC 1998. Modelling metal interactions at fish gills. *Sci Tot Environ* 219:147-163.
- Playle RC, Dixon DG, Burnison K 1993. Copper and Cadmium binding to fish gills: Modifications by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Can J Fish Aquat Sci* 50:2667-2677.
- Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C, Pederson T 2000. Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:55-60.

- Population Reference Bureau, Inc 1998. World and regional population. Washington, DC. Population Reference Bureau, Inc.
- Porcaro G, Imeroni J, Sanzano P, Pettinato H, D'amico E 2001. Desove natural del pejerrey *Odontesthes bonariensis* en estanques mediante el uso de plantas artificiales. En: Grosman F (ed) Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Asyanax, Azul, Bs As, p 65-67.
- Post GW 1993. Nutrition and nutritional diseases of salmonids. In: Stoskopf M (ed.) Fish Medicine. Saunders, Philadelphia, pp. 343-357.
- Powers EB 1917. The goldfish (*Carassius carassius*) as a test animal in the study of toxicity. III. Biol Monogr 4:7-73.
- Pratap HB, Fu H, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE 1989. Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. Arch Environ Contam Toxicol 18:568-575.
- Pratap HB, Wendelaar Bonga SE 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. Aquat Toxicol 26:133-150.
- Quievryn G, Goulart M, Messer J, Zhitkovich A 2003. Reduction of Cr(VI) by cysteine: Significance in human lymphocytes and formation of DNA damage in reactions with variable reduction rates. Mol Cell Biochem 222:107-118.
- Quievryn G, Peterson E, Messer J, Zhitkovich A 2002. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. Biochemistry 42:1062-1070.
- Quirós R, Rosso JJ, Rennella A, Sosnovsky A, Boveri M 2002. Análisis de las lagunas pampeanas (Argentinas). Interciencia, 27:584-591.
- Rai D, Eary LE, Zachara JM 1989. Environmental chemistry of chromium. Sci Tot Environ 86:15-23.
- Rajaram R, Nair BU, Ramasami, T 1995. Chromium-(III) induced abnormalities in human lymphocyte cell proliferation: evidence for apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 210:434-439.
- Rand GM 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Second Edition. Taylor & Francis, Bristol, PA pp 1083.
- Randi AS, Monserrat JM, Rodriguez EM, Romano LA 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). J Fish Biol 19:311-322.
- Raška I 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. Trends Cell Biology 13(10).
- Reartes J 1987. Evaluación del pejerrey (*Basilichtys bonariensis*) para el cultivo en estanques. 149-157p. En: Verreth, J.A. et al., (eds) Proc. Taller de Trabajo sobre acuicultura en América Latina. Inf. Found. Sci. (IFS) Stockholm, Sweden, Lima, Perú.
- Reartes J 1995. El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): métodos de cría y cultivo masivo. COPESCAL, Doc. Ocasional 9:1-35.
- Reartes, J., 1987. Evaluación del pejerrey (*Basilichtys bonariensis*) para el cultivo en estanques. 149-157p. En: Verreth, J.A. et al., (eds.) Proc. Taller de Trabajo sobre acuicultura en América Latina. Inf. Found. Sci. (IFS) Stockholm, Sweden, Lima, Perú.
- Rehwoldt R, Menapace LW, Nerrie B, Alessandrello D 1972. The effect of increased temperature upon the acute toxicity of some heavy metal ions. Bull Environ Contam Toxicol 8:91-96.
- Reid SD, McDonald DG 1988. Effects of cadmium, copper, and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can J Fisher Aquat Sc 45:244-253.
- Renard P, Strüssmann CA, Ling H, Takashima F 1994. Evaluation of extenders for pejerrey *Odontesthes bonariensis* sperm. Fish Sci. 60:661-666.
- Richard FC, Bourg ACM 1991. Aqueous geochemistry of chromium: a review. Water Res 25:807-816.
- Richards JG, Playle RC 1999. Protective effects of calcium against the physiological effects of exposure to a contamination of cadmium and copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J Zool 77:1035-1047.

- Ringelet, R.A. 1975. Zoogeografía y Ecología de los Peces de Aguas Continentales de la Argentina y Consideraciones Sobre las Areas ictológicas de América del Sur, *Ecosur*, 2 3:1-122.
- Ringelet E 1972. Dato ecológicos sobre las aguas de los ríos Samborombón y Salado.
- Ringelet RA 1942a. El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) del Embalse Anzulón (La Rioja). *Notas Museo La Plata Zool.* 7:177-200.
- Ringelet RA 1942b. Ecología alimenticia del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) con notas limnológicas sobre la laguna de Chascomús. *Rev. Mus. La Plata (n. s.), Sec. Zool.* 2:427-461.
- Ringelet RA 1943. Piscicultura del pejerrey o atherinicultura. Ed. Suelo Argentino. *Col. Agro* 6:1-162.
- Ringelet RA 1964. Un ejemplo de criterio normativo para la explotación de un recurso íctico de aguas continentales. La pesca comercial del pejerrey en la laguna de Chascomús. *Agro* 6:61-78.
- Ringelet RA 1967. Contaminación o polución del ambiente acuático con referencia especial a la que afecta el área platense. *Agro* 9:5-33.
- Ringelet RA, Iriart R, Escalante AH 1980. Alimentación del pejerrey (*Basilichthys bonariensis bonariensis*, Atherinidae) en laguna de Chascomús (Buenos Aires, Argentina). Relaciones ecológicas de complementación y eficiencia trófica del plancton. *Limnobiología* 1:447-460.
- Ringelet, R.A.; Alonso de Aramburú, R.A.; Aramburú, R.H. 1967. Los Peces de Agua Dulce de la República Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina, 602pp.
- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat Toxicol* 53:65-76.
- Riva MC, Flosa R, Crespi M, Balaschb J 1981. Lethal potassium dichromate and whitening (Blankophor) exposure of goldfish (*Carassius auratus*): Chromium levels in gills. *Comp Biochem Physiol* 68:161-165.
- Roch M, Maly EJ 1979. Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity. *J Fisher Res Board Can* 36:1297-1303.
- Roesijadi G 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 22:81-114.
- Roesijadi G, Hansen KM, Fuentes ME 1995. Cadmium-induced expression of metallothionein and suppression of RNA to DNA ratios during molluscan development. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:130-130.
- Roger B., Moisand A., Amalric F., Bouvet P. 2002. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* 277:10209-10219.
- Romanenko VD, Arkhipchuk VV, Solomatina VD, Malinovskaya MV, Makarova TA 1992. Using of the morphological nucleolus characteristics for estimation of metabolic processes in the fish organism. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences* 326:562-565.
- Ronco A, Alzuet PR, Sobrero MC, Bulus Rossini G 1996. "Ecotoxicological effects assessment of pollutants in the coastal region of the Gran La Plata, Province of Buenos Aires". *Proceedings of the International Conference on Pollution Processes in Coastal Environments*. Mar del Plata, Argentina, 2nd-6th December 1996. 116-119.
- Ronco AE, Porta A, Roca A 1992. "Las aguas del Río Santiago. Otro caso de contaminación urbano-industrial". *Ciencia Hoy*, vol. 4 No.19, 34-38.
- Ronco AE, Argemí F 1998. Metales pesados en agua, placton, peces y sedimentos de la Laguna de Lobos, Provincia de Buenos Aires. *Gerencia Ambiental* 5:788-792.
- Ronco AE, Camilión C, Manassero M 2001. Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environ Geochem and Health* 23:89-103.
- Roussel P, Hernández-Verdun D 1994. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 214:465-472.
- Rubbi CP, Milner J 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses *EMBO* 22:6068-6077.

- Ruesink RG 1975. The Relationship of the 96-Hr LC50 to the lethal threshold concentration of hexavalent chromium, phenol, and sodium pentachlorophenate for. *Trans Am Fish Soc* 104:567-570.
- Salomons W, de Groot AJG 1978. Pollution history of trace metals in sediments, as affected by the Rhine River. In: Krrmbein WE (Eds) *Environmental biochemistry*. *Amm Arbor Sci Publ* 1:149-162.
- Salomons W, Kerdijk H, van Page H, Klomp R, Schreur A 1988. Behaviour and impact assessment of heavy metals in estuarine and coastal zones. In Seeliger U, de Lacerda LD, Patchineelam SR (eds) *Metals in coastal environments of Latin America*. pp 157-198.
- Sastry KV, Sunita KM 1983. Enzymological and biochemical changes produced by chronic chromium exposure in a teleost fish, *Channa punctatus*. *Toxicology Letters* 16:9-15.
- Schecher WD, McAvoy DC, 1992. A software environment for chemical equilibrium modeling. *Comput Environent Urban Syst* 16:65-76.
- Scheer U, Hock R 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11:385-390.
- Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sancez J, Greco A, Hochstasser D, Diaz J 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13:4100-4109.
- Schiffman RH, Fromm PO 1959. Chromium-Induced changes in the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Sewage Ind Wastes* 31:205-211.
- Schneider R, Kadowaki T, Tartakoff AM 1995. mRNA transport in yeast: time to reinvestigate the functions of the nucleolus. *Mol Biol Cell* 6:357-370.
- Schroeder DC, Lee GF 1975. Potential transformation of chromium in natural waters. *Water Air Soil Pollut* 4, 355-365.
- Schwann T 1939. Mikroskopische untersuchungen über die übereinstimmungen in der struktur und dem wachstum der tiere und pflanzen. Sander, Berlin.
- Seeliger U, Lacerda LC, Patchineelam SR 1988. Metals in coastal environments of Latin America pp 297.
- Sendra ED, Colautti DC 1997. Procedimiento metodológico para el estudio del crecimiento del pejerrey *Odontesthes bonariensis* de la Lag. S. M. del Monte. *Natura Neotropicalis* 28:105-115.
- Serin G, Joseph G, Ghisol L, Bauzan M, Erard M, Amalric F, Bouvet P 1997. Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* 272:13109-13116.
- Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K 1999. Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:256-263.
- Shaw PJ, Jordan EG 1995. The nucleolus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11 93-121.
- Shi X, Ding M, Ye J, Wang S, Leonard SS, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Chiu A, Dalal N, Liu K 1999. Cr(IV) causes activation of nuclear transcription factor- κ B, DNA strand breaks and dG hydroxylation via free radical reactions. *J Inorg Biochem* 75:37-44.
- Shumilla JA, Wetterhahn KE, Barchowsky A 1998. Inhibition of NF- κ B Binding to DNA by Chromium, Cadmium, Mercury, Zinc, and Arsenite in Vitro: Evidence of a Thiol Mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 349:356-362.
- Sillen LG, Martell AE 1964. Stability Constants. Special Publication No. 17, Chemical Society, London, pp. 45.
- Silva J, Troncoso L, Bay-Smith E, Larrain A 2001. Utilization of *Odonthestes regia* (Atherinidae) from the South Eastern Pacific as a test organism for bioassays; study of its sensitivity to six chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol* 66:570-575
- Simkiss K 1996. Ecotoxicants at the cell-membrane barrier. In Newman MC, Jaoc CH (Eds), *Ecotoxicology: a Hierarchical Treatment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Sinclair DA, Guarente L 1997. Extra-chromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast. *Cell* 91:1033-1042.
- Sinclair DA, Mills K, Guarente L 1997. Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs1 mutants. *Science* 277:1313-1316.
- Singhal RK, Anderson ME, Meister A 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J* 1:220-223.

- Smetana K, Busch H 1974. New York Academic Press, pp. 75-148.
- Smikiss K, Taylor MG 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Rev Aquat Sci* 1:173-188.
- Smith JB, Dwyer SD, Smith L 1989. Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J Biol Chem* 264:7115-7118.
- Sola L, Natili GL, Cataudella S 1988. Cytogenetical characterization of *Odontesthes bonariensis* (Pisces; Atherinidae), an argentine species introduced in Italy. *Genetica (The Hague)* 77:217-224.
- Somoza GM, Lescheid DW, Miranda LA, Lo-Nostro FL, Magliulo-Cepriano L, Montaner AD, Schreiberman MP, Rivier JE, Sherwood NM 2002. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. *Biology-of-Reproduction*, 67:1864-1871
- Sorensen EM 1991. Metal Poisoning in Fish. CRC Press, Boca Raton, Florida, Inc. USA. 374 pp.
- Sorgeloos P, Persoone G, Baeza-Mesa M, Bussuyt E, Buggeman E 1980. The use of Artemia cysts in aquaculture: the concepts of "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. En: Proc. 9th Ann. Meeting WMS. Ed. Avault, J. W. Louisiana State University, Baton Rouge (LA-USA), pp 715-721.
- Speare DJ 1998. Non-infectious Disorders Associated with Intensive Aquaculture Husbandry: En Leatherland JF, Woo PTK (eds), Fish diseases and disorders. Volume 2: Non-infectious disorders. CAB International, New York, p 303-333.
- Sprague JB 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish I: bioassay methods for acute toxicity. *Water Res* 3:793-821.
- Stearns DM 2000. Is chromium a trace essential metal? *BioFactors* 11:149-162.
- Stearns DM, Wetterhahn KE 1994. Reaction of chromium(VI) with ascorbate produces chromium(V), chromium(IV), and carbon-based radicals. *Chem Res Toxicol* 7:219-230.
- Stefano AV, Canosa LF, D'eramo JL, Fridman O, Affanni JM, Somoza GM 1997. GnRH molecular variants in the brain and pituitary gland of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Chromatographic and immunological evidence for the presence of a novel molecular variant. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C:335-345.
- Stefano AV, Fridman O, Somoza GM 1995. Chromatographic and immunological evidence for a third form of GnRH in addition to cllGnRH and sGnRH in the brain of *Odontesthes bonariensis*. 79p. En: Goetz, F. y P. Thomas (Eds.) Reproductive Physiology of fish. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. The University of Texas at Austin. Marine Science Institute. TX, USA.
- Stefano AV, Vissio PG, Paz DA, Somoza GM, Maggese MC, Barrantes GE 1999. Colocalization of GnRH Binding Sites with Gonadotropin-, Somatotropin-, Somatolactin-, and Prolactin-Expressing Pituitary Cells of the Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in Vitro. *General and Comparative Endocrinology* 116, 133-139.
- Steinmann P 1928. Toxikologie der Fische. In: Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas. Vol 6 E Schweizerbrtsche Verlagsbuchandlung (Erwin Nägele), Stuttgart, Germany pp 289-342.
- Storch V, Stählin W, Juario JV 1983. Effect of different diets on the ultrastructure on the hepatocytes of *Chanos chanos* fry (Chanidae: Teleostei): and electron microscopic and morphometric analysis. *Mar Biol* 74:101-104.
- Stouthart AJHX, Spanings FAT, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE 1995. Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*) *Aquat Toxicol* 32:31-42.
- Strezoska Z, Pestov DG, Lau LF 2000. Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5.8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 20:5516-5528.
- Strüssmann C.A., Takashima F. 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonarioensis* (Cuvier et Valenciennes). *J Fish Biol* 36: 59-65
- Strüssmann CA, 1982. Informe sobre el Pejerrey. Informe técnico Laboratorio de Piscicultura de Peces de Agua Dulce, Prefectura de Japón. pp 22.
- Strüssmann CA, Akaba T, Ijima K, Yamaguchi K, Yoshizaki G, Takashima F 1997c. Spontaneous hybridization in the laboratory and genetic markers for the identification of hybrids between two

- atherinid species, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) and *Patagonina hatcheri* (Eigenmann, 1909). *Aquacult Res.* 28:291-300.
- Strüssmann CA, Choon NB, Takashima F, Oshiro T 1993. Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Prog. Fish. Cult* 55:83-89.
- Strüssmann CA, Moriyama S, Hanke E, Calsina Cota J, Takashima F 1996a. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *J. Fish Biol* 48:43-651.
- Strüssmann CA, Nakatsugawa H, Takashima F, Hasobe M, Suzuki T, Takai R 1999. Cryopreservation of Isolated Fish Blastomeres: Effects of Cell Stage, Cryoprotectant Concentration, and Cooling Rate on Postthawing Survival. *Cryobiology* 39:252-261.
- Strüssmann CA, Renard P, Ling H, Takashima F 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish Sci.* 60:9-13.
- Strüssmann CA, Saito T, Takashima F 1997b. Heat-induced germ cell deficiency in the teleost *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A:637-647.
- Strüssmann CA, Saito T, Usui M, Yamada H, Takashima F 1997a. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J. Experiment. Biol.* 278:167-177.
- Strüssmann CA, Takashima F 1989a. PNR, Histology and morphometry of starved Pejerrey, *Odonthestes bonariensis*, larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:237-246.
- Strussmann CA, Takashima F 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol.* 36:59-65.
- Strüssmann CA, Takashima F, 1989b. Effects of temperature upon survival and histological changes of starved pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:247-254.
- Strüssmann CA, Takashima F, Toda K, 1996b. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 139:31-45.
- Sugiyama M, Wang X., Costa M 1986. Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human, mouse, and hamster cell lines. *Cancer Res* 46:4547-4551.
- Susuki Y, Fukuda K 1990. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. *Arch Toxicol* 64:169-176.
- Suter GW 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL
- Suter GW, Barnhouse LW, Efroymsen RA, Jager H 1999. Ecological risk assessment in a large-reservoir: 2. Fish Community. *Environ Toxicol Chem* 18:589-598.
- Szebeni A, Olson MOJ 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Prot Sci* 8:905-912.
- Szidat L, Nani A 1951. Diplostomiasis cerebrealis del pejerrey. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat., Zool.* 1:323-384.
- Tadasi Mituta 2001. La historia del pejerrey en Japón. En: Grosman F (ed) *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Asyanax, Azul, Bs As, p 23-26.
- Takeda K, Fujita H, Shibahara S 1995. Differential control of the metal-mediated activation of the human heme oxygenase-1 and metallothionein-II_A genes. *Biochem. Biophys Res Commun* 207:160-167.
- Tang N, Enger MD 1993. Cd²⁺-induced c-myc mRNA accumulation in NRK-49F cells is blocked by the protein kinase inhibitor H7 but not HA 1004, indicating that protein kinase C is a mediator of the response. *Toxicology* 81:155-164.
- Tarzwel CM 1978. A brief story of water pollution research in United States. In: Mount DI (Ed), *Proceedings of the first USA-USSR symposium on the effect of pollutants upon aquatic ecosystems*, Sect 1, Vol 1, 23-25 October 1975, Duluth, Minn. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minn.
- Thanker J, Chhaya J, Nuzhat S, Mittal R, Mansuri AP, Kundu R 1996. Effects of chromium(VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a coastal teleost *Periophthalmus dipses*. *Toxicology* 112:237-244.
- Thomann RV, Snyder CA, Squibb KS 1994. Development of a Pharmacokinetic Model for Chromium in the Rat Following Subchronic Exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:189-198.

- Torres de Lemos C, Milan Rödel P, Terra NR, Erdtmann B 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environ Toxicol Chem* 20:1320-1324.
- Trama FB, Benoit RJ 1960. Toxicity of hexavalent chromium to bluegills. *J Water Pollut Cont Fed* 32:868-877.
- Treere D, Pession A, Derenzini M 1989. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184:131-137
- Truhaut R 1997. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotox Environ Saf* 1:151-173.
- Tschochner H, Hurt Ed 2004. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* (en prensa).
- Tsuzuki MY, Aikawa H, Strüssmann CA, Takashima F 2000. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. *J Appl Ichthyol* 16:126-130
- Tulian EA 1908. Breve resumen de los trabajos efectuados por la Dirección de Piscicultura durante el período comprendido desde el 1º de abril hasta el 31 de octubre de 1907. *Bol. Min. Agric.* 9(1-2):64-67
- Tulian EA 1909. Piscicultura argentina. Sus comienzos. 1904-1909. *The standard*:1-7.
- Tulian EA 1911. Five year's progress fish culture in Argentina. *Trans. Amer. Inst. Soc.* 40:413-422.
- Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, Chapin RE 2000. Effects of Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead on Gene Expression Regulated by a Battery of 13 Different Promoters in Recombinant HepG2 Cells *Toxicol Appl Pharmacol* 168:79-90.
- Turnbull H, Demann JG, Weston RF 1954. Toxicity of Various Refinery Materials to Fresh Water Fish *Ind Eng Chem* 46:324-333.
- Udy MJ 1956. Chromium, 2 vols. Reinhold, New York.
- Ultsch GR, Gros G 1979. Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in O₂ uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. *Comp Biochem Physiol* 62:685-689.
- United Nations 1992. Agenda 21: Programme of Action for Sustainable Development, United Nations Conference on Environment and Development. Rio de Janeiro, Brazil, 3-14 June 1992.
- USEPA 1987. Methods for spawning, culturing and conducting toxicity-tests with early life stages of four antherinid fishes: the inland silverside, *Menidia beryllina*, Atlantic silverside, *M. menidia*, tidewater silverside, *M. peninsulae*, and California grunion, *Leuresthes tenuis*. Middaugh, D.P., M.J. Hemmer, and L.R. Goodman. Office of Research and Development, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460. EPA/600/8-87/004.
- USEPA 1993. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Water to Freshwater and Marine Organism, 4th ed. Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA/600/4-90/027F.
- USEPA 2000. 2000 Update of ambient water quality criteria for cadmium. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA-822-F00-003.
- Vaglio A, Landriscina C 1999. Changes in liver enzyme activity in the Teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:111-116.
- Valette L 1910. La cría de pejerrey, *Bol Min Agric Bs As*, 7:28-53.
- Van der Putte I, Brinkhorst MA, Koeman JH 1981a. Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat Toxicol* 1:129-142.
- Van der Putte I, Laurier MBHM, Van Eijk GJM 1982. Respiration and osmoregulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at different pH values *Aquat Toxicol* 2:99-112.
- Van der Putte I, Lubbers J, Kolar Z 1981b. Effect of pH on uptake, tissue distribution and retention of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat Toxicol* 1:3-18.
- Van Ginneken L, Bervoets L, Blust R 2001. Bioavailability of Cd to the Common Carp, *Cyprinus carpio*, in the Presence of Humic Acid. *Aquat Toxicol* 52:13-27.
- Van Ginneken L, Chowdhury MJ, Blust R 1999. Bioavailability of cadmium and zinc to the common carp, *Cyprinus carpio*, in complexing environments: a test for the validity of the free-ion activity model. *Environ. Toxicol Chem* 18:2295-2304.

- Van Hoogen G, Opperhuizen A 1988. Toxicokinetic of chlorobenzenes in fish. *Environ. Toxicol Chem* 7:213-219.
- Van Hying JM 1973. Factors affecting the abundance of Fall Chinook Salmon in the Columbia River. Research Report of the fish Commission of Oregon, 4:1-87.
- Varanasi U, Markey D 1978. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *Comp Biochem Physiol* 60:187-191.
- Vasant C, Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T 2001. Apoptosis of Lymphocytes in the Presence of Cr(V) Complexes: Role in Cr(VI)-Induced Toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1354-1360.
- Verboost PM, Flik G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE 1987. Cadmium inhibition of Ca^{+2} uptake in rainbow trout gills. *Am J Physiol* 22:R216-R221.
- Verboost PM, Van Rooij J, Flik G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J Exp Biol* 145:185-197.
- Verrengia-Guerrero NR, Kesten EM 1993. Levels of heavy metals in biota from the La Plata River. *Environ Toxicol Water Qual* 8:335-344.
- Villar C, de Cabo L, Vaithyanathan P, Bonetto C 1998b. River-foodplain interactions: nutrients concentrations in the Lower Paraná River. *Arch Hydrobiol* 142:433-450.
- Villar C, Stripeikis J, Colautti D, D'Huicque L, Tudinio M, Bonetto C 2001. Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the lower Paraná River and Río de la Plata Estuary. *Hydrobiologia* 457:225-233.
- Villar C, Stripeikis J, D'Huicque L, Tudinio M, Troccoli O, Bonetto C 1999. Cd, Cu, and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Río de la Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia* 416:41-49.
- Villar C, Tudinio M, Bonetto C, de Cabo L, Stripeikis J, D'Huicque L, Troccoli O 1998a. Heavy metal concentrations in the Lower Paraná Rver and right margin of the Río de la Plata Estuary. *Verh Internat Verein Limnol* 26:963-966.
- Visek WJ, Whitney IB, Kuhn USG, Comar CL 1953. Metabolism of ^{51}Cr by animals as influenced by chemical state. *Proc Soc Exp Biol Med* 84:610-615.
- Visintin R, Amon A 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 752.
- Vissio PG, Somoza GM, Maggese MC, Paz DA, Strüssmann CA 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisheries Sciences* 64:64-68.
- Vissio PG, Stefano AV, Somoza GM, Maggese MC, Paz DA 1999. Close association of gonadotropin-releasing hormone fibers and gonadotropin, growth hormone, somatolactin and prolactin expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem* 21:121-128.
- Wada O, Wu, GY, Yamamoto A, Manabe S, Ono T 1984. Purification and chromium-excretory function of low-molecular weight, chromium binding substance from dog liver. *Environ Res* 32:228-239.
- Wang D, Baumann A, Szebeni A, Olson MOJ 1994. The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem* 269:30994-30998.
- Webb M 1979. Interactions of cadmium with cellular components. In: Webb, M. (Ed.), *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Elsevier, Amsterdam, p. 8.
- Weber H 1983. Long-term study of the distribution of soluble chromate-51 in the rat after a single intratracheal administration. *J Toxicol Environ Health* 11:749-764.
- Weiss TF 1996. *Cellular Biophysics*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Welcome, R.L.1988. *International Introductions of Inland Aquatic Species*. FAO Fish Tec. Paper, 294, 318pp.
- Wepener V, van Vuren JHJ, Du Preez HH 1992. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the haematology of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 101:375-381.
- Wetterhahn J 1979. Chromate metabolism in liver microsomes. *Biol Trace Elem Res* 1:55-62.

- White, B.N. 1985. Evolutionary Relationship of the Atherinopsinae (Pisces, Atherinidae) Contr. Sci. 368:1-20.
- Wicklund Glynn A 1991. Cadmium and zinc kinetics in fish: studies on water-borne ^{109}Cd and ^{65}Zn turnover and intracellular distribution in minnows *Phoxinus phoxinus*. Pharmacol Toxicol 69:485-491.
- Wicklund Glynn A 1996. The concentration dependency of branchial intracellular cadmium distribution and influx in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Aquat Toxicol 35:47-58.
- Wicklund Glynn A, Norregren L, Müssener Å 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of zebrafish, *Brachydanio rerio*. Aquat Toxicol 30:13-26.
- Wiegand HJ, Ottenwälder H, Bolt HM 1985. Fast uptake kinetics in vitro $^{51}\text{Cr(VI)}$ by red blood cells of man and rat. Arch Toxicol 57:31-34.
- Wilson RW, Taylor EW 1993. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol 163:38-47.
- Wong CKC, Wong MH 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. Aquat Toxicol 48:517-527.
- Wood CM 1992. Flux measurements as indices of H^+ and metal effects on freshwater fish. Aquat Toxicol 22:239-264.
- Wood CM, Adams WJ, Ankley GT, DiBona DR, Luoma SN, Playle RC, Stubblefield WA, Bergman HL, Erickson RJ, Mattice JS, Schlekot CE 1997. Environmental toxicology of metals. In: Bergman HL, Dorward-King EJ (Eds), Reassessment of metals criteria for aquatic life protection: priorities for research and implementation, Pensacola, FL: SETAC Pellston Workshop on Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection, SETAC Pr. pp 31-56
- Wood CM, Playle RC, Hogstrand C 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. Environ Toxicol Chem 18:71-83.
- Wood EM 1953. The toxicity of 3400 chemicals to fish. Fish Toxicity Project N° 1, US Wildl Serv, Kearneysville, West Virginia. pp 198.
- Xu J, Bublely GJ, Detrick B, Blankenship LJ, Patierno SR 1996. Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrests, DNA-DNA crosslinks, and S-phase blockade of cell cycle. Carcinogenesis 17:1511-1517.
- Yoshizaki G, Yamaguchi K, Oota T, Strussmann C, Takashima F. 1997. Cloning and characterization of pejerrey mitochondrial DNA and its application for RFLP analysis. J Fish Biology 51:193-204.
- Zar JH 1996. Biostatistical Analysis, 3rd ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhai W, Comai L 2000. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. Mol Cell Biol 20:5930-5938.
- Zhitkovich A, Song Y, Quievryn G, Voitkun V 2001. Non-oxidative mechanism are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: the role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. Biochemistry 40:549-560.
- Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M 1995. Glutathione and free amino acids form stable complexes with DNA following exposure of intact mammalian cells to chromate. Carcinogenesis 16:907-913.
- Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M 1998. Utilization of DNA-protein crosslinks as a biomarker of chromium exposure. Environ Health Perspect 106:969-974.