



CONAMA10
CONGRESO NACIONAL
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

Cronotoxicidad del Cadmio en pez cebra: análisis de mortalidad y respuestas de comportamiento

Autor: Carolina Bello

Institución: Universidad de Murcia

e-mail: carol.bello.marin@gmail.com

Otros Autores: Luisa M. Vera Andujar (Universidad de Murcia); Francisco Javier Sánchez Vázquez.

RESUMEN

Los metales pesados se consideran serios contaminantes del ecosistema acuático. Muchos de estos compuestos no biodegradables son absorbidos y acumulados por los peces e incorporados a la cadena trófica, causando problemas latentes de salud en los consumidores finales, como el hombre. La fuente principal del cadmio en el agua son los efluentes provenientes de fábricas de electrogalvanizados, petroquímicas y de la lixiviación de depósitos mineros. La elevada antropización de los ecosistemas acuáticos induce cambios en su hidrología natural y niveles de salinidad. Además, el cambio climático global provoca una disminución de los niveles hidrológicos naturales debido al incremento de las temperaturas y la reducción de las precipitaciones, lo que aumenta la concentración de cadmio. El comportamiento de una animal es un vínculo entre los procesos fisiológicos y ecológicos y por lo tanto es un indicador ideal para el estudio del efecto de los contaminantes sobre los organismos vivos. La contaminación ambiental en ecosistemas naturales a menudo se produce con concentraciones muy por debajo de la concentración letal, pudiendo causar efectos subletales, que no producen la muerte del organismo pero los inhabilita para funcionar en un contexto ecológico ya que su comportamiento normal se ve alterado, afectando a su capacidad olfativa, respuesta de huida, protección de la puesta, migración, búsqueda de comida, etc. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la existencia de un patrón diario en la toxicidad al cadmio en el pez cebra, para lo que se investigaron por un lado las diferencias día-noche en la respuesta aguda de esta especie a una concentración letal de cadmio (100 mg/l), y por otro lado la influencia de una concentración subletal (40 mg/l) sobre la actividad motora del pez cebra en mitad del día o de la noche. Nuestros resultados mostraron que para una misma concentración de cloruro de cadmio, tanto el porcentaje de mortalidad como la respuesta a una concentración subletal son mayores durante el día que por la noche, indicando la existencia de variaciones diarias en la vulnerabilidad del pez cebra a la exposición a cadmio.

Palabras Clave: Cadmio; cronotoxicidad; comportamiento; pez cebra;

1. Introducción.

1.1 Ritmos biológicos.

Los movimientos de rotación y traslación que realiza La Tierra dan lugar a que los organismos que la habitan se encuentren sometidos a cambios cíclicos de los factores ambientales. Dichos ciclos pueden tener diferente periodicidad: anual (dando lugar a las estaciones en las regiones templadas), lunar (dando lugar a las mareas) y diaria (originando la alternancia día-noche). Todos estos ciclos han actuado sobre los seres vivos a través de la evolución y han promovido la aparición de **relojes biológicos** que pueden ser utilizados para anticiparse a estos cambios, a fin de optimizar su supervivencia. Por esta razón, la mayoría de los animales poseen un reloj endógeno que les proporciona información temporal permitiéndoles predecir los cambios diarios de luz-oscuridad, conociendo así la hora del día, la fase lunar y la época del año en la que se encuentran.

Las variaciones periódicas externas son utilizadas por los animales para ajustar su reloj interno y sus ritmos biológicos (Aschoff, 1981) y se denominan sincronizadores ("zeitgebers"). Se pueden clasificar en dos tipos: factores abióticos y bióticos. Entre los **factores abióticos**, la luz y los ciclos de temperatura son los principales sincronizadores del ritmo diario de comportamiento y de expresión de genes reloj (Aschoff, 1981, Carr *et al.*, 2006; Ziv y Gothilf, 2006). La luz y los ciclos de temperatura tienen también un papel crucial en los ritmos estacionales, como la reproducción en los peces (Bromage *et al.*, 2001; Anguis y Cañavate, 2005; Clark *et al.*, 2005). En cuanto a los **factores bióticos**, se ha demostrado que la alimentación puede actuar como un potente sincronizador (Edmons, 1997; Boulos y Terman, 1980).

Un ritmo biológico se puede definir como la repetición de un fenómeno biológico en intervalos de tiempo regulares (Aschoff, 1981). Los ritmos biológicos diarios se encuentran asociados a oscilaciones ambientales con una periodicidad de 24 horas, y se denominan circadianos cuando persisten bajo condiciones ambientales constantes, indicando la existencia de control endógeno, los ritmos circanuales están asociados con ciclos ambientales de periodicidad anual y pueden afectar a muchos procesos biológicos estacionales tales como la reproducción, la migración, la hibernación, etc.

Los ritmos diarios han sido profusamente estudiado en los peces durante las últimas dos décadas, con especial énfasis en los ritmos de comportamiento (locomotor y alimentario) o en los ritmos de secreción de factores neuroendocrinos. En lo que se refiere a los ritmos de comportamiento, las especies de peces han sido clasificadas generalmente como diurnas, nocturnas o crepusculares, de acuerdo con la hora del día en la que llevan a cabo sus actividades. Esta preferencia para estar activo en determinadas horas del día suele ser específica de la especie y se puede determinar genéticamente o asociada con las adaptaciones a los hábitats (disponibilidad de alimento, depredación, etc.) o los requisitos sensoriales (dependencia de la visión para la captura de alimento). Sin embargo, puede haber cierta plasticidad en los patrones de actividad (Ali, 1992), como ocurre con los juveniles de bacalao, *Gadus morhua*, que presentan actividad nocturna durante el verano y cambia a la diurna en invierno (Clark y Green, 1990). Sin embargo, hay especies que mantienen firmemente su patrón de comportamiento, como la tenca, que es estrictamente nocturna incluso en fotoperiodos extremadamente cortos con sólo dos horas de oscuridad por día (Herrero *et al.*, 2003).

Investigaciones recientes en pez cebra sobre la cronotoxicología del anestésico MS-222 han revelado que la DL50 varía en función de la hora del día, encontrando que una misma concentración de anestésico (p.e. 200mg/l) puede provocar una mortalidad del 95% o del 14% si se administra en mitad del día (ML) o de la noche (MD),

respectivamente. Al igual que sucede con anestésicos, se desconoce la cronotoxicidad en peces de metales como el cadmio o el cobre, y sus repercusiones en acuicultura. Estudios preliminares utilizando *Gammarus* (anfípodo marino) como biomarcador, demuestran que los efectos negativos del cadmio (reducción de la actividad motora) varían en función de la hora del día, lo cual sugiere la existencia de un ritmo diario de toxicidad (Morillo-Velarde et al.).

Es definitiva, los peces, al igual que el resto de animales, han desarrollado un oscilador circadiano y muestran ritmos biológicos diarios. Por ello, un pez ha de ser considerado como un sistema fisiológico rítmico, diferente en distintos momentos del día, y no debería sorprendernos que sus respuestas frente a la exposición de xenobióticos sean igualmente rítmicas

1.2. Pez cebra *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822.

El pez cebra ha sido descrito como habitante de aguas estancadas, los bordes de los arroyos, acequias y algunas veces de los ríos y arroyos de colina. Esta especie es común en llanuras de inundación, en lugar de ser una verdadera especie ribereña. Son más frecuentes en los estanques poco profundos y de cuerpos permanentes de agua, a menudo relacionados con el cultivo de arroz. Esta asociación puede estar relacionada con el uso de fertilizantes que promueven el crecimiento de zooplancton, un componente importante de su dieta. Además, habitar en los arrozales y aguas poco profundas de temporada es una forma de evitar los grandes peces depredadores. Cuando el pez cebra se encuentra en los arroyos y ríos, éstos suelen tener un régimen de flujo bajo y se encuentra más a menudo en los márgenes. Observaciones de comportamiento de su distribución vertical indican que ocupan la totalidad de la columna de agua y se encuentran con la misma frecuencia tanto en aguas abiertas como entre la vegetación acuática (Spence *et al.*, 2008).

El pez cebra es un animal modelo empleado en una gran cantidad y variedad de investigaciones. En concreto, es una de las especies que se utiliza más frecuentemente para en los tests de toxicidad (Grush, 2004; Mikula 2006). Además constituye una herramienta útil para establecer las bases moleculares de estudios cronobiológicos de relojes circadianos de vertebrados, en los cuales están siendo muy estudiados los ritmos de comportamiento y melatonina para caracterizar mutantes (Cahill,2002). Por este motivo, son varios los artículos que se han publicado sobre los ritmos de locomoción en el pez cebra, donde bajo condiciones constantes se demuestra que están regulados por su reloj circadiano y que en condiciones de LD (luz-oscuridad) la mayoría muestran ritmos diurnos de actividad locomotora (Hurd *et al.*, López-Olmeda *et al.*,2006).



Figura 1. pez cebra, *Danio rerio*

1.3 Metales pesados: Cadmio

Los metales pesados están considerados como serios contaminantes del ecosistema acuático. Muchos de estos compuestos no biodegradables son absorbidos y acumulados por los peces e incorporados a la cadena trófica, causando problemas latentes de salud en los consumidores finales, como el hombre (Figuroa, 1998). La fuente principal del cadmio en el agua son los efluentes provenientes de fábricas de electrogalvanizados, petroquímicas y de la lixiviación de depósitos geológicos. Este metal es absorbido dentro del organismo y en el agua puede formar complejos solubles con sustancias húmicas no reduciéndose su toxicidad como ocurre con otros metales. La incorporación del cadmio a la cadena alimentaria se hace principalmente a través de la dispersión en el suelo y aguas hasta las plantas y animales marinos. El ser humano incorpora al organismo aproximadamente un tercio del cadmio al que está expuesto con los alimentos de origen animal que consume y dos tercios de origen vegetal (Antón y Lizaso, 2001).

Los peces son utilizados cada vez con mayor frecuencia como modelo para trabajos experimentales, pues su pequeño tamaño y la rápida reproducción los hacen particularmente idóneos para las más variadas pruebas, especialmente en investigaciones de toxicología y el monitoreo de la contaminación del medio acuático. Además, los costos en términos económicos y biológicos pueden ser reducidos mediante el uso de pequeños peces de acuario en estudios de toxicidad (Domitrovic, 1997), los cuales presentan diferentes patrones de acumulación, dependiendo del metal, de la concentración en el medio y del tiempo de exposición (Eisler *et al.*, 1972).

Los bioensayos han sido el método tradicional para documentar la presencia o ausencia de efectos aparentes de los contaminantes sobre los sistemas vivos. Las pruebas letales o de toxicidad aguda (determinación de la LC50) permiten evaluar los principales efectos de los contaminantes sobre la estructura de los organismos o de las poblaciones acuáticas a corto plazo (Calabrese *et al.*, 1977). Los métodos más utilizados en estudios de contaminación son los de carácter fisicoquímico e hidrobiológico; un enfoque intermedio lo brindan los bioensayos en laboratorio que establecen un puente entre esos procesos (Vargas-Boldrini, 1994) y documentan la presencia o ausencia de efectos aparentes de los contaminantes sobre los sistemas vivos (Davis, 1977).

Wedmeyer y Word (1974) propusieron que el agua destinada a contener peces debe reunir entre otras características valores de cadmio no mayores a 0,003 mg/l. La EPA (Environmental Protection Agency) de EEUU establece que el contenido de cadmio en aguas naturales no debe sobrepasar los 0,01 mg/l. Aún cuando las aguas naturales no superan las concentraciones empleadas normalmente en los ensayos agudos de toxicidad, es bien sabido que la bioacumulación del cadmio en los peces produce malformación de la estructura ósea y desórdenes en el sistema nervioso (Roberts, 1989). Además se sabe que a mayor temperatura las tasas de reacción química y bioquímica aumentan, mientras que el umbral de la respuesta biológica disminuye (Eisler y Wapner, 1975). Esto significa que los contaminantes en aguas cálidas son a menudo más solubles y absorbidos con mayor rapidez por plantas y animales para una concentración dada y pueden producir disfunciones fisiológicas y de comportamiento en concentraciones más bajas que en zonas templadas (Escobar, 1978).

La contaminación ambiental en los ecosistemas naturales a menudo se produce con concentraciones muy por debajo de la concentración letal, pudiendo causar efectos subletales (Cabrera *et al.*, 1998). De esta forma, los test de toxicidad ignoran la llamada "muerte ecológica", donde aunque el efecto a niveles bajos de exposición al tóxico no son suficientes para matar el organismo, los inhabilita para funcionar en un contexto ecológico

debido a que su comportamiento normal se ve alterado (Scott y Sloman 2003). Semejante modificación en el comportamiento puede afectar en la huída del depredador, la capacidad olfativa, protección de la puesta, la migración, búsqueda de comida, el comportamiento rítmico diurno, entre otros efectos (Little y Finger, 1990; Scott y Sloman, 2003). El comportamiento de un animal es un vínculo entre los procesos fisiológicos y ecológicos (Gerhardt, 1998), por lo tanto es un indicador ideal para los estudios sobre el efecto de los contaminantes en el medio ambiente y en la evaluación de los posibles efectos adversos sobre la biota.

Identificar y medir los efectos ambientales causados por una sustancia química requiere, en la mayoría de los casos, de esfuerzos multidisciplinarios. De acuerdo con el enfoque de la tríada para el ecosistema de evaluación de la integridad de un arroyo (Monda, *et al.*, 1995), los análisis químicos deben combinarse con la respuesta biológica (por ejemplo, la estructura y el funcionamiento de la comunidad) y con las evaluaciones toxicológicas.

2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue determinar la existencia de un patrón diario en la toxicidad al cadmio en el pez cebrá, para ello se investigaron:

- 1) las diferencias día-noche en la respuesta aguda del pez cebrá a una concentración letal de cadmio (100 mg/l).
- 2) la influencia de una concentración subletal de cadmio (40 mg/l) sobre la actividad motora del pez cebrá en mitad de la fase de luz (ML) y de oscuridad (MD).

3. Material y métodos

3.1. Animales y alojamiento

Los peces cebrá machos empleados para este estudio tenían una talla de $31,0 \pm 1,7$ mm y las hembras $38,0 \pm 2,0$ mm. Todos los peces procedían de un suministrador local (Jumipez S.L, Murcia, España). El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cronobiología de la Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron en dos acuarios de cristal (100cm x 40cm x 30cm) divididos en 6 compartimentos de aproximadamente 16 cm. de ancho. Los acuarios contenían agua dulce de clorada y filtrada de forma constante por dos filtros biológicos de mochila y se ubicaron en una cámara hermética donde la temperatura se mantuvo constante a $28, \pm 0,5^{\circ}$ C, durante todo el experimento. El fotoperiodo fue de 12:12h LD (luz : oscuridad), siendo el encendido de las luces a las 15:00 h y el apagado a las 03:00 h. La iluminación se suministró con tubos fluorescentes (F15W/GRO, Sylvania Gro-Lux, Germany), alcanzándose una intensidad de aproximadamente 700 lux en la superficie del agua. Los peces se alimentaron una vez al día a horas aleatorias con una dieta de marca comercial (Prodac), enriquecida con vitamina C.

3.2 Toxicidad aguda en ML y MD

Para este experimento se utilizaron 6 réplicas con 8 peces cada una, y los peces se expusieron a una concentración de 100mg/l de cloruro de cadmio en ML y MD. Para ello los peces se introdujeron en botes de cristal, cada uno con una densidad de 8 peces por 700ml de agua de clorada más Cloruro de Cadmio. A su vez, los botes se colocaron dentro de un acuario de 60 l que contenía agua a la temperatura constante de 27°C, para cuyo mantenimiento se empleó un calentador. El agua de los botes se mantuvo con aireación constante. El periodo de exposición al cadmio fue de 3 h, de acuerdo con el protocolo descrito por Hirt y Domitrovic (2002), que mostraron efectos letales del cadmio

en *Cichlasoma dimerus* a partir de las 3 h de exposición. Tras la exposición, los peces se trasladaron a otros botes de las mismas características que contenían agua limpia, y se realizó la primera observación de la tasa de mortalidad (+ 0 h), siendo la segunda 24 horas después de la exposición al contaminante (+24 h).

Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo utilizando EPIs (Equipamientos de Protección Individual).

3.3 Efecto de concentraciones subletales de cadmio sobre la actividad motora del pez cebra en ML y MD.

La concentración de cadmio a la que se expusieron los peces para este experimento se eligió de acuerdo al estudio realizado por Hirt, L.M. y Domitrovic, H.A. (2002). Para el estudio de las diferencias día/noche en el efecto del cadmio sobre la actividad motora del pez cebra, los animales se expusieron a dicho contaminante en mitad de la fase de luz (ML) y de oscuridad (MD) y se registró su actividad motora. Para ello, se equipó un acuario de metacrilato con separadores perforados para permitir la circulación del agua y se alojó un pez por compartimento resultante (7 en total). Este acuario se colocó dentro de otro de cristal de 10 L (30cm x 20cm x 18cm), facilitándose así la extracción inmediata de los peces cebra al contaminante. La actividad motora de los individuos durante el experimento se grabó con una videocámara con opción "Nightshot plus" que permite grabaciones en ausencia de luz visible (SONY, Handycam, DCR-SR55E), y posteriormente se analizaron los vídeos resultantes con un programa informático especialmente diseñado para este fin (Fish Tracker, G. Ros Sánchez, Universidad de Murcia). Dicho software realiza un seguimiento del desplazamiento de cada uno de los peces a lo largo del ensayo y genera un archivo que puede ser exportado a Microsoft Excel para su posterior análisis. La iluminación durante ML se consiguió con un tubo fluorescente (F15W/GRO, Sylvania Gro-Lux, Germany), mientras que para la grabación en condiciones de oscuridad (MD) se emplearon lámparas de LEDs de infrarrojos (diodos monocolor, mod. L- 53F3BT, 5 mm) de manera que los peces no percibían ningún tipo de luz pero se posibilitaba el análisis de imágenes por parte del Fish Tracker. La filmación de la actividad se inició 1h antes de la exposición al cadmio, que duró 3 h. Además, se realizó una grabación de 3,5 h en ML y MD sin que hubiera contacto con el tóxico y que fue empleada como control del experimento. El agua utilizada para los ensayos fue de clorada previamente y se mantuvo a una temperatura constante de 28,5 °C. Los peces se mantuvieron en ayuno durante las 24 h previas al experimento y la entrada al compartimento experimental fue restringida durante el desarrollo del experimento.

3.4. Análisis de los datos

El análisis de los datos del estudio se realizó con Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS v16.0 (SPSS Inc., USA). En el caso del test de toxicidad aguda, para determinar la existencia de diferencias significativas en la tasa de mortalidad se llevó a cabo un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA II), siendo los factores la hora de observación (al término de la exposición o 24 h después) y el momento del día en que se llevó a cabo dicha exposición (ML o MD). Posteriormente, se llevó a cabo un test de Tukey, con un umbral estadístico $P < 0,05$.

De cada filmación realizada para el estudio del efecto subletal del cadmio sobre el patrón de actividad motora (controles ML y MD; exposición a Cd en ML y MD) se obtuvo un archivo de datos generado por el software de seguimiento de peces (Fish Tracker, G. Ros Sánchez, Universidad de Murcia), que se exportó a Microsoft Office Excel para su

análisis. Dicho archivo indica la posición de cada pez cada segundo de la filmación. Para facilitar el análisis estadístico de la evolución de la actividad motora de los peces durante cada ensayo se realizó la media del desplazamiento cada 15 minutos y se llevó a cabo un análisis paramétrico de la varianza (ANOVA I), seguido de un test de Tukey ($P < 0,05$). Para comparar la media de la actividad motora entre los peces filmados en ML y MD (tanto en los ensayos control como en las exposiciones) se realizó un test T-Student ($P < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Toxicidad aguda en ML y MD:

Tanto en ML como en MD, la tasa de mortalidad tras 24 horas del fin de la exposición a cadmio (100 mg/l) es significativamente superior a la tasa de mortalidad observada inmediatamente después de la exposición. Además, aunque al fin de la exposición no se encontraron diferencias día-noche en los porcentajes de mortalidad (~3-5%) sí que se hallaron 24 horas después, de manera que cuando la exposición se había realizado en ML la tasa de mortalidad a las 24 h fue significativamente superior ($78 \pm 7,51\%$) que cuando se llevó a cabo en MD ($35 \pm 8,33\%$). (Fig. 2).

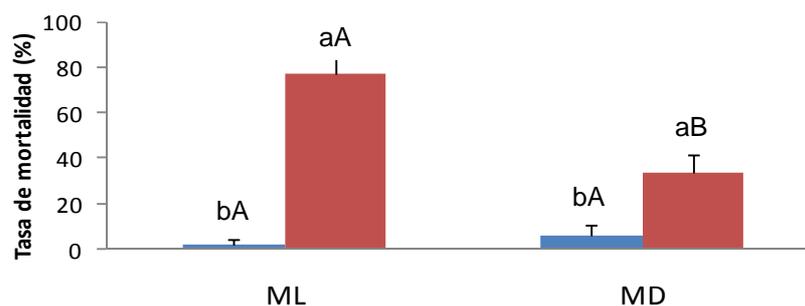


Figura 2. Porcentaje de mortalidad en ML y MD al finalizar la exposición a cadmio (barras azules) y 24 horas después (barras rojas). Las letras minúsculas sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas entre horas de observación para un mismo grupo experimental (ML o MD). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre diferentes grupos experimentales para una misma hora de observación (al finalizar la exposición o 24 horas después).

4.2 Efecto de concentraciones subletales de cadmio sobre la actividad motora del pez cebra en ML y MD.

Las filmaciones **control** mostraron niveles de actividad significativamente más elevados en ML ($0,55 \pm 0,03$ cm/s) que en MD ($0,20 \pm 0,02$ cm/s) (t-Student, $P < 0,05$). En ambos casos la actividad era mayor durante la primera parte del ensayo, pero se estabilizaba transcurrida 2h en ML y 1h en MD. En el control ML la actividad se mantuvo durante toda la grabación entre 0.4 y 0.7 cm/s, siendo significativamente más elevada durante las dos primera horas de grabación (ANOVA I, $P < 0,05$). En el control MD se observó un descenso significativo de la actividad durante la primera hora del ensayo, desde 0.55 cm/s (cuando se introdujeron los peces en el acuario) hasta 0.15 cm/s (ANOVA I, $P < 0,05$). Durante el resto de la grabación la actividad se mantuvo estable alrededor de 0.1 cm/s.

En ML, la posición de los peces en la columna de agua se mantuvo constante entre 6-8 cm de profundidad (posición intermedia) durante toda la grabación. En MD, los peces se situaban a una profundidad semejante a la de ML durante la primera hora (6-8 cm), acercándose a la superficie paulatinamente. Durante las siguientes horas, los peces se situaron muy próximos a la superficie (0-2 cm de profundidad) y permanecieron en esta posición durante el resto de la grabación.

En ML, cuando los peces se expusieron a una concentración de **cadmio** de 40 mg/l se produjo un pico de actividad (1,4 cm/s) que era significativamente superior a los niveles observados durante la hora previa a la exposición. Posteriormente, durante la primera hora de exposición al tóxico, la actividad se redujo significativamente hasta alcanzar valores muy reducidos y estables, en torno a 0,1 cm/s (ANOVA I, $P < 0.05$) (Fig. 3A). En MD, la actividad durante la fase de pre-exposición se mantuvo en niveles bajos y estables, entre 0,2 y 0,4 cm/s. Una vez que se añadió el cadmio al acuario se produjo un pico significativo de actividad (1.7 cm/s) (ANOVA I, $P < 0.05$) pero durante las horas siguientes disminuyó gradualmente y se estabilizó a partir de la segunda hora de exposición ($\sim 0,8$ cm/s) (Fig. 3B), aunque no alcanzó valores tan bajos como en ML, siendo la actividad media tras la exposición a cadmio en MD ($0,93 \pm 0,01$ cm/s) significativamente superior a la registrada en ML ($0,39 \pm 0,01$ cm/s) (t-Student, $P < 0,05$).

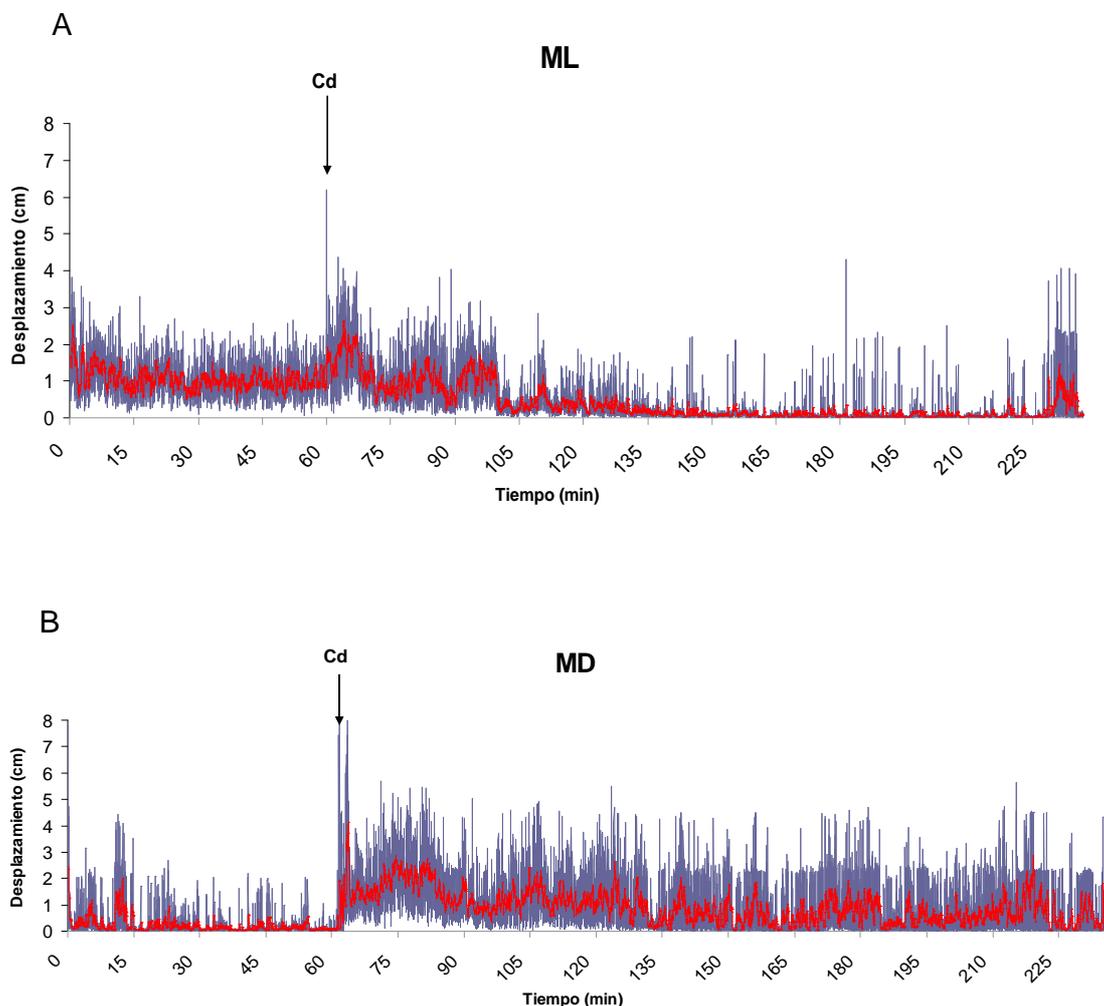


Figura 3. Media de la actividad motora de peces cebra 1 h previa y 3 h después de la exposición a una concentración de 40 mg/l de cadmio en el agua del acuario, en ML (A) y MD (B) (n=7). Los datos representados con barras azules indican el desplazamiento (en cm) por segundo de filmación, a lo largo de 4 h. La línea de color rosa representa la media móvil de los datos originales. La flecha en la parte superior de ambas gráficas indica el momento de inicio de la exposición al cadmio.

En cuanto al efecto sobre la posición en la columna de agua, se observó que en ML, antes de la exposición, los peces nadaban cambiando su posición constantemente (entre 8-14 cm de profundidad), pero una vez que se añadió el cloruro de cadmio se redujo dicha oscilación y tras 1 h de exposición los peces presentan una actividad natatoria muy reducida y próxima al fondo del acuario. (Fig. 4A). En MD, durante la hora previa a la exposición, la posición de los peces era entre los 8 y 10 cm de profundidad pero tras la administración del tóxico se produjeron unas fuertes oscilaciones a lo largo de toda la columna de agua. Trascurrida aproximadamente una hora y media de la exposición, los peces se situaron más próximos a la superficie del agua, variando su posición entre los 2 y 8 cm de profundidad. (Fig.4B)

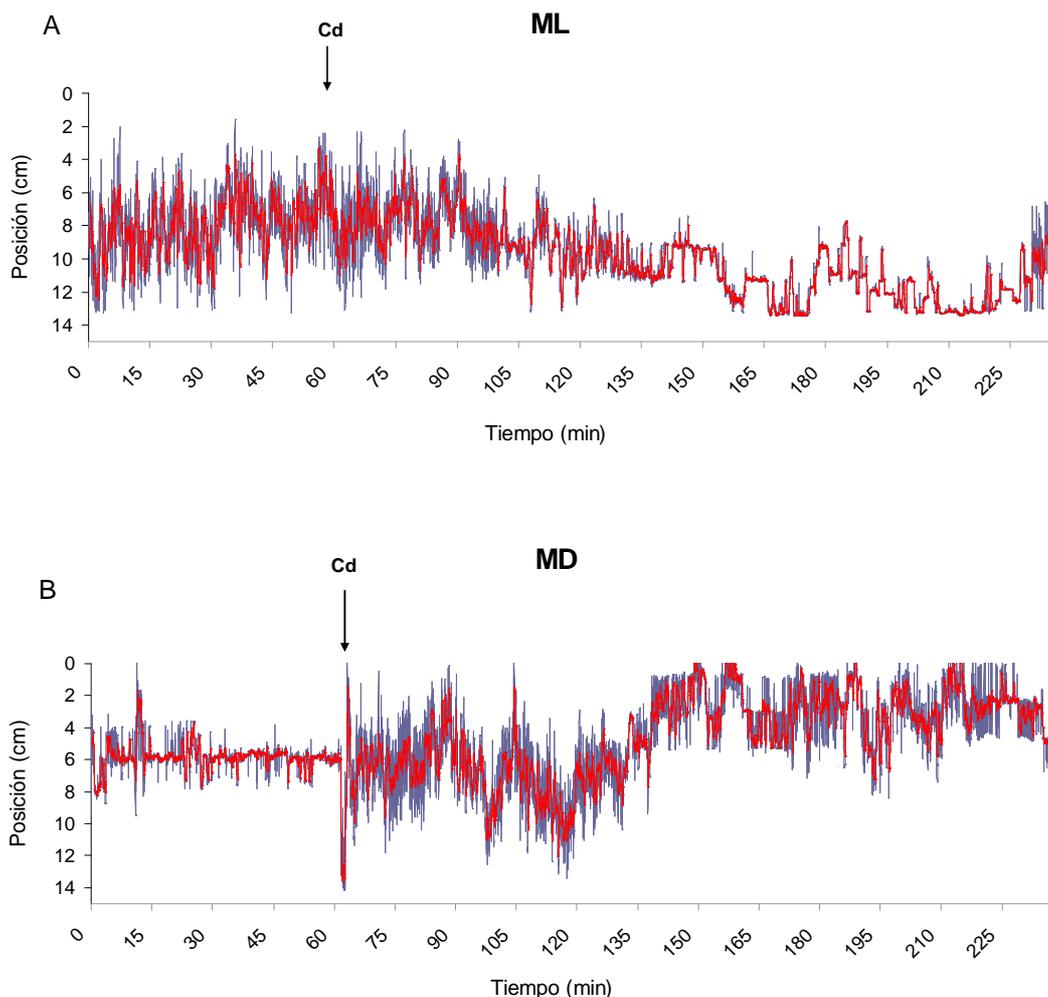


Figura.4. Media de la posición en la columna de agua 1 h previa y 3 h después de la exposición a una concentración de 40 mg/l de cadmio en el agua del acuario, en ML (A) y MD (B) (n=7). Los datos representados con barras azules indican el desplazamiento (en cm) por segundo de filmación, a lo largo de 4 h. La línea de color rosa representa la media móvil de los datos originales. La flecha en la parte superior de ambas gráficas indica el momento de inicio de la exposición al cadmio.

5. Discusión

La piel del pez es una envoltura del cuerpo que le brinda protección, constituyendo la primera barrera defensiva del organismo contra enfermedades y situaciones ambientales adversas, cumpliendo también funciones respiratorias, excretoras y osmoreguladoras (Voto, 2002). En este estudio, los resultados mostraron la existencia de cambios fisiológicos y patológicos en los peces cebra asociados a la presencia de cloruro de cadmio en el agua. Los peces tienen un necesario e íntimo contacto con el agua, haciéndolos vulnerables a cualquier sustancia disuelta en ella, por lo que las alteraciones de su fisiología y comportamiento pueden ser considerados como indicadores de contaminación.

En el test de toxicidad aguda, se expuso a los ejemplares de *Danio rerio* a una concentración de 100 mg/l durante 3 horas. Esta concentración es superior a la LC50 hallada en otro estudio tras una exposición a cadmio durante 8 horas (48,93 mg/l) (U.S. Environmental Protection Agency, Continent Ecology Division). En nuestro caso el tiempo de exposición fue menor pero el objetivo del experimento no era hallar el porcentaje de mortalidad en sí mismo sino observar posibles diferencias día/noche en dicha tasa y en ciertos biomarcadores tisulares. Inmediatamente después de la exposición observamos que la mortalidad no presentaba diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo, 24 horas después la tasa de mortalidad fue mayor en ML ($78 \pm 7,51\%$) que en MD ($35 \pm 8,33\%$). Este resultado indica que aunque la tasa de mortalidad una vez concluida la exposición no difería entre ML y MD los peces presentaban mayores daños en ML, por lo que un día después del ensayo la mortalidad en este grupo fue significativamente mayor que en los peces que habían sido expuestos a cadmio en MD. Por lo tanto, nuestros datos sugieren la existencia de una mayor tolerancia al cadmio durante la noche. Estudios similares llevados a cabo acerca de ritmos de toxicidad de anestésicos (MS222) han demostrado que en dorada (*Sparus aurata*) también hay variaciones día-noche en la toxicidad de los anestésicos, siendo mayor la mortalidad durante el día (para una concentración dada) (Vera, L.M. et al.). Todos estos resultados son novedosos en especies de teleósteos pero en mamíferos como el hombre, se han descrito con anterioridad numerosos ritmos diarios de toxicidad para diversos fármacos (Reinberg y Ashkenazi, 2008).

Los individuos de *Danio rerio* empleados en este estudio toleraron la concentración de 40 mg/l de CdCl₂, para una exposición de 3 h indicando que esta concentración es subletal para el pez cebra. Esta resistencia al cadmio observada en nuestro experimento podría ser conferida por la metalotioneína (MT), que es una proteína que posee la capacidad para unir metales pesados (de origen fisiológico o xenobióticos) a los grupos tiol de sus residuos de cisteína. Así, De la Torre *et al.* (2000) argumentaron que la persistencia del cadmio en el epitelio de las branquias se podría deber a una inducción intracelular de la metalotioneína, controlando la cinética de la bioacumulación y la manifestación del efecto tóxico a través de una reducción de la disponibilidad al metal de los sitios funcionales de ligamento.

El comportamiento de un animal es un vínculo entre los procesos fisiológicos y ecológicos (Gerhardt, 1998). En nuestro estudio, aunque una concentración de 40 mg/l

no produjo mortalidad en los peces sí que tuvo un efecto sobre sus patrones de actividad. De esta manera, se comprobó la correlación directa entre el momento de administrar el cadmio y un pico en la actividad de los peces, tanto en ML como en MD. Este aumento de la actividad pudo ser debido a la irritación del tegumento al entrar en contacto con el tóxico, especialmente las branquias. Esto se corresponde con una respuesta típica de fuga, donde el organismo trata de evitar el área impactada por la sustancia química (Smith y Bailey 1988). Sin embargo, la actividad motora en ML durante las horas siguientes de exposición al cadmio mostró una reducción progresiva, siendo en la última hora muy reducida (0,1 cm/s). Esta disminución en la actividad natatoria puede reflejar la existencia de una conducta de evitación, a través de la cual el organismo vivo trataría de disminuir la probabilidad de muerte o de los costes metabólicos invertidos en mantener la homeostasis fisiológica (Olla *et al.*, 1980; Schreck *et al.*, 1997). A partir de los 90 minutos de exposición, la natación era letárgica y los peces mostraban pérdida de equilibrio. Este comportamiento ya se observó con anterioridad en ejemplares de pez cebra cuando se expusieron a cloruro de cadmio en ensayos agudos y subagudos (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1985). En los individuos de nuestro estudio expuestos a cadmio en MD, se produjo también una disminución de la actividad pero no tan acusada como en el grupo expuesto en ML. En MD, los peces mantuvieron una actividad similar a la observada en la respuesta típica de fuga (Smith y Bailey 1988), manteniéndose a una profundidad media en la columna de agua durante los 75 minutos tras la incorporación del tóxico al acuario, trascurridos los cuales se produjo una pequeña disminución de la actividad. Además, los peces se desplazaron a la superficie del agua, probablemente debido a que el cadmio produce sofocamiento ya que los precipitados o coaguladores de mucoproteínas producidos como defensa se depositan sobre el epitelio branquial, produciendo un bloqueo del intercambio de gases, de la excreción de productos de desecho y de la osmoregulación (Tafanelli y Summerfelt, 1975).

Muchos estudios han demostrado que las respuestas conductuales no están necesariamente correlacionadas a la concentración tóxica, i.e.: concentraciones inferiores pueden inducir un aumento de la actividad natatoria, mientras que concentraciones más altas pueden producir una disminución en la actividad (Little *et al.*, 1989). A partir de nuestros resultados se observó que si se compara el comportamiento de los peces en ML y en MD, para una misma concentración de cloruro de cadmio, la respuesta en ML se asemeja a la que correspondería a exposiciones con concentraciones mayores del contaminante, indicando que el pez cebra podría ser más vulnerable a la exposición al cadmio en ML que en MD, corroborando los resultados de mortalidad obtenidos con dosis letales. Resultados similares se obtuvieron en dorada (Vera *et al.*, 2009) donde se observaron claras diferencias día/noche en el tiempo de inducción a la anestesia, siendo éste mayor en MD. En el caso del cadmio sería interesante también investigar la existencia de ritmos diarios de eliminación de este tóxico por parte de los peces, de manera que las diferencias día/noche observadas en su respuesta fisiológica y de comportamiento podrían reflejar tanto diferencias diarias en la susceptibilidad como en los mecanismos detoxificantes. En este sentido, Airaksinen *et al.*, (2003) mostraron que en hígado y branquias de pez cebra, la exposición durante 4 h a 5,6 mg/l de cadmio inducía la expresión de genes para MT. En estudios futuros se podría tratar de dilucidar la existencia de ritmos diarios de expresión de estos genes, lo que podría dar nueva luz a la interpretación de nuestros resultados.

6. Conclusión

Las principales conclusiones derivadas de este proyecto son:

La existencia de diferencias día/noche en los daños causados a *Danio rerio* ante la exposición a cloruro de cadmio en concentraciones letales y subletales. Estas diferencias se reflejaron en una mayor tasa de mortalidad para una concentración de 100 mg/l en ML así como una mayor reducción de la actividad motora para una concentración de 40 mg/l. Estos resultados indican que el pez cebra es más vulnerable al cadmio en ML que en MD.

Además, este proyecto pone de manifiesto la importancia del estudio del ritmo de actividad de las especies a la hora de analizar los efectos de los contaminantes sobre su respuesta fisiológica y de comportamiento. Asimismo, la utilización de la biomonitorización del comportamiento mediante el análisis de imágenes ha resultado una herramienta muy útil para el estudio de las diferencias conductuales con concentraciones subletales.

7. Bibliografía

Airaksinen S., Råbergh C.M.I., Lahti A., Kaatrasolo A., Sistonen L., Nikinmaa M. 2003. Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. Comp. Biochem. Physiol. 134, 839-846.

Ali, M.A., 1992. Rhythms in fishes. Plenum Press, New York.

Allen, P. 1993. Accumulation profiles of cadmium and their modification by interaction with lead and mercury in the edible tissues of *Orochromis aureus*. Fresenius Envir Bull 2:745-751.

Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. Aquaculture 246, 133-145.

Antón A. y J. Lizaso. 2001. Los metales pesados en la alimentación. Fundación Ibérica para la seguridad alimentaria. Madrid. España. 5p.

Aschoff J. 1981. Biological rhythms. In: Handbook of Behaviour Neurobiology. 4. Plenum: New York.

Blanco-Vives B., Sánchez Vázquez F.J. 2009. Synchronisation to light and feeding time of Circadian Rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. Physiol. Behav.

Borgmann U., Norwood W.P. 2002. Metal bioavailability and toxicity through a sediment core. Environ. Pollut 116:159-168.

Boulos Z., Terman, M. 1980. Food availability and daily biological rhythms. Neuroscience Biobehaviour. 4, 119-161.

Bromage, N., Porter, M., Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture 197, 63-98.

Cabrera C, Ortega E, Lorenzo ML, López MDC. 1998. Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. Rev Environ Contam. T 154, 55-81.

Calabrese A., P. Thurberg and E. Gould. 1977. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Mar. Fish. Rev.* 39 (4), 5-11.

Canton J.H. & Slooff W. 1982. Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd^{2+}) with freshwater organisms of different trophic levels. *Ecotoxicol. environ. Saf.*, 6, 113-128

Carr, A.J., Tamai, T.K., Young, L., Ferrer, V., Dekens, M., Whitmore, D., 2006. Light reaches the very heart of the zebrafish clock. *Chronobiology International.* 23, 91-100.

Chan P.K. & Ching S.H. 2003. Cadmium- induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. *Arch Toxicol* 77,69-79.

Clark D.S, Green, J.M., 1990. Activity and movement patterns of juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*, in Conception Bay, Newfoundland, as determined by sonic telemetry. *Can. J. Zoology.* 68, 1434-1442.

Davis J. 1977. Standardization and protocols of bioassays, their role and significance for monitoring, research and regulatory usage. *Aquatic Toxicity Workshop.* Halifax, Nova Scotia. pp 1-14.

De la Torre, F.R., Salibian, A. & Ferrari, L. 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution* 109, 277-282.

Domitrovic H. 1997. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: Evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870). VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Argentina. Resumen.

Edmons, S. 1997. Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. *Physiology Behaviour*, 18, 915-919.

Eisler R. y R. Wapner. 1975. Second annotated bibliography on biological effects of metals in aquatic environments. U.S. Springfield, USA. Environmental Protection Agency. Report 6003,75-008.

Eisler R., G. Zarogian y R. Kennekey. 1972. Cadmium uptake by organism. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 29, 1367-1369.

Escobar J. 1978. Study concerning mercury pollution in Cartagena. *FAO Doc. Tec.* 185. 25 p.

Figuroa L.1998. Acumulación y depuración de cobre y cadmio en *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1952), (Pises: Cichlidae). Efectos subletales sobre el crecimiento en función de ARN/ADN. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 37p.

Gerhardt, A. 1998. Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) survival effluent in South Africa. *Arch Environ. Con. Tox.* 35, 309-316.

Gonzalez P., Baudrimont M., Boudou A., Bourdineaud J.P.2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19, 225-235.

- Gothilf, Y., Meiri, I., Elizur, A., Zohar, Y., 1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin beta-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biology Reproduction*. 57, 1145-1154.
- Hirt L.M. & Domitrovic H.A. 2002. Toxicity and histopathological response in *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) exposed to cadmium chloride in acute and sublethal tests. *Rev.ictiol.*10 (1/2), 17-32.
- Hurd M.W., Debruyne J., Straume M., Cahill G.M. 1998. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.* 65, 465-472.
- Karlsson-Norrgren, L., Runn P., Haux C. & Forlin L. 1985. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachyderio rerio* (Hamilton- Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.* 27, 81-95.
- Lahiri K., Vallone D., Gondi S.B. et al. 2006. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *Plos biology*, vol 3.
- Lawrence C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Little E.E., Archeski R.D., Flerox B.A., Kozlovskaya V.I. 1989. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch Environ Con Tox* 19(3), 380–385.
- López-Olmeda J.F, Sánchez-Vázquez F.J. 2009. Zebrafish temperature selection and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to ahemeral cycles of light and temperature. *Chronobiology International*, 26 (2), 200-218.
- López-Olmeda J.F., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J. 2006. Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 23, 537-550.
- Monda DP, Galat DL, Finger SE.1995. Evaluation ammonia toxicity in sewage effluent to stream macroinvertebrates: 1. A multi-level approach. *Arch Environ Con Tox* 28, 378–384.
- Muramoto, S. 1981. Vertebral column damage and decrease of calcium concentration of fish exposed experimentally to cadmium. *Environmental Pollution (Series A)* 24, 125-133.
- Oliveira C., Ortega A., López-Olmeida J.F., Vera L.M., Sánchez-Vázquez F.C., 2007. Influence of constant light and darkness, light intensity and light spectrum on plasma melatonin rhythms in *Senegal sole*. *Chronobiology International*. 24, 615-627.
- Olla B.L., Pearson W.H., Studholme A.L. 1980. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. *Rapp P-V Re ´un-Cons Int Explor Mer* 179, 162–173.
- Paiva Magalhães D. et al. 2007. Behavioral response of Zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822, to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. *Ecotoxicology*, 16, 417-422.
- Reinberg A., Ashkenazi I. 2008. Internal desynchronization of circadian rhythms and tolerance to shift work. *Chronobiology International*.25, 625.

- Roberts R. J. 1989. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. *En* R.J. Roberts (Ed) Fish Pathology. 2^{da} Ed. Bailliere Tindall, Londres. pp. 56-133.
- Schreck C.B., Olla B.L., Davis M.W. 1997. Behavioral response to stress. In: Iwama GK, Pickering AAD, Sumpter JP, Schreck CB (eds) Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, 145–170.
- Scott GR, Sloman KA, Rouleau C, Wood CM. 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substances in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 206, 1779–1790
- Smith E.H., Bailey H.C. 1988. Development of a system for continuous biomonitoring of a domestic water source for early warning of contaminants. In: Gruber DS, Diamonds JM (eds) Automated biomonitoring: living sensors as environmental monitors. Ellis Horwood, Chichester (UK), pp: 182–205.
- Spence R., Geralch G., Lawrence C., Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish. *Danio rerio*. *Biol.*83,13-34.
- Vargas-Borldrini C. 1994. Ictiofauna. Características gerais e metodologías. Avaliação de impacto. Curso “Caracterização de exossistemas aquáticos e transição”. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Vasquez R., Bastardo A., Mundarain I.K. 2005. Ensayo de toxicidad aguda CL50-96h con acetato de cadmio y parámetros hematológicos en el híbrido cultivado *Colossoma macropomum* & *Piaractus brachypomus*. *Zootecnia Trop.*, vol 23(3) 247-257.
- Wedemeyer G. and Wood J. 1974. Stress as a predisposing factor in fish diseases. US Dept. Interior, FDL-38. Washington, USA.
- Weis J.S., Smith G., Bass C.S., Zhou T., Weis P. 2001. Effects of contaminants on behaviour: Biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience*. 51(3), 209-217.
- Wicklund-Glynn A., Norrgren L., Müssener A. 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquatic Toxicology*. 30, 13-26.
- Zhdanova I.V., Reeb S.G. 2005. Circadian Rhythms in Fish. *Fish Physiology*, Academic Press. 24, 197-238.
- Ziv, L., Gothilf, Y., 2006. Period2 Expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. *Chronobiology International*. 23,101-112.