

Biomarcadores en la especie *Gambusia punctata* (poeciliidae) dada las condiciones ambientales del ecosistema San Juan - Biomarkers in the *Gambusia punctata* (poeciliidae) specie by the environmental conditions of San Juan ecosystem

George Argota Pérez ¹, Humberto Argota Coello ², Rigoberto Fimia Duarte ³

¹⁾ Laboratorio de Ecotoxicología. Grupo de Estudios Preclínicos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Autopista Nacional Km. 1 ½. Telef: (53)(22) 64-40-95, AP 4033. Santiago de Cuba 90400, Cuba.

²⁾ Departamento Técnico. Laboratorio de Minerales. Empresa Geominera - Oriente (EGMO). Santiago de Cuba, Cuba.

³⁾ Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Villa Clara, Cuba.

george@toxi.scu.sld.cu , george.argota@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante biomarcadores de exposición y efecto en la especie *Gambusia punctata* las condiciones ambientales del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba. El estudio se realizó durante el 2011, donde fueron seleccionadas tres estaciones de muestreos correspondientes a la parte alta, media y baja del río principal. Se escogieron peces sexualmente maduros que biométricamente midieron entre 2.1-3.0cm de longitud total. La evaluación estuvo referida a la determinación de metales, niveles de proteínas totales, actividad acetilcolinesterasa e histopatología. Los metales e histopatología fueron analizados en hígado, branquias y cerebro. Se analizaron concentraciones de Cu, Zn, Pb y Cd, tratados vía húmeda y cuantificados mediante espectroscopia de plasma inductivamente acoplado de vista axial. Los resultados obtenidos fueron comparados con la misma especie pero procedente del ecosistema Filé, ubicado en la misma localidad y utilizado como referencia ambiental. Todas las determinaciones arrojaron valores superiores en las hembras. En ambos sexos, los niveles bioacumulados de metales fueron superiores significativamente ($P < 0.05$) a los de referencia ambiental, así como los daños histológicos observados para los tres órganos al compararse con la referencia ambiental. Conjuntamente a ello, los niveles de proteínas totales y la actividad enzimática se comportaron en orden descendentes desde la estación alta > media > baja respectivamente. Se concluyó que los biomarcadores evaluados indicaron que la salud de la especie no es óptima, siendo este estudio uno de los primeros de su tipo que se realiza en condiciones naturales.

Palabras claves: salud animal, biomarcadores, metales pesados, contaminación, *Gambusia punctata*

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate by means of biomarkers of exposure and effect in the *Gambusia punctata* species the environmental conditions of the ecosystem San Juan in Santiago de Cuba. The study was done in 2011, where they were selected three seasons of samples conformable to the high, middle and low part or section of the main river. It was selected fishes sexually matured that biometrically sized between 2.1-3.0 cm of total length. The evaluation was reported to the determination of metals, levels of proteins, acetylcholinesterase and histopathology. The metals and histopathology were analyzed in liver, gills of a fish and brain. It was analyzed concentrations of Cu, Zn, Pb and Cd, treated via humidity and quantified by spectroscopy of plasma inductively coupled to axial view. The results were compared with the same species but from the ecosystem of Filé, located in the same place and applied as environmental reference. All determination emitted superior values in females. In both sexes the bioaccumulated levels of metals were greater ($P < 0.05$) to the environmental reference, as soon as the histologic damages that were seen in the three organs comparing with the environmental reference. As a whole level of proteins and the enzymatic activity were conducted in a descending order from the high season > mid > low respectively. It was concluded that evaluated biomarkers suggested that the health of the species is not the best, being this research one of the first of this type that is carried out natural conditions.

Key words: animal health, bioconcentration, biomarkers, heavy metals, pollution, *Gambusia punctata*

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales, las aguas superficiales han sido por excelencia el reservorio final donde son descargados los residuales antropogénicos, afectando directamente el confort, alimentación, las reacciones frente estímulos y la propia defensa contra agentes patógenos naturales entre otras variables ambientales de interés y sin duda alguna, esta situación representa un desequilibrio y afectación para el bienestar animal.

Aunque el término de bienestar animal ha sido empleado solo para la experimentación a nivel de laboratorio, según Estol (2008), éste se refiere a las condiciones que deben crearse para mantener niveles óptimos de salud y productividad. Sin embargo, una de las mayores interrogantes en la actualidad, es conocer las posibles herramientas que puedan ser aplicadas para evaluar la salud o bienestar animal en su hábitat natural.

Debido a ello, durante los últimos años se ha intensificado la búsqueda de métodos de estudio para detectar los impactos sobre los ecosistemas acuáticos, con motivo de poder diseñar e implementar medidas preventivas. En este caso, el uso y desarrollo de biomarcadores han cobrado un interés creciente para evaluar el riesgo de una sustancia o mezcla química potencialmente tóxica, ya que los biomarcadores constituyen valiosos parámetros o indicadores de la presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos como respuestas a distintos xenobióticos (West *et al.*, 2006).

En el campo de la ecotoxicología, los cambios biológicos expresados por organismos, poblaciones o comunidades servirían como señales de la posible alteración que está sufriendo un ecosistema por las actividades de origen antropogénico. Cada nivel de respuesta biológica, representa una señal integrada de los niveles de contaminación en un área determinada y de esta manera, sirve como indicador del riesgo toxicológico a que una población natural está siendo expuesta (Orrego *et al.*, 2005).

A nivel de ecosistemas acuáticos, los peces han sido uno de los primeros en ser utilizados en los protocolos de evaluación y como especies centinelas, ya que la característica más importante, es que están en la cumbre de la cadena trófica pudiendo afectar la salud humana, lo cual aumenta su importancia en los estudios ambientales (Zhou, 2008). En el caso del pez *Gambusia punctata*, es una especie de la familia *Poeciliidae* que habita de forma natural en los ríos cubanos donde además de su control biológico antivectorial de larvas, ha indicado la exposición ambiental de elementos tóxicos como son los metales pesados en las aguas (Argota *et al.*, 2012a).

A pesar de lo planteado, actualmente una de las mayores dificultades en la ecotoxicología de campo utilizando organismos bioindicadores como los peces, es precisamente que diversos patrones como los ecológicos, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos entre otros, se encuentran limitados a su comparación, por la falta de estudios de referencias en condiciones mínimas de contaminación incluyendo en muchas ocasiones a las mismas especies.

El objetivo del presente estudio fue evaluar mediante biomarcadores de exposición y efecto en la especie *Gambusia punctata* las condiciones ambientales del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Época de muestreo y selección de las estaciones

El muestreo se realizó cada tres meses durante todo el año 2011. Fueron seleccionadas únicamente tres estaciones de muestreo correspondientes a la parte alta, media y baja del ecosistema San Juan, las cuales se consideraron críticas según el número de fuentes tributarias contaminantes, tasas de emisiones, limnología, movilidad y persistencia de contaminantes de interés.

Selección de los organismos

Se muestrearon los ejemplares mediante un jamo profesional (60 x 50 x 45cm) con luz de malla 0.5cm. Seguidamente, fueron tranquilizados los ejemplares una vez depositados en placas de cristal con hielo para su morfometría y determinación de biomarcadores.

En el caso de la morfometría, se realizó una clasificación por tallas de edades según lo realizado por Habit (2006), donde se escogieron machos y hembras que estuvieron en el intervalo de 2.1cm a 3.0cm de longitud total.

Determinación de biomarcadores

Se determinó como biomarcadores de exposición las concentraciones bioacumuladas de Cu, Zn, Pb y Cd en cerebro, branquias e hígado, los cuales se trataron vía húmeda y cuantificados mediante espectroscopía por plasma inductivamente acoplado con vista axial (Argota *et al.*, 2012b). Asimismo, se determinó como biomarcadores de efecto, el contenido de proteínas totales a nivel de organismo, actividad acetilcolinesterasa (AChE) cerebral e histopatología en los órganos dianas anteriormente mencionados.

• Análisis de proteínas totales

Se pesaron 0.5g de tejido por cada réplica en forma de pool, luego se homogenizó con 1ml de solución de Tris buffer pH = 7 y se centrifugó a 5600 r.p.m. durante 30 minutos a temperatura de 5.5°C en una centrífuga refrigerada. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se tomaron alícuotas de 10 µl a las que se adicionaron 5ml del reactivo de Bradford, después de agitar y reposar durante 5 minutos, se registró la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro Beckman.

• Análisis actividad acetilcolinesterasa (AChE)

Siguiendo el método de Ellman (1961), las muestras fueron homogenizadas en tampón TRIS/HCL 0,1 M, 0,1% Triton pH 8 en la proporción de 1ml por 0.5g de tejido, centrifugándose a 1000 rpm por 12 min.

Se utilizó como sustrato para la actividad de la AChE cerebral, acetiltiocolina yodada y la detección de la liberación de tiocolina por reacción con 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico). Después de un periodo de 5 min, fue monitoreada y registrada la actividad mediante un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS) a 410 nm. La actividad se expresó como µmol/min./mg de tejido, realizándose todos los análisis por duplicado.

• Procesamiento histológico

Las muestras de los órganos dianas se fijaron en formol al 10%, embebidas en parafina y realizando cortes histológicos de 3 - 5µm de grosor y tinción con hematoxilina-eosina tradicional. La evaluación histopatológica se realizó al microscopio óptico (JENAMED-2).

Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron tratados en el programa estadístico *Statgraphis versión 5.1*, los cuales se analizaron por ANOVA seleccionando la prueba LSD de comparación múltiple de medias.

En los casos que la distribución no fue simétrica, los datos fueron transformados y analizados mediante ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis). Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $P < 0.05$.

Los resultados de los metales e histológicos fueron comparados con los obtenidos en la propia especie pero que habita en el río Filé ubicado en la misma localidad de Santiago de Cuba, el cual ha sido utilizado por Argota *et al.*, (2012 b) como referencia ambiental.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los niveles de metales pesados bioacumulados por sexo y órganos dianas, donde fueron mayores en las hembras.

En cuanto al contenido de metales por estaciones se comportó de forma descendente: (alta > media > baja), existiendo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con relación al valor de referencia ambiental.

Tabla 1. Metales pesados bioacumulados por sexo y órganos dianas (ppm).

metales	NC	órganos	machos				hembras			
			2.1- 3.0			VRA*	2.1- 3.0			VRA*
			alta	media	baja		alta	media	baja	
Cu ± 0.017	10.0	hígado	33.21	40.13	42.29	24.2	38.28	41.33	44.57	24.8
		branquias	43.20	45.17	48.20	31.2	45.18	47.66	49.20	31.9
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn ± 0.045	50.0	hígado	73.15	76.34	79.19	53.21	72.77	75.24	79.46	53.30
		branquias	43.87	47.22	50.66	44.18	44.65	48.82	51.76	44.21
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pb ± 0.004	1.0	hígado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		branquias	0.029	0.027	0.026	0.011	0.036	0.036	0.035	0.012
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd ± 0.012	0.05	hígado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		branquias	17.12	17.55	18.51	12.32	18.76	18.99	19.69	12.33
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Leyenda: Valor de incertidumbre: (±), Norma Cubana (NC), Valor referencia ambiental: (VRA)

* Diferencias significativas ($P < 0.05$), No Detectado: (ND)

La tabla 2 muestra los niveles de proteínas totales, donde fueron mayores en las hembras y de forma descendente entre las estaciones (alta > media > baja). Entre los sexos y estaciones se encontró, diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Tabla 2. Niveles de proteínas totales en cada sexo por estación.

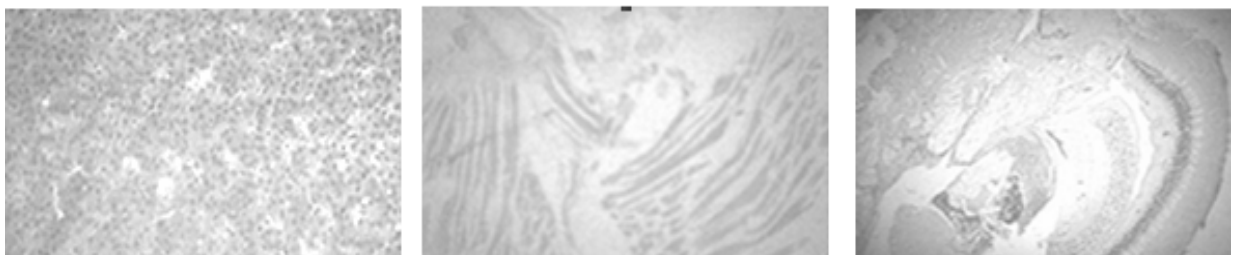
Estaciones	Media \pm SD	
	Macho	Hembra
Alta	13.23 \pm 2.04	14.11 \pm 2.65
Media	11.17 \pm 3.25	12.39 \pm 3.76
Baja	8.54 \pm 2.87	9.46 \pm 2.52

La tabla 3 muestra la actividad promedio determinada de la enzima acetilcolinesterasa en los ejemplares agrupados en forma de pool, donde igualmente los niveles se comportaron de forma descendente entre las estaciones (alta > media > baja), siendo mayores también para las hembras y existiendo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con respecto a los machos.

Tabla 3. Actividad de la acetilcolinesterasa en cada sexo por estación.

Estaciones	Media \pm SD	
	Macho	Hembra
Alta	525.65 \pm 41.63	539.43 \pm 35.48
Media	482.48 \pm 36.18	507.26 \pm 51.30
Baja	418.36 \pm 22.75	452.57 \pm 29.42

En la figura 1 se observa, la histología de los órganos dianas. La banda superior corresponde a la especie del ecosistema Filé (referencia ambiental), mientras que la banda inferior pertenece a la especie del ecosistema San Juan, donde se observaron daños en sus tres órganos señalan las flechas.



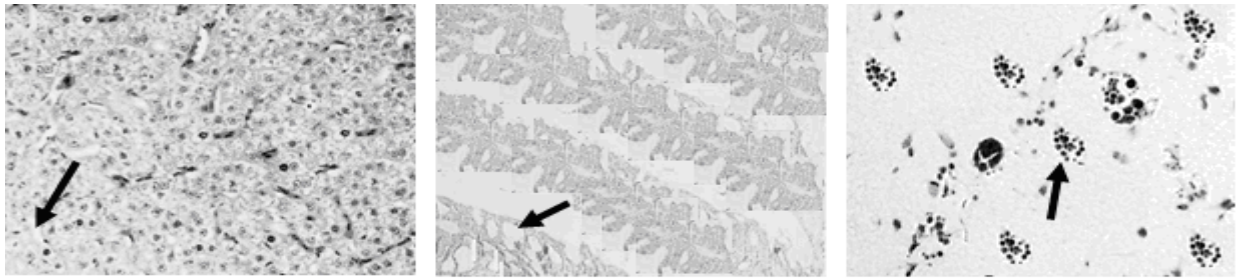


Figura I. Histología en la *Gambusia punctata*. Hígado (izquierda), branquias (centro) y cerebro (derecha). Aum. 40 X.

DISCUSIÓN

La selección y monitoreo con organismos naturales es fundamental para expresar en términos cualitativos y cuantitativos los cambios que ocurren en el tiempo ocasionado por las contaminaciones. Asimismo, en dependencia primero de la posición evolutiva que ocupan las especies y segundo; los daños biológicos que se hallan tanto por homología como analogía en tejidos y órganos, permiten predecir los niveles de riesgos que pudieran aparecer igualmente en humanos, máxime cuando éste hace uso de los ecosistemas.

En este trabajo, las concentraciones determinadas de los metales en la especie del San Juan, fueron consideradas muy elevadas por lo que según Robles *et al.*, (2008), en los ambientes acuáticos, las excesivas concentraciones de éstos elementos, afectan a los organismos de diferentes maneras pudiendo ocasionar desde una disminución de su metabolismo y crecimiento hasta la muerte celular, ya que esta última puede ocasionarse por asfixia debido a la coagulación de las mucosidades sobre las branquias. Debido a que todos los metales bioacumulados fueron comparativamente significativos al referenciado, indica que la probabilidad de toxicidad está presente, incluyendo a los elementos esenciales Cu y Zn.

Según Armendáriz *et al.*, (2008), se ha observado que la toxicidad del Cu en los sistemas acuáticos, aumenta cuando disminuye la dureza del agua y el oxígeno disuelto. Asimismo decrece la toxicidad en presencia de agentes quelatantes, ácidos húmicos y sólidos en suspensión esenciales para atrapar metales. Por su parte, Grosell *et al.*, (2004), expresa que otros efectos negativos en peces debido a un exceso de Cu son el estrés oxidativo y nocividad sobre órganos osmorregulatorios y las branquias, así como en el transporte de iones Na⁺ debido a la inhibición de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa.

Algunos autores como Palaniappan (2009), mencionan que en cuanto la toxicidad del Zn en los organismos acuáticos, es mayor para valores bajos de pH, contenido de oxígeno disuelto y temperaturas elevadas. En estas

condiciones se producen daños en las células epiteliales de las branquias que pueden llegar a ocasionar la muerte. A nivel bioquímico la intoxicación por Zn provoca una disminución significativa en el contenido de glucógeno, proteína y lípidos en los tejidos, unido a la disminución del valor calorífico afectando al valor nutritivo de los peces siendo el hígado el tejido más afectado. Esta disminución en el contenido calorífico causada por la exposición a Zn, provoca un aumento de la tasa metabólica de los peces.

Norberg (2009), refiere que el caso del Pb, es el metal tóxico más extendido y presente en casi todos los compartimentos ambientales. Éste bloquea la transmisión del impulso nervioso y la liberación de acetilcolina, donde también posee gran afinidad por las mitocondrias e inhibe la fosforilación oxidativa. Su exposición produce anemia como resultado de dos efectos básicos relacionados con disminución de la longevidad de los glóbulos rojos e inhibición de enzimas que intervienen en la síntesis de hemoglobina.

Mancera (2006), plantea que el cadmio, en los sistemas biológicos puede competir con el Zn, Cu y Ca por los sitios de unión de estos elementos en las macromoléculas. Su efecto a escala molecular, está relacionado con la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, específicamente a nivel del complejo III en el sitio de unión de la semiubiquinona, la cual es conocida porque transfiere un electrón al oxígeno molecular para formar el anión superóxido, explicando así el efecto oxidativo inducido por este metal en la células.

En cuanto a la determinación de proteínas, si bien es cierto que en este trabajo se realizó de forma total, entre ellas debió encontrarse una en lo específico denominada metalotianinas que son de baja masa molecular, ricas en cisteína y responsables además del transporte de metales, ya sean esenciales o no. Cuando las concentraciones de éstos elementos se incrementan en los tejidos, ocurre un aumento en la concentración de estas proteínas, siendo demostrado en ambientes naturales por Álvarez (2008).

En este estudio no se observaron tumoraciones en el cerebro de los peces, aunque autores como Vidal (2005), refieren que en humanos los cambios en niveles de AChE-S y sus propiedades se han reportado en varias enfermedades neuro-degenerativas, donde las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis son las tres neuropatologías más estudiadas en relación con alteraciones en la AChE. Asimismo, este autor indica que la actividad de AChE se ha encontrado incrementada en meningiomas, astrocitomas y tumores de glioblastoma y su patrón de isoformas es diferente al de tejido sano. Igualmente menciona, que se han observado alteraciones en la expresión de la AChE en diferentes tumores, amplificación de genes de AChE en leucemias, tumores de ovario y en la agresividad de astrocitomas; evidenciando de esta forma su

participación en la tumorigénesis, de manera que estos estudios sugieren que la AChE está involucrada en la regulación del ciclo celular.

Por su parte, Meshorer (2006) menciona que AChE en la mayoría de los estudios se ha enfocado a su actividad en la hidrólisis de la ACh, aunque expresa que esta enzima no está restringida solo al sistema nervioso y parece tener diferentes funciones, debido a que está presente tanto en bacterias como plantas y en las que se piensa puede funcionar como un factor trófico. Las proteínas con dominio de colinesterasas parecen ser el resultado de duplicaciones de un gen ancestral de AChE dado que la comparación de la secuencia del dominio catalítico y del no catalítico sugiere que en estos genes la actividad enzimática pudo perderse en varias etapas independientes durante la evolución.

Argota *et al.*, (2012b) han mencionado que los peces al ser sometidos a contaminación, ya sea por sustancias inorgánicas u otras sustancias químicas orgánicas como productos de fertilización, plaguicidas o compuestos orgánicos persistentes y que tienen algún tipo de acción diana en hígado, branquias o cerebro pueden ser varias las lesiones. Este autor y sus colaboradores, han realizado estudios en la especie *Gambusia punctata* del ecosistema Filé, donde no han encontrado alteraciones morfológicas leves ni severas en los órganos dianas seleccionados.

Sin embargo, la propia especie pero perteneciente al ecosistema San Juan en este estudio, presentó pérdida de la densidad de los hepatocitos, vacuolización leve generalizada asociada a cambio graso (flecha indicada), así como anisocitosis en estos hepatocitos. En el caso de las branquias se observó hiperplasia interlamelar severa, formación de estructura semiquísticas en los extremos distales de lamelas branquiales (flecha indicada), así como el cerebro presentó neuronas con granulaciones hialinas y células granulares eosinófilicas (flecha indicada). Es importante mencionar que la histología de la especie del San Juan, solo se realizó en los ejemplares de la estación baja, pues considerando la limnología del sistema, así como movilidad y persistencia ambiental, las mayores cargas contaminantes deberían estar en esta zona y por tanto, encontrarse posibles daños significativos lo cual se correspondió con los observados en los órganos. Las branquias al ser un órgano muy vascularizado, cuando se expone a condiciones de contaminación, se hace característico la aparición tanto de pequeñas hemorragias en sus capilares, fusión de sus laminillas, así como telangiectasias laminares o aneurismas y petequias, lo cual se traduce en que los capilares de las laminillas branquiales se dilatan y la sangre se estanca. En el caso del cerebro, igualmente son varios los tipos de lesiones fundamentalmente en la región anterior del encéfalo correspondiente al telencéfalo y entre las que se pueden mencionar infiltración perivascular en las células de la glía, congestión en meninges, vasos sanguíneos de la región cortical y cuerpo de neuronas apoptóticas. Aún cuando esta especie ha sido reconocida como tolerante a la contaminación, los daños observados en el epitelio

branquial, muestran que esta especie en su medio natural se encuentra en condiciones de hipoxia. Según Bernet (2004), estas respuestas proliferativas generan deformación de las lamelas, fusión lamelar y pseudoepitelización, lo cual ha sido descrito en exposición a contaminantes. Esta respuesta adaptativa aumenta el espacio de difusión de iones, oxígeno y del tóxico hacia la sangre. Las vacuolizaciones lipídicas en el hígado evidenciadas en el presente estudio, han sido descritas en peces expuestos a otros contaminantes (Szarek *et al.*, 2000) y representan una estrategia para reducir la disponibilidad de xenobióticos lipofílicos, donde además son compatibles con la evidencia macroscópica de coloraciones blanquecinas observadas.

El cerebro de los peces a diferencia de los mamíferos se distingue por su habilidad para reemplazar neuronas perdidas (Zupan, 2006). Dentro del patrón alimentario de la especie, también se incluye ser detritivos por lo que dada la remoción de detritos según Lema (2005), puede estarse generando junto a un efecto directo sobre las somas neuronales, un desbalance en la proporción destrucción/remoción: generación de neuronas.

Finalmente se concluyó, que los biomarcadores seleccionados en la especie, mostraron las condiciones ambientales de los ecosistemas estudiados, encontrándose muy afectado el San Juan. Por su parte, los valores obtenidos en los biomarcadores de la especie perteneciente al Filé, permitieron conocer tanto niveles umbrales como propiciando la comparación, por lo que este trabajo representó uno de los primeros realizados utilizando varios biomarcadores en la misma especie, siendo una de ellas utilizada en calidad de referencia ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez LT, Mendoza CD, Moreno SR, GOLD BG (2008). Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 86(1):12-9.
2. Argota PG, González PY, Argota CH, Fimia DR, Iannacone OJ (2012 a). Desarrollo y bioacumulación de metales pesados en *Gambusia punctata* (Poeciliidae) ante los efectos de la contaminación acuática. REDVET Rev. electrón. vet. Volumen 13 N° 05B. ISSN 1695-7504.
3. Argota PG, Argota CH, Larramendi GD, Mora TY, Fimia DR, Iannacone OJ (2012 b). Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) del río Filé de Santiago de Cuba. REDVET Rev. electrón. vet. Volumen 13 N° 05B. ISSN 1695-7504.
4. Armendáriz SN, Aquino TM, Romero OL, Sánchez VM, Sobrino F, Miranda AM (2008). Evaluación de los parámetros bioquímicos en

- tres macrofitas acuáticas expuestas a cobre. *Polibotánica*, 26, 149-158.
5. Bernet D, Schmidt H, Wahli T, Burkhardt P (2004). Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiologia*; 524:53-66.
 6. Ellman GL, Courtney KD *et al.* (1961). *Biochem. Pharmacol*, 7 págs. 88-95.
 7. Estol L (2008). Bienestar animal. Disponible en:
 8. <http://veterinarios.mascotia.com/informes-tecnicos/medicinas-alternativas/bienestar>
 9. Grosell M, McDonald MD, Walsh PJ, Wood CM (2004). Effects of prolonged exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissues. *Aquat. Toxicol.*, 68, 263-275.
 10. Habit E, Belk MC, Tuckfield RC, Parra O (2006). "Response of the fish community to human-induced changes in the Biobío River in Chile." *Freshwater Biology* 51: 1-11.
 11. Lema SC, Hodges MJ, Marchetti MP, Nevitt GA (2005). Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comp Biochem Physiol Part A*; 141:327-335.
 12. Mancera RNJ, Álvarez LR (2006). Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No.1, 3 -23.
 13. Meshorer E, Soreq H (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci* 29(4):216-224. guanylate kinases. *J Biol Chem* 278: 6873-6878.
 14. Norberg GF (2009). Historical perspective on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 238, No. 3, p. 192-200.
 15. Orrego R, Moraga CG, González M, Barra R, Valenzuela A, Burgos A, Gavilán JF (2005). "Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(8).
 16. Palaniappan PL, Renju VB (2009). FT-IR study of the effect of zinc exposure on the biochemical contents muscle of *Labeo rohita*. *Infrared Phys. Techn.*, 52, 37-41.
 17. Robles CA, Pérez R, Vázquez ML, Sánchez JG, Aguirre G (2008). Variabilidad espacio-temporal de metales pesados en camarones, agua y sedimentos de la laguna Madre, Tamaulipas. Disponible en:
 18. <http://www.turevista.vat.edu.mx/vol203%20num%202>. Consultado 24/07/2012.
 19. Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech E, Banaszkievicz T (2000). Effect of the herbicide RoundUp™ on the ultrastructural

- pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). Marine Environ Res; 50:263-266.
20. Vidal CJ (2005). Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. Chem Biol Interact 157-158: 227-232.
 21. West DW, Ling N, Hicks BJ, Tremblay LA, Kim ND, Van den Heuvel MR (2006). "Cumulative impacts assessment along a large river, using brown bullhead catfish (*Ameiurus nebulosus*) populations." Environmental Toxicology and Chemistry 25(7): 1868-1880.
 22. Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Anal. Chim. Acta; 606, 135-150.
 23. Zupanc GKH (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J Comp Physiol A; 192:649-670.

REDVET: 2013, Vol. 14 N° 6

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050513.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060613/061307.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con
REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>